

FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif YILDIZ

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**ZONGULDAK
Haziran 2013**

KABUL:

Elif YILDIZ tarafından hazırlanan "FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 03/06/2013

Başkan: Prof. Dr. Erdal DİNÇ (AÜ)



Üye : Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ (BEÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Şevket ATA (BEÜ)



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2013



Prof. Dr. Özden ÖZEL GÜVEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

"Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim."



Elif YILDIZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif YILDIZ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ

Haziran 2013, 97 sayfa

o-Fenilendiamin (*o*-FDA) türevleri aminler arasında bilinen insan sağlığı açısından en tehlikeli aminlerdendir. Saç boyalarında, gıda boyalarında ve gıda ürünlerinde *o*-FDA ve türevlerinin yaygın bir şekilde kullanıldığı tahmin edilmektedir. Bunun sonucu olarak boyanmış saç, biyolojik sıvı, çevre ve gıda numunelerinde bu maddelere rastlanması beklenen bir durumdur.

Bu çalışmada, saç boyası, boyanmış saç, biyolojik sıvı, gıda ve çevre örneklerindeki *o*-FDA türevlerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için GC-MS analizine dayalı bir analitik metot geliştirilmiştir. Bu metot ilgili maddelerin türetilmesi, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve GC-MS analizini içermektedir. Bu amaçla *o*-FDA'lar nitrit iyonu ile türevlendirilmiştir. Türetme verimini artırmak için pH parametresi optimize edilerek, optimum pH değeri 2 olarak belirlenmiştir. Elde edilen 1*H*-benzotriazol (1*H*-BT) türevlerine toluen ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon için pH optimize edilmiş ve en

ÖZET (devam ediyor)

yüksek verim pH 6'da elde edilmiştir. Toluen fazına alınan türevlerin GC-MS analizleri yapılarak yapıları aydınlatılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile *o*-FDA ve türevlerini, saç boyası, boyanmış saç, sanayi atık suyu, dere suyu, deniz suyu, meyve suyu ve mide suyu örneklerinde düşük konsantrasyonda dahi belirlenmesine imkan sağlayan, hassas, spesifik ve uygulanabilir bir analiz metodu geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *o*-Fenilendiamin türevleri, saç boyası, boyanmış saç, gıda örnekleri, mide suyu, çevre örnekleri, GC-MS

Bilim Kodu: 405.03.01

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF PHENYLENEDIAMINE AND DERIVATIVES

Elif YILDIZ

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Mehmet AKYÜZ

June 2013, 97 pages

o-Phenylenediamines (*o*-PDA) and derivatives are among the most dangerous amines in terms of human health. It is estimated that *o*-PDA and derivatives are extensively used in manufacturing of hair dyes, food colorants and foods. As a result, these substances present in dyed hair, biological liquid, environment and food samples is expected.

In this work, an analytical method based on GC-MS analysis was developed for qualitative and quantitative analysis of *o*-PDA derivatives in hair dye, dyed hair, gastric juice, food and environmental samples. This method includes derivatizing, liquid-liquid extraction and GC-MS analysis of molecular interest. For this aim, derivatization was achieved with nitrite. pH parameter was optimized to pH 2 for high yield. 1*H*-benzotriazole (1*H*-BT) derivatives were extracted with toluene. Highest extraction yield was established at pH 6. 1*H*-BT derivatives *o*-PDA's were extracted at pH 6 to isolate. Extracted derivatives were analysed with GC-MS and structural identification of compound were carried out.

ABSTRACT (continued)

A sensitive, spesific and applicable GC-MS method was developed for determination even low concentration of PDA's in hair dye, dyed hair, industrial wastewater, river water, seawater, fruit juice and gastric juice samples.

Keywords: *o*-Phenylenediamines and derivates, hair dyes, dyed hair samples, enviroment sample, fruit juice and gastric juice GC-MS

Science Code: 405.03.01

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalar ve tezin yazım aşamasında karşılaştığım problemlerde desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şevket ATA'ya, eşim Arş. Gör. Ufuk YILDIZ'a ve maddi desteklerinden dolayı BEÜ Araştırma Fonuna çok teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmalarım boyunca manevi olarak beni destekleyen aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
 BÖLÜM 1 GİRİŞ	 1
1.1 AROMATİK AMİNLER	1
1.1.1 Fenilendiamin ve Türevleri	3
1.2 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ	6
1.2.1. Fenilendiamin ve Türevlerinin Toksikliği.....	8
1.3 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ	11
1.3.1 Aromatik Aminlerin Belirlenmesinde Kullanılan Türetme Reaksiyonları	13
1.3.1.1 Açılma	13
1.3.1.2 Sililleme	15
1.3.1.3 Dinitrofenilleme	16
1.3.1.4 Permetilleme	17
1.3.1.5 Karbamat Oluşumu	17
1.3.1.6 Sülfamid Oluşumu	18
1.3.1.7 Fosfamid Oluşumu.....	19
1.4 AROMATİK AMİNLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN İZOLASYON YÖNTEMLERİ	 20
1.4.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	21

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.4.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	22
1.4.3 Katı Faz Ekstraksiyonu	22
1.4.4 Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (SPME)	23
1.5 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	23
1.5.1 Saç Boyalarında ve Saç Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	23
1.5.2 Çevre Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	26
1.5.3 Gıda Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	27
1.5.4 Biyolojik Sıvılarda <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	29
1.6 GAZ KROMATOĞRAFİSİ	30
1.6.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	32
1.7 ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ	33
BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
2.1 KULLANILAN CİHAZLAR	35
2.1.1 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS)	35
2.1.2 pH Metre	35
2.1.3 Vorteks	35
2.1.4 Ultrasonik Banyo	35
2.1.5 Santrifüj Cihazı	35
2.1.6 Saf Su Cihazı	36
2.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	36
2.3 KROMATOĞRAFİK SİSTEMİN ÖZELLİKLERİ VE ANALİZ ŞARTLARI	36
2.4 DENEYSEL İŞLEMLER	37
2.4.1 <i>o</i> -FDA ve Türevlerinin Sulu Çözeltiden İzolasyonu ve Analizi	37
2.4.2 Standart <i>o</i> -FDA'ların Türetilmesi	38
2.4.3 Standart 1 <i>H</i> -BT Türevlerinin Gaz Kromatografisinde Alıkonma Zamanlarının Tespit Edilmesi	38
2.4.4 Standart <i>o</i> -FDA'ların Türetme için pH Grafiklerinin Çizilmesi	40

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.4.5 Standart <i>o</i> -FDA'ların 1 <i>H</i> -BT Türevlerinin Ekstraksiyonu için pH Grafiklerinin Çizilmesi	40
2.4.6 Standart <i>o</i> -FDA'ların 1 <i>H</i> -BT Türevleri Olarak Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi	40
2.4.7 Geliştirilen Metodun Algılama Limitinin Belirlenmesi	41
2.4.8 Saç Boyalarında <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi	41
2.4.9 Boyanmış Saç Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi	41
2.4.10 Çevre Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi	42
2.4.11 Meyve Suyu Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi	42
2.4.12 Mide Suyu Örneklerinde <i>o</i> -FDA'ların Belirlenmesi	43
 BÖLÜM 3 DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	 45
 3.1 DENEYSEL SONUÇLAR	 45
3.1.1 Standart 1 <i>H</i> -BT Türevlerinin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi	45
3.1.2 Standart 1 <i>H</i> -BT Türevlerinin Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi	52
3.1.3 Standart <i>o</i> -FDA'ların Türetme İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	55
3.1.4 Standart 1 <i>H</i> -BT Türevleri İçin Optimum Ekstraksiyon pH Değerinin Belirlenmesi	56
3.1.5 Standart <i>o</i> -FDA'ların Örnek İçerisindeki Metot Geri Kazanımının Hesaplanması	57
3.1.6 Saç Boyası Örneklerindeki <i>o</i> -FDA ve Türevleri	60
3.1.7 Boyanmış Saç Örneklerindeki <i>o</i> -FDA ve Türevleri	65
3.1.8 Çevre Örneklerindeki <i>o</i> -FDA ve Türevleri	69
3.1.9 Gıda Örneklerindeki <i>o</i> -FDA ve Türevleri	75
3.1.10 Mide Suyu Örneklerindeki <i>o</i> -FDA ve Türevleri	79
3.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERMELER	83
 KAYNAKLAR	 87
 ÖZGEÇMİŞ	 97

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Mordant Orange boyar maddesinin aerobik ve anaerobik ortamda bozunma reaksiyonu.....	3
1.2 Fenilendiamin izomerleri (orto-, meta-, para-fenilendiamin).....	3
1.3 Aromatik amin ve aromatik nitro bileşiklerinin basitleştirilmiş metabolik yolu.....	8
1.4 Primer ve sekonder aromatik aminlerin açillenmesi.....	14
1.5 Aromatik amin, alkol ve karboksili asitlerin MTSFA kullanılarak silillenmesi reaksiyonu.....	16
1.6 Primer ve sekonder aromatik aminlerin dinitrolanması reaksiyonu	16
1.7 Aromatik aminlerden karbamat türevlerinin oluşumu.....	17
1.8 Tersiyer aromatik aminlerden karbamat türevlerinin oluşumu.....	17
1.9 Hinsberg metodu ile primer, sekonder ve tersiyer aromatik aminlerin ayrılması.	18
1.10 Primer ve sekonder aromatik aminlerin <i>o</i> -Ftaldialdehit ve dietiltiofosforik klorür ile seçici olarak türetilmesi.	19
1.11 Asidik ortamda nitrit ile <i>o</i> -fenilendiaminlerden benzotriazol oluşum reaksiyonu.	20
1.12 Katı Faz Ekstraksiyonu şematik gösterimi.	22
1.13 GC-MS sisteminin şematik olarak gösterimi.....	31
1.14 İyon kapanı analizörü için şematik diyagram.....	33
2.1 <i>o</i> -FDA'ların NO ₂ ⁻ ile türetme reaksiyonları.....	39
2.2 Çevre örnekleri, gıda örnekleri, saç boyası örnekleri, boyanmış saç örneklerive mide suyu örneklerindeki <i>o</i> -FDA'ların analiz yönteminin şematik olarak gösterilmesi.....	44
3.1 Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol türevleri karışımının GC-MS kromotogramı	47
3.2 4-M-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.....	48
3.3 1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.....	48
3.4 5-M-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.....	49
3.5 7-N-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu	49
3.6 a) 6-Cl-1 <i>H</i> -BT b) 5-Cl-1 <i>H</i> -BT ait kütle spektrumu.....	50
3.7 5,6-Cl-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 5,6-Br-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu	51
3.9 1 <i>H</i> -BT türevlerinin 0,1-5 µg/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.	53
3.10 1 <i>H</i> -BT türevlerinin 5-100 µg/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.	53
3.11 1 <i>H</i> -BT türevlerinin 0,1-5 ng/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.	53
3.12 Standart 1 <i>H</i> -BT'lerintüretme pH'ına karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik..	55
3.13 Standart 1 <i>H</i> -BT türevlerin ekstraksiyon pH'ına karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik.	56
3.14 Standart 1 <i>H</i> -BT türevlerin ekstraksiyon pH'ına karşı % pH verim değişimini gösteren grafik.	57
3.15 Saç boyası örneği GC-MS kromatogramı.	61
3.16 Saç boyası örneği GC-MS kromatogramı	61
3.17 Saç boyası örneğinde boyası örneğinde belirlenen 7-N-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu....	62
3.18 Boyanmış saç örneği GC-MS kromatogramı.....	66
3.19 Boyanmış saç örneği GC-MS kromatogramı.....	66
3.20 Boyanmış saç örneğinde belirlenen 1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.	67
3.21 Çevre örneği GC-MS kromatogramı.	70
3.22 Çevre örneği GC-MS kromatogramı.	71
3.23 Çevre örneğinde belirlenen 5-M-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.	71
3.24 Meyve suyu örneği GC-MS kromatogramı.	75
3.25 Meyve suyu örneği GC-MS kromatogramı.	76
3.26 Meyve suyu örneğinde belirlenen 4-Cl-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.....	76
3.27 Mide suyu örneği GC-MS kromatogramı	79
3.28 Mide suyu örneği GC-MS kromatogramı	80
3.29 Mide suyu örneğinde belirlenen 4-M-1 <i>H</i> -BT'nin kütle spektrumu.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 1,2-Fenilendiamin ve türevlerinin yapıları ve molekül ağırlıkları.....	5
1.2 Tipik bazı gaz kromatografisi dedektörleri ve algılama limitleri	31
2.1 GC-MS analiz şartları	37
3.1 Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol türevlerinin GC-MS’de alıkonma zamanlarının belirlenmesi.....	46
3.2 Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol türevlerinin kütle spektrumundaki temel pik, moleküler iyon piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri	52
3.3 Kalibrasyon işlemlerine ait (5-100 µg/mL) kalibrasyon denklemleri ve R ² değerleri....	54
3.4 Kalibrasyon işlemlerine ait (0,1-5 µg/mL) kalibrasyon denklemleri ve R ² değerleri....	54
3.5 Kalibrasyon işlemlerine ait (0,1-5 ng/mL) kalibrasyon denklemleri ve R ² değerleri....	54
3.6 Saç boyası örneklerine uygulanan metot için aminlerin geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri	58
3.7 Boyanmış saç örneklerine uygulanan metot için <i>o</i> -FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri	58
3.8 Çevre örneklerine uygulanan metot için <i>o</i> -FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri	59
3.9 Meyve suyu örneklerine uygulanan metot için <i>o</i> -FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri	60
3.10 Mide suyu örneklerine uygulanan metot için <i>o</i> -FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri	60
3.11 Saç boyası örneklerinde belirlenen <i>o</i> -FDA’lar ve konsantrasyonları	63
3.12 Boyanmış saç örneklerinde belirlenen <i>o</i> -FDA’lar ve konsantrasyonları	68
3.13 Çevre örneklerinde belirlenen <i>o</i> -FDA’lar ve konsantrasyonları	72
3.14 Meyve suyu örneklerinde belirlenen <i>o</i> -FDA’lar ve konsantrasyonları	77
3.15 Mide suyu örneklerinde belirlenen <i>o</i> -FDA’lar ve konsantrasyonları	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	: Dakika
eV	: Elektronvolt
R ²	: Korelasyon katsayısı
m/z	: Kütle/yük (m/e)
x	: Madde konsantrasyonu
M	: Molarite
M ⁺	: Molekül iyon piki

KISALTMALAR

pH	: Aktif hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
rt	: Alıkonma zamanı (Retention time)
NPD	: Azot-fosfor ısı dedektörü
BEHPA	: Bis-2-etilhekzilfosfat
EI	: Elektron darbe iyon kaynağı (electron impact)
ECD	: Elektro kemilüminesans dedektör
PFD	: Fosfor alev dedektörü
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
SPE	: Katı-faz ekstraksiyonu
SPME	: Katı-faz mikro ekstraksiyonu
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
mm ²	: Milimetre kare
BSA	: N,O-bis (trimetilsilil)asetamid
MBTFA	: N-metilbis(trifloroasetamid)
MSTFA	: N-metil-N-(trimetilsililtrifloroasetamid)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

MTBSTFA:	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(tert-butildimetilsilil)trifloroasetamid
ng	: Nanogram
TMS	: <i>N</i> -trimetilsilil
<i>o</i> -FDA	: <i>o</i> -fenilendiamin
ppb	: Milyarda bir birim ($\mu\text{g/kg}$, ng/g , $\mu\text{g/L}$)
ppm	: Milyonda bir birim(mg/kg , $\mu\text{g/g}$, mg/L)
PFA	: Pentafloroasetik anhidrit
SIM	: Seçici iyon monitörü
TFA	: Trifloroasetik anhidrit
UV	: Ultraviyole spektrofotometresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
1 <i>H</i> -BT	: 1 <i>H</i> -benzotriazol
DNBS	: 2,4–dinitrobenzen sülfonikası
DNFB	: 2,4–dinitroflorobenzen
LC	: Sıvı Kromatografisi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 AROMATİK AMİNLER

Aromatik aminler, amino grubunun ($-NH_2$) doğrudan doğruya aromatik halkaya bağlı olduğu bileşiklerdir. Aromatik hidrokarbonların yan zincirlerinde amino grubu içeren bileşikler genelde aromatik aminler arasında incelense de bunlar temelde aril süstitüe alifatik aminlerdir. Aromatik aminler, en basit yapılı anilinden; heterohalkalı yapıya veya birden fazla süstitüe gruba sahip oldukça kompleks yapıya kadar değişen aralıkta yer alabilmektedirler.

En basit aromatik amin olan anilin ilk kez 1826'da Unverdoben tarafından indigo boyar maddelerin kireç ile yapılan parçalayıcı distilasyonundan elde edilmiş olup ve bundan dolayı adını İspanyolca adı olan 'anil'den almaktadır. Anilin genel olarak nitrobenzenin indirgenmesinden elde edilmektedir.

Aminler nispeten zayıf baz olmalarına karşın alkil gruplarının elektron verme özelliğinden dolayı alifatik aminler amonyağa göre daha kuvvetli bazik özellik göstermektedirler. Bunun yanı sıra aromatik aminler alifatik aminlerden çok daha zayıf bazik özellik göstermektedirler. Aromatik aminlerin alifatik aminlerden daha zayıf baz olmalarının nedeni aromatik halkanın *p* orbitaline doğru azot atomu üzerindeki elektron çiftinin delokalizasyonundan yani bağ oluşumu için mevcut azot atomu üzerindeki elektron yoğunluğudur.

Aromatik halkaya bağlanan elektron verici süstituentler (CH_3 , OCH_3 , vb.) halkanın bazikliğini yükseltirken, elektron alıcı süstituentler (Cl , NO_2 , vb.) bazikliği azaltarak aromatik aminlerin bazikliğini etkilemektedir. Azot gurubuna göre aromatik halka üzerindeki süstituentlerin orto, meta ya da para yönlenmeleri baziklik üzerine etki ettiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Hehre 1986). Aromatik amin içeren halkaya metil grubunun para

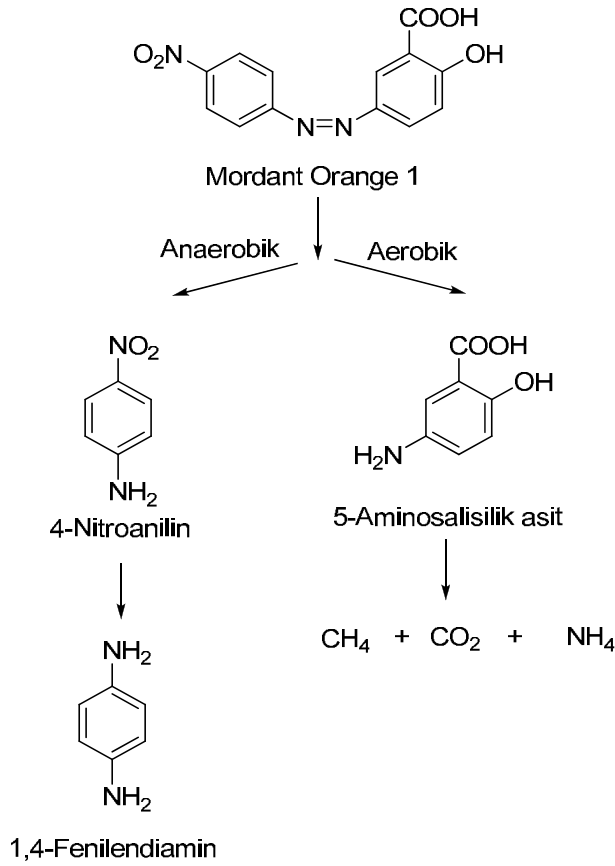
konumunda bağlanmasıyla bazlık en yüksek iken, orto konumunda bağlanmasında en düşük bazlık özellik gösterdiği belirtilmektedir (Fieser 1958, Motekaitis 1988).

Anilin ve türevleri gibi aromatik aminler, toksiteleri ve kanserojenik etkileri sebebiyle çevresel su kirleticilerinin en önemli kısımlarını oluştururlar. Sübstitüe aromatik aminler kimya endüstrisinde boyaların, pestisitlerin ve farmasotiklerin üretiminde çokça kullanılmaktadır. Sudaki çözünürlüklerinin yüksek olması sebebiyle toprak altına kolayca sızabilirler ve yer altı sularını kirletirler. Aynı zamanda meşrubat, şekerleme gibi ticari ürünler ve içme sularında belirlenebilir seviyede bulunabilirler (Singh et al. 2003).

Kalorisiz tatlandırıcılarda, içeceklerde ve çeşitli gıda ürünlerinde, kağıt, deri, kozmetik, ilaç, oyuncak, plastik, matbaa baskıları, tekstil gibi bir çok sanayide aromatik aminler ve aromatik amin kökenli azo boyaları kullanılmaktadır (Saurina and Hernández-Cassou 1999). Aromatik aminlere, tütün ve ürünlerinin yanması sonucu oluşan dumanlarda da rastlanılmıştır. Sigara kullananların mesane ve yumurtalıklarında aromatik amin eklenmiş DNA parçaları seviyesi belirgin bir şekilde yüksek çıkmıştır (Talaska 1994).

Fiziksel ve kimyasal özellikleri aromatik aminlerin yüklü ya da nötral halde bulunabilmelerini sağlamaktadır. Bu durum çevrede yol açtıkları zararlar üzerinde önemli etki göstermektedir. Birçok aromatik amin kanserojenik olarak sınıflandırılmaktadır. Dolayısıyla çevrede aromatik aminlerin belirlenmesi çeşitliliğin ve miktarlarının önlemlerinin alınmasında ve bunun için yeni tedavi teknolojilerinin gelişmesine yardım edebilir.

Aromatik aminlerin diazolanması ile oluşan azo boyar maddeleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, aerobik ortamda azo boyar maddelerin biyolojik bozunma ile zararsız birkaç bileşiğe dönüştükleri tespit edilmiş ve bununla beraber bu bileşiklerin anaerobik ortamda daha zararlı bileşiklere oluşturdukları belirtilmiştir (Pagga and Brown 1986, Donlon et al. 1997, Sparr Eskilsson et al. 2002). Tekstil ve deri sanayinde sıklıkla kullanılan Mordant Orange I azo boyar maddesinin muhtemel anaerobik ve aerobik bozunma reaksiyonları ve oluşan ürünler Şekil 1.1’de verilmektedir (Donlon et al. 1997).

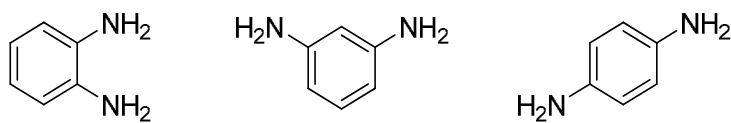


Şekil 1.1 Mordant Orange boyar maddesinin aerobik ve anaerobik ortamda bozunma reaksiyonu (Donlon et al. 1997).

Aromatik aminler kimyasal, tekstil ve deri fabrikaların atıklarıyla çevreye yayılabilmektedirler (Pinheiro et al. 2004). Aromatik aminler ve türevleri ağız yoluyla, solunum ve deri temasıyla vücuda alındığında insanlar için toksik özellik göstermektedirler. Söz konusu aminlerin bazıları çok düşük konsantrasyonda dahi kanserojeniktir (Scott 1962).

1.1.1 Fenilendiamin ve Türevleri

Fenilendiaminler, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$ formülüyle gösterilen, yapılarında bir aromatik halka ve bu aromatik halkaya bağlı iki amino grubuna sahip kimyasal bileşikler olarak tanımlanır. Amino grubunun yönlenmesine bağlı olarak orto, meta ve para olmak üzere üç fenilendiamin izomeri vardır ve bunlar genel olarak boyarmadde üretiminde kullanılmaktadır.



Şekil 1.2 Fenilendiamin izomerleri (orto-, meta-, para-fenilendiamin).

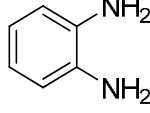
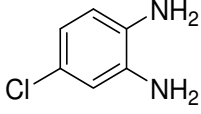
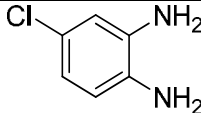
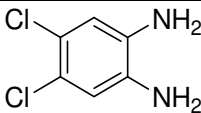
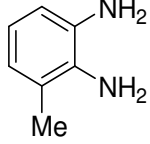
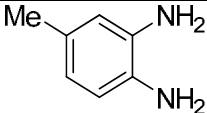
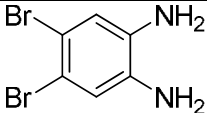
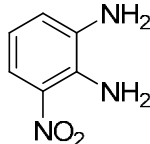
o-FDA (*o*-fenilendiamin) ve türevlerinin mutajenitesi ve toksikliğinin anilin, *p*-FDA (*p*-fenilendiamin) ve *m*-FDA (*m*-fenilendiamin) ile karşılaştırılması çalışmaları yapılmıştır. Anilin yüksek düzeyde toksik değildir, fakat başka bir amino grubunun orto ya da para konumunda eklenmesi ile toksikliği artar. *p*-FDA, *o*-FDA'dan daha toksik, *o*-FDA'nın *m*-FDA'dan daha toksik etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanında amino grubunun konumu mutajenik aktiviteyi de etkilemektedir. *o*-FDA ve *m*-FDA, test edilen değişik hayvanlarda *p*-FDA'den daha mutajenik olduğu belirlenmiştir (Chung 1995). Fenilendiaminlerin bazı çevre ortamlarında bulunmaları, mutajenik olmayan çevre kirleticilerinin mekanizmalar sonucunda mutajenik maddelere dönüştüğünün bir göstergesidir (Gichner et al. 2001).

Heterosiklik bileşiklerin sentezinde önemli bir başlangıç maddesi olan *o*-FDA, $C_6H_4(NH_2)_2$ kapalı formülüne sahip organik bir bileşiktir. Klor, nitro, metil, dikloro ve dibromo gibi farklı fonksiyonel grupların bağlanmasıyla oluşan *o*-FDA türevleri bulunmaktadır (Çizelge 1.1). Bu fonksiyonel grup farklılıkları *o*-FDA türevlerinin kimyasal özellikleri ve insan sağlığına etkileri üzerinde değişikliklere sebep olmaktadır.

o-FDA tuzları katı formda oksidasyona karşı kararlıdır. Ancak tuz formunda olmayan *o*-FDA katı ve sıvı halde hatta çözücü içinde kararsızdır. Oksijen ya da oksidant varlığında özellikle ışık altında kahverengi renkli oksidasyon ürünleri oluşmaya başlar. Sulu çözeltilerde *o*-FDA oksidasyon stabiliteleri artan pH değerlerinde amino gruplarının deprotonasyonun sonucu olarak artar. *o*-FDA ve türevleri birçok boyanın, pigmentin üretiminde ve mantar ilacı üretiminde ara ürün olarak kullanılmaktadır. Almanya'da 15 yıldan daha fazla süredir. *o*-FDA'ların saç boyasında kullanımları yasaklanmıştır. Buna karşın Japonya'nın yıllık *o*-FDA ihracatı ortalama 2307 tondur (Economy 2009).

o-FDA genel olarak pestisit, boya ve korozyon önleyici olarak kullanılan heterosiklik bileşiklerin sentezi aşamasında ara ürün olarak kullanılmaktadır. *o*-FDA ticari olarak % 99.3 ten daha yüksek saflıkta renksiz higroskopik kristal halde bulunabilmektedir. Safsızlıklar *m*-izomer ya da *p*-izomer olmak üzere % 0.2 olarak verilmektedir (BUA 1993).

Çizelge 1.1 1,2-Fenilendiamin ve türevlerinin yapıları ve molekül ağırlıkları.

Molekül Adı	Kısaltmalar	Molekülün Yapısı	Molekül Ağırlığı
1,2-Fenilendiamin	<i>o</i> -FDA		108,14 g/mol
4-Kloro-1,2-Fenilendiamin	4-Cl- <i>o</i> -FDA		142,59 g/mol
5-Kloro-1,2-Fenilendiamin	5-Cl- <i>o</i> -FDA		142,59 g/mol
4,5-Dikloro-1,2-Fenilendiamin	4,5-Cl- <i>o</i> -FDA		177,03 g/mol
3-Metil-1,2-Fenilendiamin	3-M- <i>o</i> -FDA		122,17 g/mol
5-Metil-1,2-Fenilendiamin	5-M- <i>o</i> -FDA		122,17 g/mol
4,5-Dibromo-1,2-Fenilendiamin	4,5-Br- <i>o</i> -FDA		265,93 g/mol
3-Nitro-1,2-Fenilendiamin	3-N- <i>o</i> -FDA		153,14 g/mol

Toksikolojik çalışmalarda ticari olarak bulunan *o*-FDA muhtemel oksidasyon ürünlerinin ortamda bulunması sebebiyle sarı ile koyu kahverengi arasında farklı renklerle karakterize

edilmektedir. Oksidasyon ürünlerinin varlığı *o*-FDA zararlı etkilerini ortadan kaldırmaz ve çalışmalar sırasında dikkate alınmalıdır.

o-FDA, polimerler ve ilaçlar gibi birçok endüstride ham madde olarak kullanılmasına rağmen en çok kullanım alanı boya endüstrisidir (Wang et al. 2008a). Aynı zamanda saç boyalarında, fotoğraf geliştirme ajanlarında, plastik endüstrisinde volkanizasyon hızlandırıcısı ve yakıt antioksidanları olarak kullanılırlar (Hazardous Substances Database).

Saç boyalarında herhangi bir reaksiyon gerektirmeden kalıcı ve yarı kalıcı saç boyalarında saça kahverengi, kırmızı ve parlak sarı renkleri veren 4-nitro-*o*-FDA birçok ülkede yasaklı olmasına rağmen boya içeriklerinde kullanılmaktadır (Cosmetology 1993). *o*-FDA, üzerinde bulunan ve biyolojik aktivite göstermesi olası olan azot içeren büyük halkalı yapılar sentezlemeyi sağlayan diamino kısmı sayesinde heterosiklik sentez yapan kimyacılar tarafından büyük ilgi görmüştür.

1.2 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ

Aromatik aminlerin insanlar üzerindeki kanserojenik etkisi ilk kez 1985 yılında Alman cerrah Ludwig Rehn tarafından boya endüstrisinde çalışan ve aniline maruz kalan erkekler arasında yüksek oranda üriner kanser oluştuğunun rapor edilmesiyle ortaya çıkmıştır (Ahlström et al. 2005). Aromatik aminlerin genetoksik ve kanserojenik etkilerinin nedeni, DNA moleküllerine bağlanabilecek reaktif ara ürünler veren ve *N*-hidroksilleme ile başlayıp esterleşme ve asetilleme gibi reaksiyonlar üzerinden devam eden biyolojik aktivasyon olarak belirtilmektedir (Pinheiro et al. 2004).

Fenilendiaminler mutajenik aromatik aminlerdir. Bu ajanlar üretim ve ilaç sektöründe ara ürün olarak kullanılırlar. Bu ajanların birçoğu bitkilerin mekanizmasında model bileşik olarak kullanılırlar (Pielesz 1999). Azo boyalarının R-NH₂ gruplarının açılarak indirgenmesi bu boyaların bozunma proseslerinden birisidir (Pielesz et al. 2002).

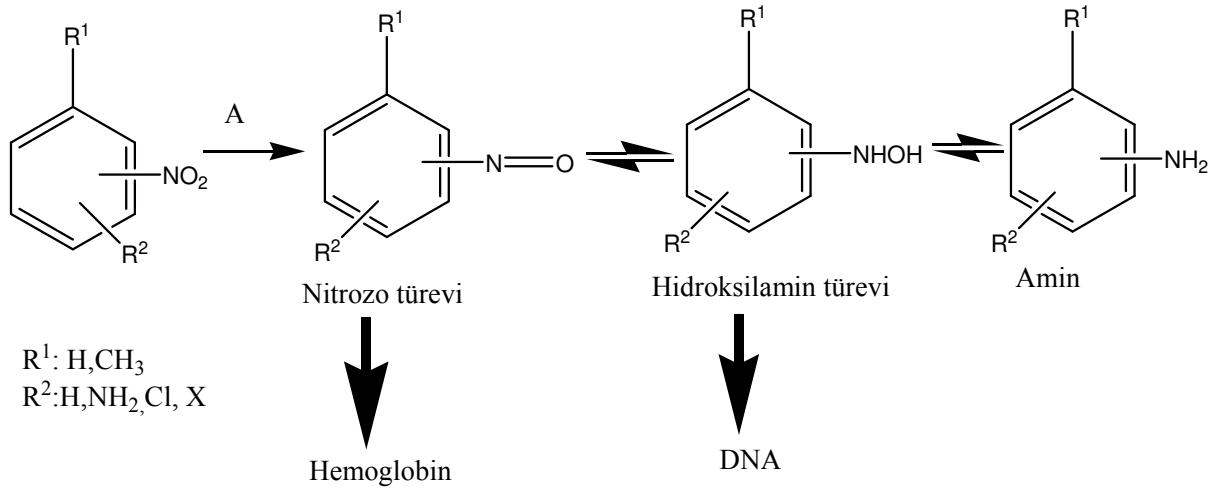
Tekstil ve boya sanayinde kullanılan azo boyar maddelerin anaerobik bakteriyel bozunması sonucunda *o*-FDA, 2-naftilamin, nitroanilin, *o*-toluidin ve anilin gibi kanserojen yapılar oluşmakta ve bu yapıların insan ve çevre sağlığını olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir (Garrigós et al. 2002).

Oksidasyon saç boyalarında bulunan alerjik reaksiyondan sorumlu olan bileşikler sentezve yıkım işlemleri sırasında oluşan bileşiklerdir. *o*-Nitro-*p*-FDA'daki *p*-TDA (Fregert et al. 1972), *p*-FDA'daki *o*-FDA ve *p*-FDA'daki 4,4-diamino benzen toksik kirliliklerinin alerjik etkiye neden oldukları anlaşılmıştır (Andri et al. 1995). Aynı zamanda kişide oluşan hassasiyetin sadece boyaya maruz kalan duyarlı bireylerde değil, bu boyalara mesleksel olarak temasta bulunan kuaförlerde de saptanmıştır (Marzulli 1978).

Kozmetolojistler, kuaförler ve güzellik uzmanları kısa süreli laboratuvar testlerinde potansiyel kanserojen olarak belirlenen, mutajenik aktiviteli diamino benzen, toluen, azo boyalarına, anilin boyalarına, fitalatlara ve halojenlenmiş çözücülere mesleksel olarak teneffüs ve deri yolu ile maruz kalmaktadırlar. Bu nedenlerle bu kişilerde mesleksel dermatit ve kanser vakaları gözlenmiştir (Babish 1991).

Mutajenik çalışmalar aromatik amin araştırmalarının çok önemli bir alanı olmuştur. DNA'ya eklenmeleri ve mutasyon başlattıklarının belirlenmesi bu bileşiklerin kanserojenliği hakkında kritik bilgiler vermektedir (Schut 1999). Spesifik DNA eklenme ürünleri olan aril aminlerin mutasyon çalışmaları hala aktif bir araştırma alanıdır (Colvin 1998, Burnouf and Fuchs 2000).

Çin ve Hindistan'da yapılan çalışmalar (BiW and Chein 1992, Rothman and Schulte 1996) benzidin ve benzer aromatik aminlerin izinsiz kullanımları hala sürdüğünü göstermektedir. Aynı zamanda aromatik aminler yan ürün olarak oluşmaktadır ve tütün dumanında bulunmaktadır (Talaska 1994). Aromatik aminler hücrelerde kanserin başlamasına öncülük etmektedir. İnsan vücudunda nitro dönüştürücü enzimler tarafından aromatik nitro bileşikleri çeşitli dönüşümler geçirerek aromatik nitrozo bileşiklerini oluşturmaktadır. Bu gruplar hemoglobindeki sistein'in, SH grubuna bağlanarak kanser oluşturmaktadır. Aromatik nitrozo bileşiklerinin diğer bir türü de aromatik hidroksil amindir. Bu bileşik azot iyonları ile direkt DNA'ya bağlanmaktadır. Bu dönüşümler Şekil 1.3'de gösterilmektedir. Kanser hastalarında yapılan araştırmalarda hastaların idrarlarındaki aromatik aminler ve aromatik nitro bileşiklerinin konsantrasyonun normalde bulunması gerektiğinden daha yüksek seviyelerde tespit edilmiştir (Weiss and Angerer 2002).



Şekil 1.3 Aromatik amin ve aromatik nitro bileşiklerinin basitleştirilmiş metabolik yolu.
 (A: Nitro indirgeyici enzim, B:Bağırsak bakterileri (Weiss and Angerer 2002)).

Yıllardır yapılan çalışmalar azo boyalarının mutajenik etkisini ortaya koymaktadır. Bu azo boyalarının insanlar için en büyük tehlikesi tükürük, ter ve mide sıvısıyla zararlı aromatik aminlere dönüşmeye yatkınlığıdır (Pielesz 1999). Azo boyalarının bozunma ürünü olarak yüksek mutajenik etkiye sahip FDA'lar oluşmaktadır (Pielesz et al. 2002).

1.2.1 Fenilendiamin ve Türevlerinin Toksikliği

Sözcük anlamı ile toksikoloji "zehir bilimi" demektir. Zehir ise "canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde" olarak tanımlanabilir. Ancak bugün bu tanımlar modern toksikolojinin sınırını ve içeriğini belirlemede yetersiz görülmektedir. Zehirlerin kaynaklandığı, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, canlı organizmada uğradığı değişim ve etki mekanizmaları, toksik dozları, zehirlenmelerin tedavileri, zehirlerin izolasyonu, nitel ve nicel analizleri, toksik maddelerin güvenceli kullanımı için risk analizleri modern toksikoloji'nin uğraş alanı içine girmektedir.

Aromatik aminler ve türevleri doğal kanserojen etkileri ve toksisiteleri nedeni ile önemli çevresel kirleticilerdendir (Singh et al. 2003). Bu nedenle mutajenik ve kanserojenik etkilerinden şüphelenilen aromatik aminler gibi çevresel konulara giderek artan bir ilgi mevcuttur.

Aromatik aminler kanser yapıcı ve toksik özelliklerinden dolayı çok düşük konsantrasyonlarda bile tehlike oluşturmaktadır (Dalane 1985). Saç boyalarındaki aromatik aminlerin kanserojen etkileri Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser araştırmaları uluslararası ajansı ve diğer otoriteler tarafından yayımlanmıştır (Van Duren 1980, IARC 1993, Talaska 2003).

o-FDA, farmasotik kimyada parasetamol ve dibazol gibi ilaçların sentezinde kullanılır. Bu ilaçlar etkili analjezik-antipretik (parasetamol), bağışıklık sistemi güçlendirici ve tansiyon düşürücü olarak kullanılırlar (Evgen'ev et al. 2002). *o*-FDA türevlerine maruz kalındığında kan, karaciğer ve akciğerin etkilendiği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Söz konusu maddelerin solunması halinde solunum yolları problemlerine, astıma ve deri iltihabına sebep olduğu belirtilmektedir (Jasmin 1961). *o*-FDA, yendiği, bulunduğu, göz ile teması durumunda zararlı bir bileşik olduğu yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir (Gichner et al. 2001).

Boya içeriklerinin birçoğu Amerika Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) tarafından test edilmiştir. NTP maddelerin potansiyel zararlarını ve insan sağlığına zararlarını araştırmak için kurulmuştur. Bu çalışmalarda prosedür farelerde ve tavşanlarda maksimum maruz kalma ile ilgili olarak maksimum izin verilmiş doza kadar günlük oral yoldan deneme şeklindedir. Gerçi bazı saç boyası içerikleri kanserojen olarak bulunmasına rağmen *o*-FDA, 2,4-TDA ve HC BLUE1 gibi içerikler kemirgenlerin kanserojen etkileri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalar sonucunda, *o*-FDA, 2,4-diaminofeniletanol, 2,4-diaminotoluen, 2-amino-4-nitrofenol, 2,4-diaminofeniletanol ve 2,4-diaminoanisol gibi kimyasal maddelerin kullanımı Avrupa Birliği ülkeleri tarafından yasaklanmıştır (Nohynek et al. 2004).

FDA'lar boya ve pigmentlerin üretiminde kullanılan ana aromatik amino bileşikleridir (Corbett 1999). Bu kimyasalların boya üretim endüstrisi çalışanların da kanser oluşum riskini artırmaktadır. *o*-FDA için yapılan toksikolojik çalışmalar bu maddelerin toksik, potansiyel kanserojen ve muhtemel hassaslaştırıcı olduğunu göstermiştir (Burnett et al. 1982, Chen et al. 2006). Mosley et al. (2008) tarafından yapılan çalışmalarda, *o*-FDA ve 4-Cl-*o*-FDA dişi Charles nehrî fareleri üzerinde kanserojenik etki gösterdiği görülmüştür. (Mosley-Foreman et al. 2008).

Yapılan benzer bir çalışmada, 4-Cl-*o*-FDA ve 4-kloro-*meta*-fenilendiaminin (4-Cl-*m*-FDA) her ikisi de fareler ve sıçanlar üzerinde kanserojen etkileri beslenme uygulanmasıyla denenmiştir. 4-Cl-*o*-FDA farelerde karaciğer kanserine ve sıçanlarda mesane kanserine sebep

olmuştur. 4-Cl-*m*-FDA fareler üzerinde etkisizken sıçanlar üzerinde de herhangi bir kanserojen etki göstermediği gözlenmiştir. 4-Cl-*o*-FDA metabolik aktivasyon sonrası Salmonella için mutajenik etki göstermesine karşın, 4-Cl-*m*-FDA için ise herhangi bir veri yoktur (CANCER 1982). Benzer bir çalışma Uluslararası Kansere Enstitüsü tarafından yapılmıştır. Araştırma sonucunda 4-Cl-*o*-FDA hayvanlar üzerinde kanserojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (US Department of Health 1978).

Serbest baz veya tuzu halinde akut toksitesi benzer olan *o*-FDA methemoglobin oluşmasına neden olmaktadır. Serbest baz haldeki ve dihidroklorit tuzu halindeki akut toksitesi benzerdir. Deri yoluyla maruz kalınan etki ağız yoluyla alınması halinde görülen etkiden daha düşüktür. *o*-FDA hayvanlarda deride iritasyona sebep olmazken gözde iritasyona yol açmaktadır. Buharına maruz kalındığında burun mukoza zarlarında hafif iritasyona sebep olduğu görülmüştür. Kobay fareleri üzerinde yüksek hassasiyeti yol açan *o*-FDA insanlarda da benzer etki gösterdiği görülmüştür. Spermlere olan etkisi yüksek bir dozun fareye verilmesi ile takip edilmiştir. Erkek fare üzerinde herhangi bir etki göstermezken hamile fare üzerinde embriyotik etkiler göstermiştir.

4-Cl-*o*-FDA bakteriler üzerinde güneş ışını ile eşzamanlı olarak test edildiğinde fotomutajenik etki göstermiştir. 4-Cl-*o*-FDA kendi başına da mutajeniktir (Ashby 1988, 1991) ve invitro çalışmalarda genotoksik olduğu gösterilmiştir (Dunkel and Rosenkranz 1985, Soler-Niedziela 1991). Farelerin her iki cinsiyeti içinde mesane tümörünü ve karaciğer kanserini tetikler (Suter 1998).

4-Cl-*o*-FDA boya üretiminde başlangıç maddesi olduğu için saç, deri ve gözle temas ihtimali yüksektir. 4-Cl-*o*-FDA'nın deriye absorpsiyonu hakkında herhangi bir çalışma olmamasına rağmen *o*-FDA gibi aromatik aminlerin deriye absorbe olduğu bilinmektedir (Feldmann 1970, Bronaugh 1984). Bu sebeple 4-Cl-*o*-FDA'nda *o*-FDA'ya benzer şekilde deriye nüfuz edeceği düşünülmektedir. Deriye bulaştığında, kaçınılmaz olarak ışığa maruz kalacak olan 4-Cl-*o*-FDA'nın toksik etkisi artacağı ve hızlı bir şekilde 2,3-diamino-7-klorofenazin dimerine dönüşeceği belirtilmektedir (Wang et al. 2008b).

o-FDA, Salmonella üzerinde yapılan mutajenik testlerde sadece metabolik aktivasyon sonrasında genotoksik etki göstermiştir. Karaciğer hücrelerinde DNA onarım sentezlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Metabolik aktivasyon ile birlikte memeli hücrelerinde kromozal

sapmalar görülmüştür. Metabolik aktivasyon varlığında hücre tipine bağımlı olan bir etki görülmemiştir. *o*-FDA in-vivo olarak da genotoksiktirler. Kemik iliğinde kromozal sapmalara ve sperm sayısal kromozomlarda sapmalara yol açtığı görülmüştür. Fareler üzerindeki kanserojenik etkisi hakkında kanıtlar vardır (2002). Bugün genetik toksikoloji testleri sadece potansiyel kanserojeniteyi tahmin etmekle kalmayıp, mutojenik zararları da tahmin etmeye çalışmaktadır. Bu testler maddelerin potansiyel kanserojenitesini tahmin için kısa süreli elemelerden geçirme çalışmalarını esas olarak göz önünde bulundurmaktadır. Bir maddenin genetik zararını ve mekanizmasını değerlendirmek için sıralı testler bazı çalışmalarda önerilmiştir. Bu testlerin vitro ve vivo testlerinin kombinasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Ashby et al. 1996, COM 2000, BGVV 2002).

Fenilendiaminler, tekstil atölyesinde çalışanların kanser riskini yükselten birçok bileşikten biridir. Ulusal Mesleki Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü potansiyel olarak 64000'den fazla insanın yedi adet fenilendiamine işyerlerinde maruz kaldıklarını belirlemiştir. Fenilendiaminler boya ve bunun gibi direkt olarak kullanıldığı renklendiriciler yoluyla bireysel olarak 15 milyon insanı etkilemektedir.

Kurullararası Test Komitesi (ITC) 50 FDA türevini Toksik Bileşikler Kontrol Hareketi (TSCA) genel envanterinde listelemiştir. Tüm FDA'ların kanserojen etkisinin araştırılması endüstri üzerinde belirgin bir ekonomik yük yüklemektedir. Yapısal karakterlerinden faydalanarak hangi kimyasalların daha kanserojen olduğunun belirlenebilmesi kullanışlı olabilecektir (Milman 1984).

1.3 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ

Fenilendiaminlerin eş zamanlı olarak ayrılmaları ve belirlenmeleri analitikçiler için ilginç ve zorlu bir konu başlığıdır. Fenilendiaminlerin belirlenmesi ve ayrılması için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), yüksek hızlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve miseller elektrokinetik kromatografi (MEKC), içeren bir dizi analitik metot geliştirilmiştir (Tanada 1991, 1994, Schnuch 1997, Lin 1999). Bu analiz metotları kullanılarak saç boyalarında, biyolojik sıvılarda çevre ve gıda örneklerinde çok düşük konsantrasyonlarda FDA'ların belirlenmesi mümkündür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada yeni bir MEKC metodu geliştirilerek saç boyalarında bulunan *o*-, *m*- ve *p*-FDA seviyeleri belirlenmiştir (Wu et al. 2011). Benzer bir çalışmada Meyer et al. (2009), biyolojik sıvılarda bulunan *p*-FDA ve

türevlerinin HPLC ile hassas bir şekilde analizini yapmıştır (Meyer et al. 2009). Wang et al. (2011), yaptıkları çalışmada ise GC-MS kullanarak kına dövmesinde FDA'ları belirlemeyi başarmışlardır (Wang and Krynitsky 2011). Yine de bu tekniklerin birçoğu pahalı ekipman, yetersiz seçicilik, komplike türevlendirme ve örneğin temizlenmesi için çok vakit kaybedilmesi gibi birçok dezavantaja sahiptir (Casella 2001).

Polaritelerinden dolayı aromatik aminlerin direkt analizleri için HPLC kullanılmaktadır. Aromatik aminlerin analizlerinde HPLC oldukça düşük pik kapasitesine sahip olduklarından dolayı birçok analitin tek bir kromatografik yürütmede belirlenmesi oldukça zordur. Bunun yanında UV dedektörü düşük hassasiyettedir. Özellikle gerçek numunelerin analizleri sırasında 230 nm'nin altında matriks girişimleri sebebiyle kantitatif olarak kullanılmaz. Gaz kromatografisi (GC) genellikle analitlerin birbirinden ayrılmasını sağlar. Aynı zamanda kolonun aktif bölgeleri sayesinde pik kuyruklanma probleminde önüne geçer. Bazı aromatik aminler GC ile tamamen ayrılmayabilir. Bu nedenle türetme işlemi uygulanmaktadır. Türetme genellikle perfloroaçılasyon ile yapılır ve elektron-yakalama dedektörü (ECD) ya da kütle spektrometresi (MS) ile dedekte edilirler (Schmidt et al. 1998). GC sıklıkla tercih edilmesinin diğer nedenleri ise analiz sürelerinin kısa olması, maliyetin düşük olması, yüksek ayırma gücüne ve hassasiyete sahip olmasıdır.

Anilin, fenilendiamin, difenilamin gibi birçok plastik endüstride poliüretan polimerleri üretiminde antioksidant ve antiozonant olarak kullanılan bu aminler çeşitli yollarla çevreye yayılmaktadırlar. Hava, atık su, sigara dumanı gibi çevre örneklerinde bulunan aromatik aminleri asit anhidrit ile türevlendirmiş ve ardından GC analizi ile analizlerini yapmıştır (Kataoka 1996).

Skarping et al. (1985), hava örneklerinde aromatik aminlerin GC-NPD (Nitrojen-fosfor dedektör) kullanarak belirlenmesi çalışmalarını yapmışlardır. Alkali etanol içine toplanan hava örneklerindeki aromatik aminler açılma ile amidlere dönüştürülerek analiz edilmiştir. Metodun algılama limiti 40-80 fmol olarak belirlenmiştir (Skarping et al. 1985).

Aromatik aminler polarlıklarından dolayı GC analizlerinde polaritelerinin azaltılarak kolonlara uygun hale getirilebilmeleri ve büyük molekül ağırlıklı aminlerin ise uçuculuklarının arttırılması için bazı türetme işlemleri gerekmektedir. Genellikle türetme işlemleri için açılma, sililleme, dinitrofenilleme ve karbamat oluşumu gibi yöntemleri

kullanılır. Türetme işlemleri uygulanmadan, duyarlı ve belirgin kromatografik analiz yapmak mümkün değildir (Sahasrabuddhey et al. 1999).

Aromatik aminlerin türetilmesiyle hem polariteleri azaltılmakta hem de uçuculukları fazla olan ve bu sebepten dolayı çevre analizleri çok güç olan düşük molekül ağırlıklı aminlerin uçuculukları azaltılmakta ve ayrılma gibi özellikleri de arttırılmaktadır (Terashi et al. 1990). Genel olarak gaz kromatografisi (GC) aminlerin analizinde yüksek çözünürlük gücü, yüksek hassasiyet, kısa analiz süreleri ve düşük maliyetinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Kataoka 1996). Bu çalışmada çeşitli örneklerde ki *o*-FDA'lar nitrit ile reaksiyonu sonucu oluşan triazol türevlerinin GC-MS analizleri yapılacaktır.

1.3.1 Aromatik Aminlerin Belirlenmesinde Kullanılan Türetme Reaksiyonları

Serbest aromatik aminlerin GC analizleri pik kuyruklanması ve kaybıyla sonuçlanan çözücünün kolona adsorbsiyonu ve bozunması sebebiyle yetersizdir. Türetme işlemi aromatik aminlerin pik kuyruklanmasını önlemek ve polaritelerinin azaltılması için gerekmektedir. Aynı zamanda aromatik aminlerin uçuculuğu, seçiciliği, hassaslığını geliştirerek bu aminlerin kolaylıkla ayrılmasını sağlar. Aromatik aminlerin türetme reaksiyonları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

1.3.1.1 Açılleme

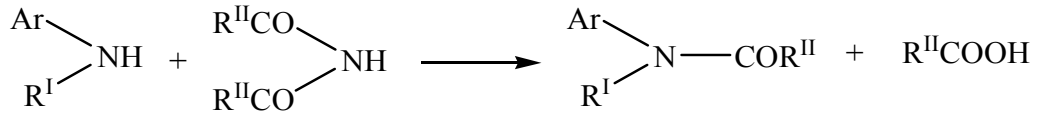
Açılleme yöntemi birincil ve ikincil aromatik aminlerin türetilmesinde kullanılan reaksiyonlar arasında en çok kullanılanlarından biridir. Temel olarak asit açıl klorürler, anhidritler, açilamidler ve açilimidazoller açılleme reaktifleri olarak kullanılır. Uygun koşullar sağlandığında bu reaktifler aromatik aminlerin amino gruplarıyla kolay ve hızlı bir reaksiyon vermektedir. 2003 yılında Brede ve arkadaşları 4,4-metilendianilin gibi aromatik aminleri trifloroasetik anhidrit (TFA) kullanarak sulu gıdalarda oluşan kanserojen anilini, GC-MS ile belirlemeyi başarmıştır.

Çevre örnekleri üzerinde çalışılırken aromatik aminlerin çok düşük konsantrasyonlarda olmaları ve özellikle fenolik ve karboksilik asit gruplu bileşiklerin fazla olması sebebiyle açılleme reaktifleri ile istenilen verim sağlanamamaktadır (Kataoka et al. 1996). Bunun yanında metabolitler üzerinde yapılan çalışmalarda pentafloroasetik anhidrit (PFA) kullanarak

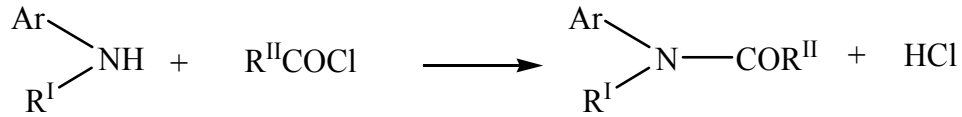
insan idrarında bulunan aromatik nitro bileşiklerinin metabolitleri olan aromatik aminler türetilmiş ve GC-MS kullanılarak 0,05 µg/l seviyesinde analiz edilmiştir (Weiss and Angerer 2002).

Karboksil, hidroksil ve amino gruplarının türetilmesinde türetme çok uçucu olarak bilinen N-Metil-bis-(trifloroasetamid) (MBTFA) kullanılmaktadır. Aynı zamanda MBTFA, hidroksiamino bileşiklerinin trimetil silillemesinden sonra azot grubunu açillemek içinde kullanılır. Açılleme reaksiyonları ile elektron yakalama özelliği olan bileşikler türetilebilir. Şekil 1.4’de birincil ve ikincil aromatik aminlerin açılleme reaktifleri ile reaksiyonları ve oluşan ürünler verilmiştir.

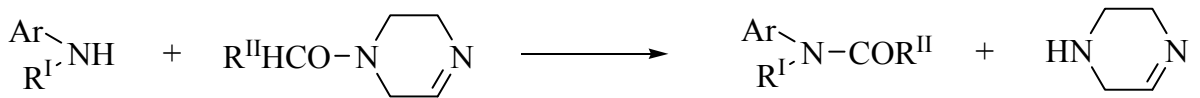
Asit anhidrit ile;



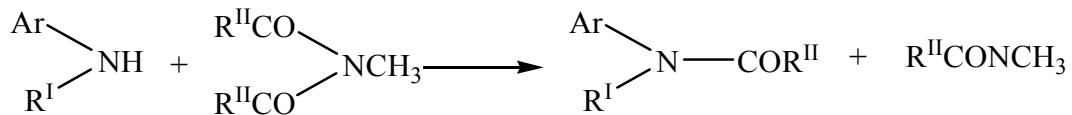
Açıl klorür ile;



Açilimidazol ile;



Açilamid ile;



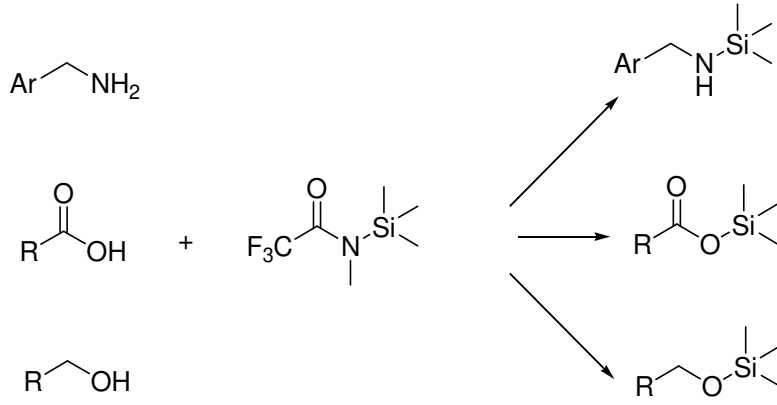
Şekil 1.4 Primer ve sekonder aromatik aminlerin açıllemesi.

Anhidrit ve açıl klorürlerle aromatik aminler arasındaki asit reaksiyonlarında reaktifin aşırısının ve ürün olarak oluşan asidin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Aksi takdirde bu

ürünler GC kolonuna zarar verebilir. Bu sebepten dolayı asidi ortamdan uzaklaştırmak ve bazik ortamda reaksiyonun ilerlemesini devam ettirmek için piridin, trimetilamin, trietilamin gibi bazlar kullanılır. Literatürde yapılan çalışmada kauçuk ürünlerindeki N-nitrozaminlere dönüştürüldükten sonra, ilgili amin bileşikleri asetik anhidrit ile türetilmişler ve GC-NPD ile analiz edilmişlerdir (Garrigos et al. 2002).

1.3.1.2 Sililleme

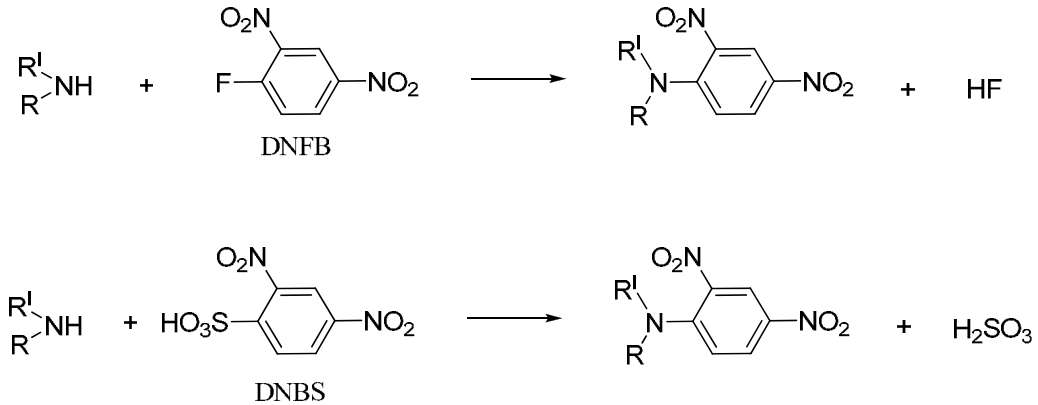
Sililleme genellikle süstitüe silil gruplarının (R_3Si) bir moleküle bağlanması reaksiyonudur. Amin gruplarının silil reaktifleri ile reaksiyona girme eğilimleri düşük olduğundan silil türevlerinin oluşması oldukça zordur. Bu türevlerin oluşabilmesi için reaktifin kuvvetli olması gerekir ve katalizör seçimine dikkat edilmelidir. Başlıca sililleme reaktifleri arasında *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid (MSTFA), *N,O*-Bis(trimetilsilil)asetamid (BSA), *N*-metil-*N*-(tert-butildimetilsilil) trifloroasetamid (MTBSTFA) ve pentaflorofenildimetilsilil örnek olarak verilebilir (Kataoka et al., 1996). Bu reaktifler reaksiyon eğilimleri fazla olmasına rağmen sadece amino grupları ile değil aynı zamanda hidroksil ve karboksil grupları ile susuz reaksiyon koşullarında da reaksiyon vermektedir. Birincil aromatik aminler, ikincil aromatik aminlere kıyasla daha iyi reaksiyon vermektedir (Skarping et al.,1989). Amino gruplarının türetilmesinden emin olmak için genellikle trimetilklorosilan eklenerek reaksiyonun tamamlandığı belirlenir. Bazı reaktiflerin nemde kararsız olmaları analizleri güçleştirmektedir. Kullanılan *N*-trimetilsilil (TMS) reaktifinin primer amin ile reaksiyonu sonucu mono ve di-TMS türevleri oluşmaktadır. Spyridaki et al. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada idrardaki efedrin, *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifloroasetamid (MSTFA) ile türetilerek (Şekil 1.5) GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Silil grubunun bir protonla yer değiştirilmesi sayesinde desililleme yapılarak silil grubu molekülden geri alınabilir.



Şekil 1.5 Aromatik amin, alkol ve karboksili asitlerin MTSFA kullanılarak silillenmesi reaksiyonu.

1.3.1.3 Dinitrofenilleme

Amin uçlu moleküllerin kromatografik analizlerde çalışılmak üzere belirlenmesinde 1945'te bulunan dinitroflorobenzen (DNFB) kullanılarak gerçekleştirilen yöntem hala geçerliliğini korumaktadır (Sanger 1945). Burada amino grubu N-2,4-dinitrofenil (DNP) vermek üzere nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu verir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Primer ve sekonder aromatikaminlerin dinitrolanması reaksiyonu.

DNBS suda çözünür ve DNFB türevleri de organik çözücülerde çözünmektedir. Türetme işleminden sonra türevler kolaylıkla çözücü ekstraksiyonu ile ayrılabilmekte ve reaktifin fazlası ortamdan uzaklaştırılabilir. DNBS ile yapılan türetme reaksiyonun en avantajlı yönü reaktifin amino grupları ile diğer gruplardan (hidroksil, tiol, imidazol) daha iyi reaksiyon vermesidir. Tüm bu avantajların yanında reaktifin deride kabarmalar meydana getirebilecek kadar tahriş edici olması dikkate alınmalıdır. Bununla beraber, bu reaksiyonların

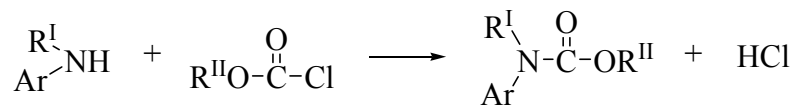
çok yavaş olması ve büyük miktarlarda kuvvetli alkali ortamlara ihtiyaç duyulması da bir dezavantaj oluşturmaktadır.

1.3.1.4 Permetilleme

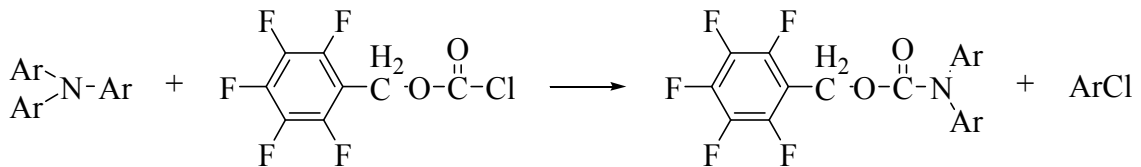
Bu yöntemde primer ve sekonder aromatik aminler sulu çözelti içerisinde formaldehit-sodyum borohidrit kullanılarak tersiyer aminlere dönüştürülmektedir. Bu yöntem poliaminlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Dalene et al. 1985). Permetillemede polar NH- gruplarının yerine alkil gruplar takılarak tersiyer aromatik amin oluşturulmaktadır. Bununla beraber tersiyer aromatik aminlerin yüzeyler üzerinde absorplama özelliklerinin fazla olmasından dolayı analizleri zor olmaktadır (Kataoka 1996).

1.3.1.5 Karbamat Oluşumu

Karbamat oluşumu aromatik aminlerin GC analizleri için türetilmesinde kullanılan en etkili metotlardan birisidir. Alkil kloroformat kullanılarak birincil, ikincil ve tersiyer aromatik amin türevleri elde edilebilir. Alkil kloroformat reaksiyonunda aromatik aminin azotuna bir tane alkil grubu eklenir (Şekil 1.7). Karbamat oluşturma metodunun en önemli avantajlarından biri metodun nemden etkilenmemesidir ve böylece sulu çözeltilerde de çalışılabilir (Ugland et al. 1997). Aynı zamanda alkil kloroformat kullanılarak tersiyer aromatik aminlerin türetilmesi de mümkündür (Şekil 1.8).



Şekil 1.7 Aromatik aminlerden karbamat türevlerinin oluşumu.



Şekil 1.8 Tersiyer aromatik aminlerden karbamat türevlerinin oluşumu.

Türetme reaktifi olarak kloroformatların kullanımı 30 yıl öncesine dayanmaktadır. İlk uygulamalardan biri Westley ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 1968'de metil

kloroformat kullanarak asimetrik amino ve hidroksil gruplarını türeterek GC ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir (Westley and Halpern 1968).

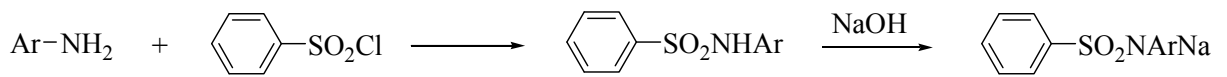
Bu reaktiflerle, aromatik aminlerin alkali sulu ortamdaki reaksiyonunun yüksek verimlilikte olması, reaksiyonun hızlı gerçekleşmesi ve aynı zamanda oluşan türevlerin GC-MS’de kolaylıkla aydınlatılabilmesi nedeniyle aminlerin türetilmesinde en yaygın kullanılan türetme reaksiyonudur (Hušek 1991).

1.3.1.6 Sülfoamit Oluşumu

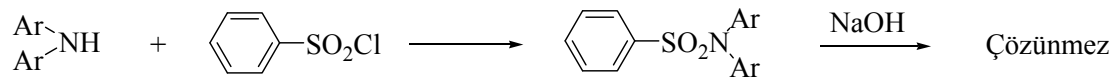
İlk olarak Hinsberg (1890), tarafından belirtilen aromatik aminlerin sülfonil klorür ile reaksiyonu farklı amin tiplerinin belirlenmesinde ve aydınlatılmasında sıkça kullanılmıştır (Kataoka 1996). Oda sıcaklığında alkali ortamda gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucu oluşan primer aromatik aminlerin sülfoamid türevleri alkali çözeltide çözünürken sekonder aminlerin türevleri çözünmez (Şekil 1.9).

Tersiyer aromatik aminler sülfonil klorürler ile reaksiyon vermezler. Benzensülfonil klorür (BSC) ve *p*-toluensülfonil klorür düşük molekül ağırlıklı primer ve sekonder aromatik aminlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

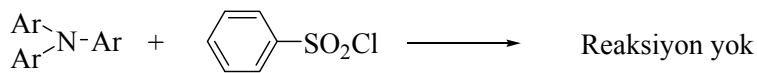
Primer aromatik amin



Sekonder aromatik amin



Tersiyer aromatik amin

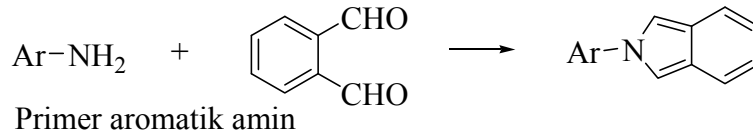
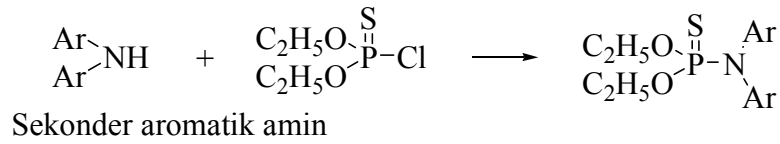


Şekil 1.9 Hinsberg metodu ile primer, sekonder ve tersiyer aromatik aminlerin ayrılması.

BSC kullanılarak türetme gerçekleştirilen bir çalışmada içme sularındaki organik bileşiklerin bozunma ürünleri olan aromatik aminler çok düşük konsantrasyonda belirlenebilmişlerdir (Knepper et al. 1999). Bu tür metotlarla birlikte trifloroasetik anhidrit (TFA) kullanılarak primer aromatik aminlerin BSC türevleri N-TFA-N-BS türevlerine dönüştürülebilir. Primer aromatik aminler için seçici olan bu metot sekonder aminlerin BS türevleri TFA ile reaksiyon vermediğinden sekonder aminler için kullanılmamaktadır (Kataoka et al. 1993).

1.3.1.7 Fosfoamit Oluşumu

Fosfoamit oluşum metodu ile aromatik aminler; dimetiltiyofosfinik klorür ile N-dimetiltiyofosfinik amitleri oluşturmaktadır. Primer ve sekonder aromatik aminlerin belirlenmesinde kullanılan *o*-ftaldialdehit ile primer aromatik aminler reaksiyon vermezler, bununla birlikte sekonder aromatik aminler de dietiltiyofosforil klorür ile reaksiyon vermemektedir (Şekil 1.10).

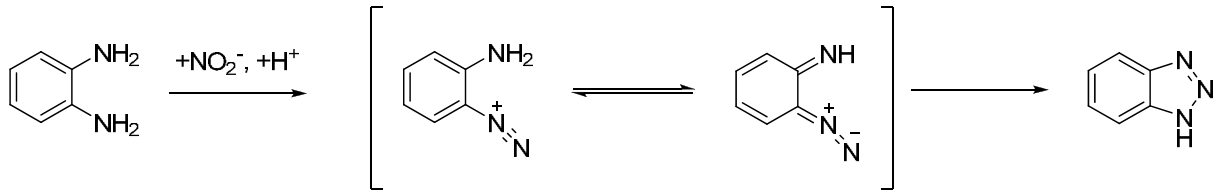


Şekil 1.10 Primer ve sekonder aromatik aminlerin *o*-ftaldialdehit ve dietiltiofosforik klorür ile seçici olarak türetilmesi.

Bu farklılık primer ve sekonder aromatik aminlerin ayrılmasında seçici bir avantaj sağlamaktadır (Kataoka et al. 1993, Kataoka 1996). Kuru ortam gerektirdiğinden bu metodun prosedürü çok uzun sürmektedir. Aynı zamanda bu reaksiyonlar ile N-nitrozoaminler hidrobromik asit ile dinitrozolanarak sekonder aminlere çevrilip dimetiltiyofosfinik klorür ile fosfoamid türevlerine dönüştürülürler.

Kataoka et al. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, çevrede ve sigara dumanında oluşan N-nitrozaminler sekonder aminlere dönüştürülerek N-dietiltiyofosforil ile türetilip gaz kromatografisi-fosfor alev dedektörü (GC-PFD) ile analizleri yapılmıştır.

Yapılan çalışmada *o*-FDA türevlerinin GC-MS analizlerinde pik kuyruklanmalarının önlenmesi, kolaylıkla ayrılabilmesi için sodyum nitrit ile asidik ortamda triazol türevleri elde edilecektir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Asidik ortamda nitrit ile *o*-fenilendiaminlerden benzotriazol oluşum reaksiyonu.

Saç boyalarında, gıda, biyolojik sıvı ve çevre örneklerinde *o*-FDA türevlerinin belirlenebilmesi için, 1*H*-benzotriazol türevlerine dönüştürülerek hassas ve duyarlı bir metot GC-MS metodu uygulanarak ortamdaki *o*-FDA türevlerinin miktarları düşük seviyelerde dahi belirlenmesi hedeflenecektir.

1.4 AROMATİK AMİNLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Analitiksel metotlar genel olarak miktarı düşük olan maddelerin belirlenmesi için geliştirilmektedir. Bu yüzden numune de bulunan analitin doğru bir şekilde ve madde kaybı yaşamadan alınması amaçlanmaktadır. Bu amaçla katı ve sıvı numuneler için farklı izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler numunede düşük miktarda bulunan analitin daha konsantre bir hale getirilmesini ve analiz işleminde ortamda en izole haliyle bulunmasını sağlamaktadırlar. Bu izolasyon teknikleri sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu ve katı faz mikro ekstraksiyonu olarak sınıflandırılabilir.

1.4.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon, sıvı içerisinde bulunan organik maddenin, bu maddeyi daha iyi çözen başka bir çözücü yardımıyla çözelti içerisinde izole edilmesi işlemidir. Birçok analizde ön konsantre işlemi olarak kullanılmaktadır (Puig and Barceló 1996). Çevre örneklerinde, biyolojik sıvılarda ve gıda örneklerinde bulunan çok düşük konsantrasyonda aromatik aminlerin analiz edilmesi oldukça zordur. Bunun için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi gibi ekstraksiyon yöntemleri kullanıp ortamdaki aminlerin izole edilerek istenemeyen diğer maddelerden kurtulup çok düşük seviyelerde analizi yapılabilir.

BEHPA (bis-etilheksilfosfat) ile yapılan iyon çifti ekstraksiyonu ile nehir suyu, deniz suyu ve atık su gibi çevre örneklerinden alifatik ve aromatik aminler organik faza izole edilerek türetme işlemine uygun hale getirilmiştir. Uygun pH bulunarak yüksek ekstraksiyon verimi ile 0,07 ng/l konsantrasyonunda maddelerin tayini dahi yapılabilir (Akyuz and Ata 2006).

Üzüm suyu ve şarap gibi gıda örneklerinden aromatik aminlerin izolasyonu için kloroform içerisinde iyon çifti reaktifi olarak BEHPA kullanılarak örneklerden izole edilmesi sağlanmıştır (Fernandes and Ferreira 2000). Biyolojik sıvılarda (kan, idrar ve mide suyu) düşük miktarlarda bulunan *p*-FDA'nın belirlenmesi için yapılan çalışmada doğrudan sıvı-sıvı ekstraksiyonu yoluyla *p*-FDA numuneden izole edilerek türetilmiş ve GC/MS ile 0,1 pg seviyesinde analizi gerçekleştirilmiştir (Stambouli et al. 2004).

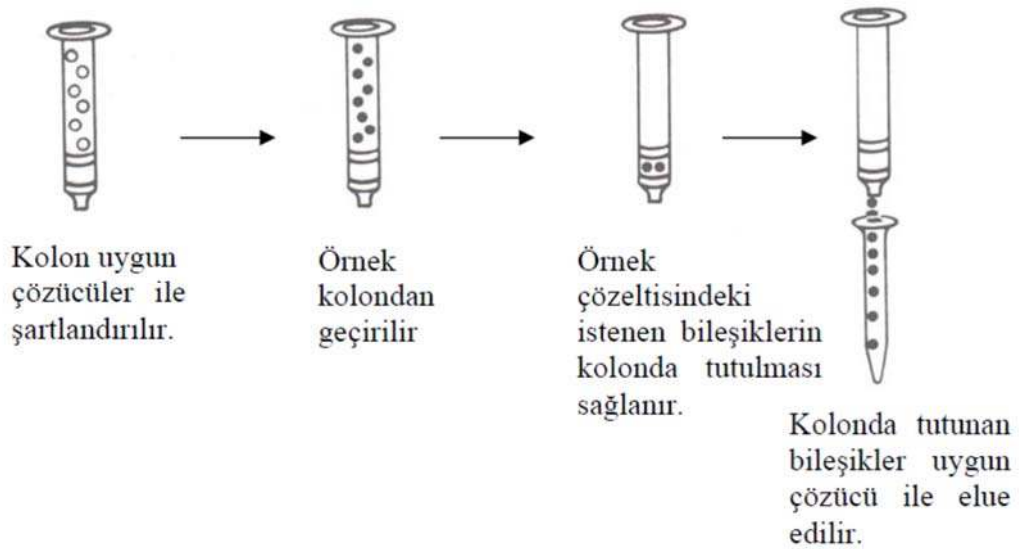
Weiss ve Angerer (2002) tarafından yapılan bir çalışmada aromatik nitro bileşiklerinin metabolitleri olan kanserojen bazı aromatik aminlerin belirlenmesi için idrar örneklerine pH ayarlaması yapılarak hekzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yardımıyla ortamdaki izole edilmiştir (Weiss and Angerer 2002). Yapılan benzer bir çalışmada sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak mesane kanserine yol açan aromatik aminler belirlenmiştir. Metodun algılama limiti 1 ng/l civarında bulunmuştur. Bu metotta da görüldüğü gibi sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi örneklerde çok düşük miktarda bulunan aromatik aminlerin tespiti için hassas bir izolasyon yöntemidir (Riedel 2006).

1.4.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu sokslet cihazı kullanılarak yapılabilmektedir. Bu yöntemi uygulayabilmek için ilk olarak katınının kurutulup, küçük parçalara ayrıldıktan sonra bu katı parçalar selülozdan yapılmış kartuş içerisine yerleştirilir. Bu kartuş ekstraksiyon kolonunun içine yerleştirilir. Cam balona çözücü olarak kullanılacak kimyasal madde konulur ve ısıtıcı yardımıyla maddenin buharlaşması sağlanır. Buharlaşan çözücü ekstraksiyon kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucuda yoğunlaşan çözücü tekrar ekstraksiyon koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan maddeyi çözer ve cam balona geri döner. İşte bu işlem sürekli tekrarlanarak ekstraksiyon tamamlanmış olur. Bu yöntem dip çamuru gibi çevre örneklerinden aromatik aminlerin analizi için kullanılabilir.

1.4.3 Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu çevre, gıda ve endüstri gibi birçok alanda kullanılan etkin ayırma ve deriştirme tekniğidir. Katı faz ekstraksiyonu, hızlı ve etkin bir örnek hazırlama tekniğidir. Hacmi mikrolitre ile birkaç yüz mililitre arasında değişen örnek çözeltileri, seçici dolgu maddeleri ile doldurulmuş kolonlardan geçirilir (Bhaskar et al. 2003). Örnek çözeltilerinde bulunan ve kolonda tutulan ilgili bileşikler, dolgu maddesinden uygun çözücü ile ekstrakte edilir. Katı faz ekstraksiyonunun şematik olarak gösterimi Şekil 1.12’de verilmiştir.



Şekil 1.12 Katı faz ekstraksiyonu şematik gösterimi (Baker 1984).

Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken önemli noktalar; analizi yapılacak maddenin bazı fizikokimyasal özelliklerine uygun absorbanın ve çözücünün belirlenmesidir. En çok kullanılan absorbentler alkil bağlı silikalar, apolar kopolimerler ve karbon esaslı absorbentlerdir. SPE bugün birçok farklı özellikteki bileşiklerin kimyasal analizinde tercih edilen bir metottur. Farmakoloji ve toksikoloji bilimleri kapsamında gıda numuneleri; su, toprak gibi çevresel; kan, serum, idrar gibi biyolojik örneklerdeki kirleticiler ile ilaç ve zehir analizleri SPE'nin en önemli kullanım alanlarıdır (Drummer 1999).

1.4.4 Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (SPME)

Katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi (SPME) son yıllarda uçucu bileşiklerin tayininde yaygın bir şekilde kullanılan hassas, ucuz ve hızlı sonuç veren bir ekstraksiyon tekniğidir. Uygun fiber yardımıyla çözücü kullanılmadan yapılan bir ekstraksiyon yöntemi olan SPME, organik maddeleri ya tepe boşluğundan ya da sıvı içerisine daldırarak doğrudan ekstrakte eder. Çevre örneklerindeki aromatik aminlerin belirlenmesi için yapılan çalışmada katı-faz mikro ekstraksiyon kullanılarak çok düşük miktarlarda anilin ve kloroanilinler tespit edilmiştir (Müller et al. 1997). Başka bir çalışmada su örneklerinde bulunan aromatik aminleri izole etmede katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Chang et al. 2003).

1.5 FENİLENDİAMİN VE TÜREVLERİNİN BELİRLENMESİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Fenilendiamin ve türevlerinin belirlenmesi ile ilgili literatürde yapılan bazı çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1.5.1 Saç Boyalarında ve Saç Örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Saç boyalarının kullanımı en az 4000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Örneğin; Mısırlı mumyaların saçları kına ile boyanmış olarak bulunmuştur. Roma imparatorluğu zamanlarında sirkeye batırılmış kurşun taraklar rutin olarak beyaz saçları karartmak için kullanılıyordu. Bugün, milyonlarca tüketici saç boyası kullanmaktadır. İnsanın tabiatındaki görünüşünü düzeltme isteğinde, bu ürünler önemli ve pozitif rol oynamaktadır. İnsan derisinin bazı maddelere karşı bir bariyere sahip olmadığının farkına varılması üzerine saç boyalarının ve içeriklerinin deriden nüfuz etmesi ile ilgili çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmalar özellikle

dermatite, genotoksiklik, mutojenite ve kanserojenlik üzerine yoğunlaşmıştır (Gerhard et al. 2004).

Saç boyalarına, boya üretiminde çalışanlar, saç boyama işleminde bulunan kuaförler ve saç boyası tüketicileri maruz kalmaktadırlar (Sardas et al. 1984). Saç boyası bileşikler deriden absorbe olup, maruz kalanların idrarlarında saptanabilmişlerdir (Kirkland et al. 1978).

Günümüzde insanlar görünümünde ve yaşam kalitesinde pozitif rol oynadığı için milyonlarca insan saç boyası kullanmaktadır. İnsanların sürekli temas halinde bulunmasından dolayı saç boyası içeriklerinin güvenilir olması gerekmektedir. Buna karşın ticari olarak kullanılan saç boyaları, FDA'ların ana maddesi olduğu kalıcı saç boyalarıdır. FDA'lar amin grubunun konumuna göre orto ve para konumunda sıklıkla saç boyalarında kullanılmaktadır (Sainthorant 1995). Saç boyası ürünlerinin deri tarafından absorplandığında ve vücut içerisinde çeşitli reaksiyonlar ile aromatik aminlere dönüştüğü birçok çalışmada belirtilmektedir (Weiss and Angerer 2002). Saç boyası kullanan iki bayanın idrarında benzer aromatik aminler tespit edilmiştir. Özellikle *o*-FDA'nın kaynağının çeşitli saç boyaları olduğu tahmin edilmektedir.

Akyuz ve Ata (2008) tarafından yapılan çalışmada, saç boyalarındaki *o*-FDA, 4-Cl-*o*-FDA ve diğer aromatik aminler iyon çifti ekstraksiyon yöntemi kullanılarak izole edilmiş ve izobutil kloroformat ile türevlendirildikten sonra kromatografik analizleri GC-MS ile yapmışlardır. Çalışmada farklı renk saç boyası, boyanmış saç ve kına örnekleri dikkate alınarak yapılan analizlerde birçok örnekte *o*-FDA ve 4-Cl-*o*-FDA bulunmuştur. 4-Cl-*o*-FDA şarap kıvıllı saç boyalarında, kıvıllı saç boyalarında ise *o*-FDA yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Bunun yanı sıra bu yöntem saç boyalarında bulunan çok düşük konsantrasyondaki *o*-FDA ve türevlerinin belirlenmesi için uygundur. Metodun algılama limiti 0,02-0,20 ng/g olarak belirlenmiştir (Akyuz and Ata 2008).

Saç boyalarında *o*-, *m*-, ve *p*-FDA belirlenmesi için yapılan bir çalışmada koyu renk saç boyalarındaki FDA türevlerinin konsantrasyonları kapiler zon elektroforez ile analizi sonucunda 10^{-7} mol/L olduğu belirtilmektedir (Dong et al. 2008).

Markland et al. (1966), yaptığı çalışmada 4-nitro-*o*-FDA kalıcı saç boyalarının içeriğinde bulunduğu tespit edilmiştir. Kırmızı gölge vermek için ve saç boyamada oksidasyon bazı olarakta 4-nitro-*o*-FDA kullanıldığı belirlenmiştir (Markland et al. 1966).

Wang ve Huang (2005), saç boyalarında bulunan ve kanserojenik etkiye sebep olan *o*-FDA, 4-M-*o*-FDA ve diğer FDA türevlerinin belirlenmesi için HPLC ile analizlerde karşılaşılan sorunlara çözüm bularak alternatif bir HPLC metodu geliştirmiştir. Aminler ile yapılan kromatografik analizlerde mobil fazı pH'sı önemli bir rol oynamaktadır. pH 8'e ayarlanan mobil faza trietilamin eklenerek aminlerden kaynaklanan pik kuyruklanmasının önüne geçilmiştir. Bu metot ile saç boyası örneklerinde bulunan *o*-FDA 0,28 µg/mL, 4-M-*o*-FDA ise 0.44 µg/mL seviyelerinde tespit edilebileceği önerilmektedir (Wang and Huang 2005).

Al-Tufail et al. (1996), geleneksel saç boyalarında kullanılan FDA'ları belirlemek için hızlı, hassas ve güvenilir bir metot geliştirmiştir. Saç boyası örneklerine ekstrakte işlemi uygulanıp, trifloroasetik asit ile türevlendirildikten sonra GC-MS analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre *p*-FDA birçok saç boyasında bulunurken, *m*-FDA sadece bir saç boyasında, *o*-FDA ise herhangi saç boyasında belirlenememiştir (Al-Tufail et al. 1996).

Zhou et al. (2004), saç boyaları üzerine yaptıkları çalışmada HPLC ile birlikte kemilüminesans dedektör (CL) ve diode array dedektör (DAD) kullanarak 30 aromatik aminin analizini yapmışlardır. HPLC-CL ile yapılan analiz sonuçları HPLC-DAD sonuçları ile karşılaştırıldığında CL dedektörü kullanıldığında daha hassas sonuçlar elde edildiği görülmüştür. HPLC-CL ile yapılan analizlerde saç boyalarında *o*-FDA 1,27-1,47 µg/mL aralığında belirlenmiştir (Zhou et al. 2004).

Bordin ve Rodriguez (1998), saç boyası içeriklerinde bulunduğu bilinen 4-nitro-*o*-FDA ve diğer saç boyası içeriklerinin ayrılması ve kantitatif analizi için ters faz HPLC metodu geliştirmişlerdir. Kantitatif ayırma ve içeriklerin belirlenmesi UV dedektörü kullanılarak alıkonma zamanlarından belirlenmiştir. Bu metotta ışık, sıcaklık ve antioksidan etkileri örnekler üzerine uygulanarak metot optimize edilmiştir. Metot saç boyası örnekleri üzerine uygulanmış ve metodun algılama limiti 0,11-2,88 µg/mL bulunmuştur (Pel et al. 1998).

1.5.2 Çevre Örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Çevrede bulunan aromatik aminler hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaların metabolik ara ürünleri olarak doğal olarak oluşabilmektedir (Terashi et al. 1990). Bunun yanı sıra boya, kozmetik, tekstil, tıbbi ürünler ve kimyasal madde yapımında oldukça kullanılan aromatik aminler çevreye farklı yollarla karışabilmektedirler. Özellikle bu tür endüstrilerin atık sularında bulunan aminler çevreye bilinçsizce deşarj edilmektedir (Palmiotto et al. 2001).

Aminler doğal kaynaklı olmasının yanında sigara dumanı, otomobil eksozları, çeşitli endüstri atıkları, kanalizasyon, atık yakma gibi antropojenik kaynaklı sularda ve atmosferde bulunabilmektedir (Kataoka 1996).

Sun et al. (2009), sanayi atık suları ve nehir suları üzerinde yaptıkları çalışmada *o*-FDA'nın belirlenmesi için metot geliştirmiştir. Bu metot su örneklerinin 0.22 µm filtrede geçirildikten sonra kapiler elektroforez ile *o*-FDA'nın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Geliştirilen metot ile *o*-FDA 5×10^{-8} mol/l (5,4 µg/l) konsantrasyonlarında dahi belirlenebilmiştir (Sun et al. 2009).

Akyuz ve Ata (2006) tarafından nehir suyu, deniz suyu ve atık sularda *o*-FDA, 4-M-*o*-FDA ve amin bileşiklerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, *o*-FDA ve 4-M-*o*-FDA bis-2-etilhekzilfosfat (BEHPA) ile iyon çifti reaksiyonu yapılarak kloroform fazına alınıp izobutil kloroformat ile türetilerek GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Bu geliştirilen metot ile çevre örneklerinde algılama limiti *o*-FDA için 0,28 ng/l, 4-M-*o*-FDA için 0,08 ng/l olarak belirlenmiştir (Akyuz and Ata 2006).

o-FDA'lar bazı türetme güçlüklerine de yol açabilmektedirler. Schmidt et al.(1998), patlayıcı madde üreten fabrikanın atık sularında *o*-FDA ve 55 aromatik aminin belirlenmesi için geliştirdikleri seçici bir gaz kromatografisi metodunda *o*-FDA'ları analiz edememişlerdir. Bunun nedeni iyodobenzen kullanarak yaptıkları türetme işlemi sırasında diazolanma amacıyla kullanılan nitrit ile *o*-FDA'ların benzotriazol oluşturmaya sebep olmasıdır (Schmidt et al. 1998).

Shelke et al. (2005), *o*-FDA ve 8 kanserojenik aminlerin göl sularında analizleri için sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Sıvı kromatografisi için kolon seçimi, mobil faz ve akış hızları

parametreleri göz önünde bulundurularak belirlenen metot örneklerle uygulanmış ve metodun en düşük algılama limiti *o*-FDA için 24 nM/l bulunmuştur (Shelke et al. 2005).

Kuz'mina et al. (2008), atık su ve doğal sulardan aminlerin analizi için GC-MS sistemi kullanmışlardır. Sulardan toluen ile ekstrakte edilen aminler çözücü uçurulduktan sonra N-metil-bis(trifloroasetamid) ile türevlendirilme işlemi yapılmıştır. Türevlendirilen aminler hekzan içerisinde çözünüp, GC-MS analizleri ile belirlenmişlerdir. Metodun algılama limiti 50 ng/l olarak bulunmuştur (Kuz'mina et al. 2008).

Singh et al. (2003), çevre suyu örneklerinde aminleri belirlemek için geliştirdikleri metotta aminlerin allil izotiyosiyanat ile türevlendirdikten sonra GC-MS analizleri yapılmıştır. Bu kullanılan yöntem ile 0,5-50 µg/l aralığında aminler belirlenmiştir (Singh et al. 2003).

Kago et al. (1980), çevre örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada çeşitli endüstrilerin atık sularını ve bu atık suların karıştığı nehirler içerisinde bulunan alifatik ve aromatik aminleri belirlemek için metot geliştirmişlerdir. Aminler dinitrofenil ile türevlendirilmiştir ve bu örneklerin analizi GC-MS ile yapılarak yapıları aydınlatılmıştır. Geliştirilen bu metot ile 1-3 ppb konsantrasyonlarında aminler belirlenmiştir (Kago et al. 1980).

Müller et al. (1977), yaptıkları benzer çalışmada çeşitli kimya sanayilerinin ara ürünleri veya yan ürünleri olarak oluşan ve atık sular ile çevreye karışan aromatik aminlerin belirlenebilmesi için su örneklerinden aromatik aminlerin ekstraksiyonu ve yapılarının GC-MS ile aydınlatılmasını içeren bir metot geliştirmiştir. Bu çalışmada katı faz ekstraksiyonu kullanılarak su örneklerinden izole edilen aromatik aminleri 0,05-0,23 µg/l konsantrasyon aralıklarında GC-MS ile belirlenmiştir (Müller et al. 1997).

1.5.3 Gıda Örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda boyaları, içecek ve yiyecekleri renklendirme de boyar madde olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Renklendirici özelliğinden dolayı gıda boyaları gibi ürünlerde kullanıldığı bilinen *o*-FDA gıda içerisinde bulunması muhtemeldir.

1800'lü yıllarda güvenilirliğine dair bilgi olmaksızın yaygın olarak kullanılan sentetik boyalar, gıdaların işlem görmeleri sırasında kaybolan doğal renginin sağlanması veya doğal olarak

renksiz olan gıdaların tüketiciler üzerindeki çekiciliğini artırmak için kullanılabilirler (Tripathi et al. 2007). Bununla birlikte bu tür sentetik boyaların gıdalarda ve içeceklerde kullanımına yasalarca belirli limitler getirilmiştir. Limit değerler, gıda türüne ve boyar madde yapısına bağlı olarak değişen belirli aralıktadır (Chanlon et al. 2005).

Gıdalarda aminlerin ekstraksiyonu için perklorik asit (HClO_4), trikloro asit (TCA), hidroklorik asit (HCl) gibi asitler ve metanol gibi organik çözücüler en çok kullanılan kimyasallardır (Moret 1992, Straub 1993). Girişim yapan maddeler nedeniyle, ilave ekstraksiyon basamakları gerekebilmektedir (Shalaby 1996).

Shelke et al. (2005), tarafından gıda boyalarında *o*-FDA'nın belirlenmesi için yapılan çalışmanın temeli gıda boyasının (Sunset Yellow FCF) borat tamponunda çözülüp, katı faz ekstraksiyonu ardından HPLC analizine dayanmaktadır. HPLC ile yapısı aydınlatılan gıda boyasındaki *o*-FDA'nın 0,49 nM/l konsantrasyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Metodun verimi %92,5-97,9 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar gıda boyası örneklerinde metodun uygulanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Shelke et al. 2005). Sunset Yellow FCF gıda boyası, sarı renklendirici olarak unlu gıdalar, pasta, tatlı, çerez, dondurma, içecek ve konserve balık, hazır çorba ve bazı şurup cinsi ilaçların üretiminde kullanılmaktadır.

Fernandes ve Ferreira (2000), Portekiz şarabı ve üzüm suyunda bulunan diaminleri BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonu yaparak organik faza geçmeleri sağlanmıştır. Daha sonra 0,1M HCl geri ekstraksiyon yapılarak sulu faza alınan diaminler su kısmı uçurularak kuru fazda heptafloro asetikanhidrit ile türetme işlemi yapılmıştır. En düşük algılama limiti 10 µg/l. olan metot gıda örneklerinde diaminleri belirlemek için kullanılabilir (Fernandes and Ferreira 2000).

Fernandes ve arkadaşları daha önce yaptıkları bir çalışmada şarap ve üzüm suyunda diaminlerin belirlenmesi için çok duyarlı ve hızlı bir metot geliştirmişlerdir. Aminler daha önceden dealkolize edilmiş örneklerden kloroformda çözünmüş BEHPA ile ekstrakte edilmiş ve 0,1 M HCl ile geri titrasyonları yapılmıştır. Son olarak gerekli heptaflorobütirik türevlere dönüştürülerek GC-MS ile analiz edilmişlerdir (Fernandes and Ferreira 2000).

Skog et al.(1998), gıda örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada, gıda örneklerinin yanlış ısıtma işlemleri sonucunda kanserojen ve mutajen heterosiklik aminlerin oluşumuna neden olduğunu

belirlemişlerdir. Gıda örneklerinden aminleri belirlemek için katı-faz ekstraksiyonu ile izole edilen aminlerin yapıları GC-MS ile aydınlatılmıştır. Bu çalışmada gıda örneklerinde aminler 0,03-0,2 ng/g seviyede tespit edilebileceği önerilmiştir (Skog et al. 1998).

1.5.4 Biyolojik Sıvılarda *o*-FDA'ların Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Biyolojik sıvı örneklerindeki amin bileşikleri çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda dışarıdan vücuda alınan veya vücut içerisinde oluşan amin bileşikleri ve metabolitlerinin çeşitli sağlık problemlerine sebep olduğu tespit edilmiştir (McKenna et al.1993, Jacometo et al. 2005). Kanserin gelişmesinde rol oynayan en büyük insan kaynaklı risk faktörü, biyoaktif alifatik ve aromatik aminlerin plazma ve idrarda bulunmasıdır.

Stambouli et al. (2004), tarafından yapılan çalışmada kan, idrar ve mide suyu gibi biyolojik sıvılarda *o*-FDA'nın izomeri olan *p*-FDA kantitatif ve kalitatif belirlenmesi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Bu analitik metot biyolojik sıvıların hidrolizi, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve trifloroasetikasit (TFA) ile türevlendirilip GC-MS ile yapılarının aydınlatılmasına dayanmaktadır. İç standart olarak benzidin kullanılan metodun ekstraksiyon verimi % 85, en düşük algılama limiti ise 0,1 pg olarak belirlenmiştir (Stambouli et al. 2004).

Wang ve Tsai (2003), saç boyası kullanılan bayanların idrar örneklerinde FDA'ların belirlenmesi için geliştirdikleri metotta saç boyama işlemi yapılmadan önce ve yapıldıktan 48 saat sonra idrar örneklerini biriktirmişlerdir. İdrar örnekleri deprotenize edilip, diklorometan ile ekstraksiyon işleminin ardından elektrokimyasal dedektör kullanarak LC ile yapıları aydınlatılmıştır. Analiz sonuçları boyama işlemi yapılmadan önce ortamda FDA yok iken boyama işleminde 48 saat sonra FDA türevi olan *p*-FDA idrar örneklerinde bulunmuştur (Wang and Tsai 2003). Bu çalışma doğrultusunda saç boyası içeriklerinde sıklıkla kullanılan *o*-FDA'ların saç boyası kullanan bayanların idrarında olması muhtemeldir.

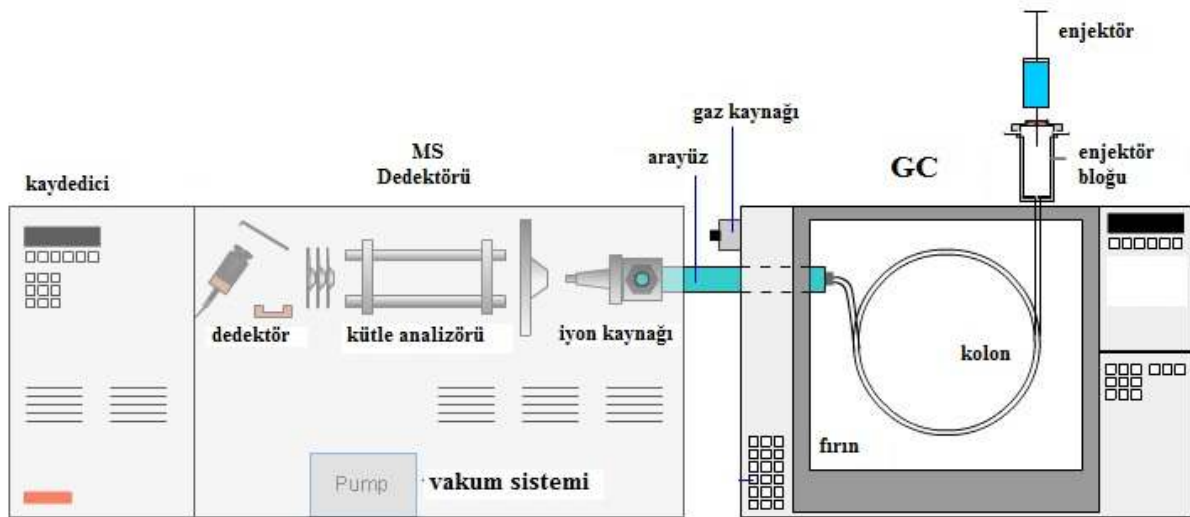
Korös et al. (2007), biyolojik sıvılarda aminlerin belirlenmesi için yeni bir metot geliştirmiştir. Bu metotta perklorik asit ile deprotenize işleminin ardından, aminlerin *o*-fitaldehit/etantiyol/florenilmetilkloroformat türevleri elde edilmiştir. Bu türevlerin UV ve floresans (FL) dedektör kullanılarak HPLC analizleri yapılarak aminler belirlenmesi amaçlanmıştır. Relatif standart sapması 2,6 olan metodun numuneler üzerinde tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görülmektedir (Körös et al. 2007).

Meyer et al. (2009), biyolojik sıvılarda FDA'ların belirlenmesi için yaptıkları çalışmada HPLC-UV-ECD metodu ile örneklerin analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Metodun avantajı örneklerle herhangi bir önışlem uygulanmamasıdır. Bu metot ile *p*-FDA örneklerde 0.25 ve 20 µM aralığında bulunmuştur (Meyer et al. 2009).

1.6 GAZ KROMATOĞRAFİSİ

Hareketli fazın mutlaka gaz, hareketsiz fazın ise ya bir adsorban veya aktif bir adsorban üzerine kaplanmış sıvı olduğu kromatografik yöntem "gaz kromatografisi" denir. Hareketli faz He, N₂ veya Ar gibi bir gaz olup taşıyıcı gaz olarak tanımlanır. Sabit fazın türüne göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır. Gaz-Katı kromatografisi, bu kromatografide de iki faz vardır. Sabit faz olarak yarıçapı küçük uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddeleri, hareketli faz olarak da dolgu maddelerinin arasından kolaylıkla geçebilen gaz kullanılır. Gaz-Sıvı Kromatografisi, burada sabit faz, gaz-katı kromatografisindeki geniş yüzeyli dolgu maddelerine emdirilmiş bir sıvı (yüksek mol kütleli polimerler) ve hareketli faz gazdır. Genel olarak gaz-sıvı kromatografisi sıklıkla kullanılmaktadır.

Gaz kromatografisinde, ayırımı istenen karışım, bir enjektör yardımıyla enjeksiyon kısmına enjekte edilir. Enjektör bölümü ısıtılmış durumdadır, karışım hemen buharlaşır ve buhar halinde inert taşıyıcı gaz ile birlikte kolona girer. Kolonda her bileşik kaynama noktasına, molekül büyüklüğüne ve kolondaki sabit faz ile etkileşimine bağlı olarak kolonda farklı hızlarda ederek devamlı taşınırlar ve böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Kolondan çıkan her bir bileşen dedektöre girer, dedektörde bileşenlerin miktarı ile orantılı olarak belirlenir ve kaydedicide grafik olarak çizilir. Her bileşik alıkonma zamanı ile belirlenir. Alıkonma zamanı bir bileşiğin enjekte edilmesinden dedektörden çıkışına kadar geçen süredir. Bu süre her bileşik için farklıdır. GC-MS sistemi şematik olarak Şekil 1.13'de gösterilmiştir.



Şekil 1.13 GC-MS sisteminin şematik olarak gösterimi (www.chromacademy.com).

Bir gaz kromatografisi dedektörü kromatografik işlem uygulanan bir karışımdaki bileşenleri süratle ve hassasiyetle algılayabilen bir ayardır. Herhangi bir anda, taşıyıcı gazdaki madde konsantrasyonu sadece binde birkaç seviyesindedir ve dedektör bunun çok altındaki değerleri algılayabilecek kapasitede olmalıdır. Gaz Kromatografisinde kullanılan dedektörler, alev iyonlaşma dedektörü (FID), ısı iletken dedektörü (TCD), kükürt kemilüminesans dedektörü (SCD), elektron yakalama dedektörü (ECD), atomik emisyon dedektörü (AED), alev fotometrik dedektörü (FPD), kütle dedektörleri (MS)'dir. Sıklıkla kullanılan bazı dedektörler, uygulama alanları ve hassasiyetleri Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 Tipik bazı gaz kromatografisi dedektörleri ve algılama limitleri.

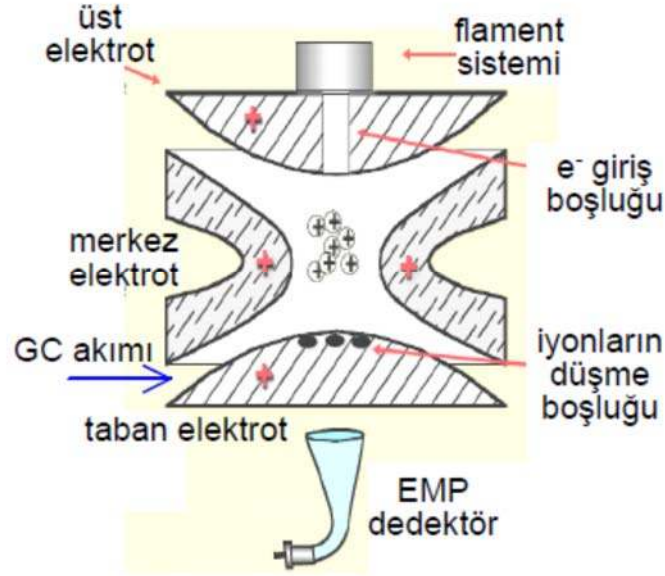
Dedektör Tipi	Uygulanabilir Örnek	Algılama
Termal iletkenlik (TCD)	Evrensel	500 pg/mL
Alev iyonizasyon (FID)	Hidrokarbonlar	1 pg/s
Nitrojen fosfor (NPD)	N, P içeren örnekler	P: 10^{-12} , N: 10^{-11} (g/mL)
Elektron yakalama (ECD)	halojenli hidrokarbonlar	5 fg/s
Atomik emisyon (AED)	element seçici	1 pg
Fotoiyonizasyon (PID)	gaz ve buhar bileşikler	0.002-02 µg/L
Kütle spektrometre (MS)	ayarlanabilir örnek	0.25-100 pg

1.6.1 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

GC-MS kompleks karışımların ayrılmaları, belirlenmeleri ve tayinlerinin yapıldığı bir tekniktir. Bu teknik gaz kromatografisinin sonuna kütle spektrometresi yerleştirilmesiyle oluşturulur. Molekül kütlesi düşük olan yüzlerce bileşiğin analizi için GC-MS idealdir. Bir bileşiğin GC-MS analizi için termal kararlılığı ve yeterli uçuculuğu olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra fonksiyonel grup içeren bazı bileşikler için adsorpsiyon probleminin önlenmesi için türevlendirme işlemi yapılması gerekmektedir.

Kütle spektrometre dedektörler, tüm gaz kromatografisi dedektörleri arasında en güçlü olanlarıdır. Bir GC-MS sisteminde ayırma boyunca, kütle spektrometresi sürekli olarak kütleleri tarar. Örnek kromatografi kolonundan çıktığında bir transfer hattından geçerek kütle spektrometrenin girişine gelir; burada bir elektron-impakt iyonlaştırma kaynağı tarafından iyonlaştırılır ve fragmanlara ayrılır. Bu işlem sırasında örnek enerjili elektronlarla bombardıman edilir ve elektrostatik kuvvetler molekülün elektron kaybederek iyonlaşmasını sağlar. Bombardımanın iletilmesi iyonların fragmanlara dönüşmesine neden olur. Kütle analizörüne giren iyonlar burada m/z (kütle-yük oranı) değerlerine göre sıralanırlar. İyonların çoğu tek değerlidir.

Sistemde, kromatogram alıkonma zamanlarını belirler, kütle analizörü de piklerden, karışımda ne tür moleküllerin bulunduğunu saptar. Kullanımı en yaygın olan kütle analizörü, gaz anyon ve katyonların, elektrik ve magnetik alan vasıtasıyla uzun süre tutulmasını sağlayan iyon-kapanı analizördür (Şekil 1.14). İyon kapanı analizöründe üç elektrot bulunur. Merkez elektrot halka; üst ve taban elektrotlar yarım küre şeklindedir. İyonizasyon ve kütle analizi aynı yerde gerçekleşir. Ayrılan iyonlar bir iyon dedektörüyle ölçülür; kullanımı en yaygın olan dedektör, iyon dedektörü olan elektron multiplierlerdir. Kısaca, GC-MS karışımdaki bileşenler önce GC' de ayrılır ve daha sonra arda arda kütle detektörüne ulaşırlar. Kütle detektörüne ulaşan analit iyonlaşma odasına sürüklenerek elektron bombardımanına tutulur ve analizörde m/z oranına göre ayrılırlar.



Şekil 1.14 İyon kapanı analizörü için şematik diyagram (<http://ull.chemistry.uakron.edu/gc>).

1.7 ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ

Bu çalışmanın amacı, saç boyaları, boyanmış saç örnekleri, çevre örnekleri, biyolojik sıvı, ve gıda örneklerinde bulunan *o*-FDA ve türevlerinin belirlenmesinde kullanılabilecek hassas ve spesifik analiz metodunun geliştirilmesidir.

Geliştirilen metot ile mutajenik ve kanserojenik etkileri bilinen *o*-FDA türevlerinin, çevre örneklerinde, saç boyalarında, boyanmış saç ve meyve suyu örneklerinde kantitatif analizi kesin olarak yapılarak söz konusu örneklerin kalitesi ve güvenliği için bir kontrol metodu olarak önerilecektir.

o-FDA ve türevlerinin, biyolojik sıvılarda bulunması çeşitli kanserlerin gelişmesinde rol oynayan önemli insan kaynaklı risk faktörleri olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla biyolojik örneklerde söz konusu bileşiklerin belirlenmeleri insan sağlığı ve güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır.

BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 KULLANILAN CİHAZLAR

2.1.1 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS)

Örneklerin analizi için A Thermo-Finnigan MAT 4500 GC-MS/MS sistemi kullanılmıştır. Kolon olarak ZB-5 MS kullanılmıştır.

2.1.2 pH Metre

Örnek çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında CRISON marka, sıcaklık ayarlı pH=0-14 ölçüm yapan cam elektrotlu pH metre kullanılmıştır.

2.1.3 Vorteks

Karıştırma ve ekstraksiyon işlemleri için 3000 rpm devirli VELP marka vorteks kullanılmıştır.

2.1.4 Ultrasonik Banyo

Türetme ve ekstraksiyon işlemlerinde ELMA marka sıcaklık ve zaman ayarlı programa sahip ultrasonik banyo kullanılmıştır.

2.1.5 Santrifüj Cihazı

Çalışmada, NÜVE marka NF615 model santrifüj cihazı kullanılmış ve bu cihaz, deneysel işlemler sırasında 3000-4000 devir/dak. hızla çalıştırılmıştır.

2.1.6 Saf Su Cihazı

Örnekleri hazırlama işlemlerinde kullanılan saf su için Millipore Direct-Q marka ultra saf su cihazı kullanılmıştır.

2.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

Saç boyası örnekleri, farklı boyalar seçilerek ticari olarak satılan firmalardan satın alınmıştır. Örnekler serin ortamda analiz zamanına kadar saklanmıştır. Farklı renk saç boyaları kullanmış bayanlar seçilerek kuaförlerden temin edilip, analiz buzdolabında zamanına kadar buzdolabında -4°C’de saklanmıştır.

Mide suyu örnekleri, Bülent Ecevit Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve tanı amacıyla endoskopi yapılan hastalarda 2012/03-4 sayılı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gastroloji uzmanı tarafından toplanmıştır. Örnekler -40°C’de ışık görmeyen ortamda buzdolabında analiz edileceği güne kadar bekletilmiştir.

Çevre örnekleri, Zonguldak ve Kozlu bölgesinden deniz suyu, dere suyu, Ankara bölgesinden dere suyu ve çeşitli boya fabrikalarının atık suyu toplanarak analizleri yapılmıştır. Renkli cam şişeler ile toplanan numuneler analizleri yapılacağı zamana kadar buzdolabında saklanmıştır.

Meyve suyu örnekleri, farklı markalar ve içeriklerine göre 250 mL’lik kutular halinde satın alınıp, analizleri yapılana dek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.3 KROMATOĞRAFİK SİSTEMİN ÖZELLİKLERİ VE ANALİZ ŞARTLARI

Bu çalışmada saç boyası, boyanmış saç boyası, çevre, gıda ve biyolojik sıvı örneklerinin analizi için GC-MS sistemi kullanılmıştır. Örneklerin cihaza analizinden önce türetme işlemi yapılarak GC-MS analizlerinde meydana gelecek pik kuyruklanmasının önüne geçilmiştir. Örneklerde bulunan maddelerin en iyi şekilde birbirlerinden ayrılmalrı ve hassasiyetin artırılması için analiz şartları belirlenmiştir. Analiz şartları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 GC-MS analiz şartları.

Cihaz Modeli A Thermo-Finnigan MAT 4500 GC–MS/MS
Dedektör Modu EI
Monitör Sistemi Seçici iyon monitör (SIM)
KolonZB-5 MS; kolon uzunluğu, 30 m; I.D., 0.25mm; film kalınlığı, 0.25mm
Sıcaklık Programı 100°C (1 dk), 5°C/ dk 175°C (1dk), 0,5°C/dk 177°C(1dk), 10°C/dk 277°C (2 dk)
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 130°C
Taşıyıcı gaz Helyum (% 99,999)
Akış Hızı 1,1mL/dk
Tarama Aralığı 25-400
İyonlaşma Voltajı 70 eV (EI)

Analiz için ilk olarak önemli kısım örneklerin iyonlaşması için enjeksiyon bloğu sıcaklığının belirlenmesidir. Çeşitli denemeler yapılmış ve bu sıcaklık 130°C'ye ayarlanarak tüm bileşiklerin iyonlaşması gerçekleşmiştir. Aranılan maddeler göre sıcaklık programı yapılmıştır. Bu programın ayarlaması yapılırken aranılan maddelerde bulunan izomerlerin ayrılması sağlanacak ve bozunmayacak şekilde sıcaklık arttırılmıştır. İzomerlerin ayrılması için farklı sıcaklık programları denenmiş ve ayrılma işlemi gerçekleştiğinde yukarıda verilen sıcaklık programı kullanılmıştır. Ayarlanan sıcaklık programı ve akış hızı ile izomerlerin birbirinden daha iyi ayrılması sağlanmıştır.

2.4 DENEYSEL İŞLEMLER

2.4.1 *o*-FDA ve Türevlerinin Sulu Çözeltiden İzolasyonu ve Analizi

Yapılan çalışmada *o*-FDA türevlerinin örneklerden analizi için önerilen metodun uygulanabilirliği ve izolasyonu için *o*-FDA türevleri nitrit ile 1*H*-benzotriazol (1*H*-BT) türevlerine dönüştürüldükten sonra, benzotriazol türevleri sıvı-sıvı ekstraksiyon ile organik faza alınıp GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Böylece optimize edilen metot *o*-FDA türevlerinin belirlenmesi için saç boyası, boyanmış saç, değişik çevre, gıda ve biyolojik sıvıörneklerine uygulanmıştır. Metot kısaca analiz edilecek katı örneklerin HCl içerisinde ultrasonik banyoda 15-20 dk bekletilmesi, sıvı örneklerin ise pH 6'da toluen ile yıkanarak her

iki örnek içinde su fazının 0,1 M HCl ile (pH 1) asitliğinin ayarlanması ardından 3x3 mL kloroform ile çalkalanarak kloroform fazının atılmasından sonra pH 2'ye ayarlanıp, sulu faza 1M nitrit çözeltisi eklenmesiyle oluşan 1*H*-benzotriazol (1*H*-BT) türevlerinin organik faza alınmasını, N₂ gazı altında çözücü miktarı 500 µL' ye ayarlanmasını ve GC-MS analizlerini içermektedir.

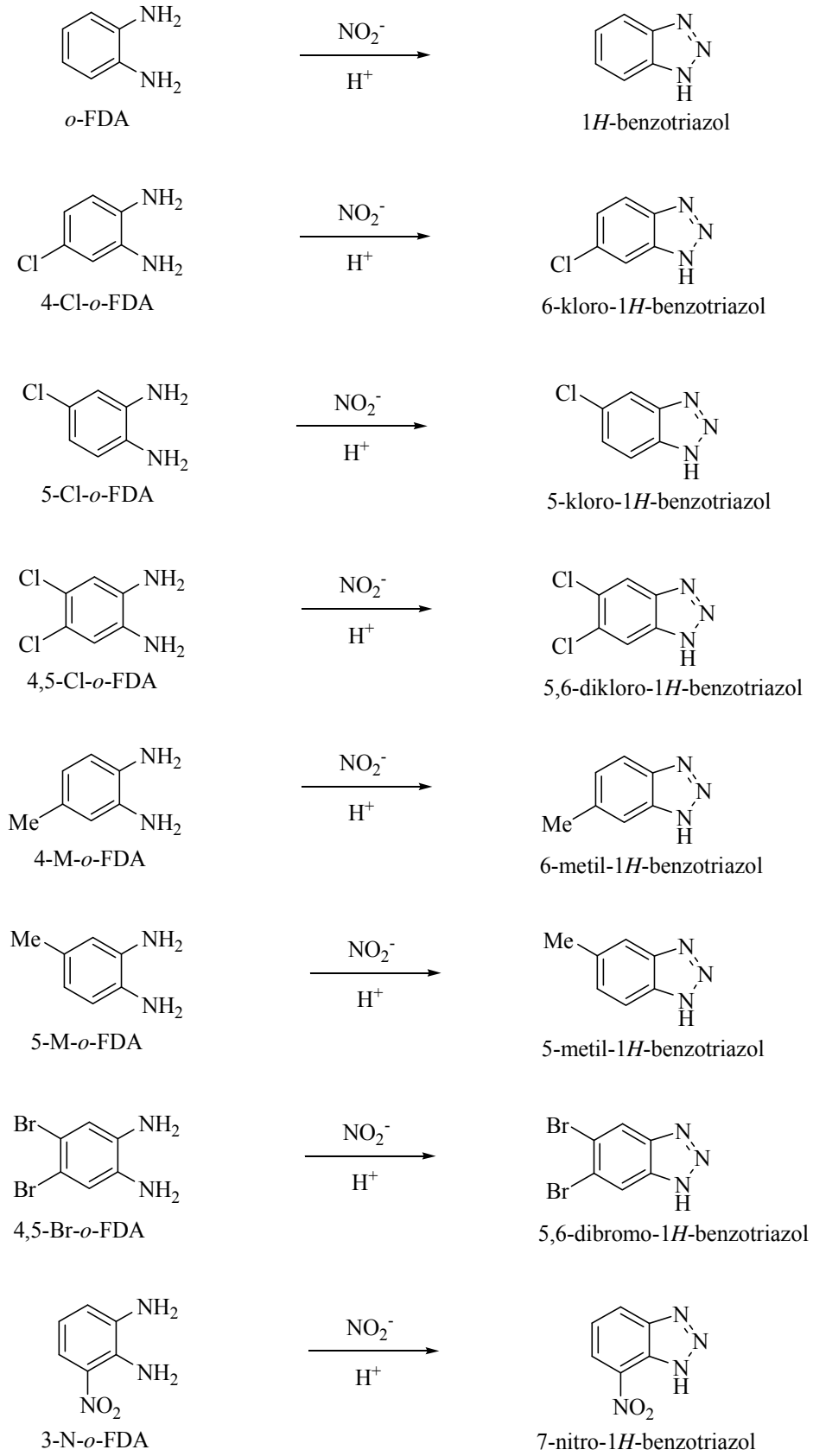
2.4.2 Standart *o*-FDA'ların Türetilmesi

Standart 1*H*-BT türevleri bulunmayan *o*-FDA'lar 25 µg/mL'lik çözeltilerinin her birinden bilinen miktarlarda alınarak nitrit çözeltisi ile türetilerek 1*H*-BT türevleri oluşturuldu ve oluşan türevler standart olarak kullanıldı. Standart 1*H*-BT türevleri karışımı için GC-MS kromatogramı sonuçlar kısmında gösterilmiştir.

2.4.3 Standart 1*H*-BT Türevlerinin Gaz Kromatografisinde Alıkonma Zamanlarının Tespit Edilmesi

Standart olarak kullanılan 1*H*-BT türevlerinin GC'de alıkonma zamanlarının belirlenmesi için standartların toluen içerisinde 70 µg/mL'lik çözeltileri hazırlanmıştır ve GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda örneklerde aranacak olan *o*-FDA'ların 1*H*-BT türevlerinin her birinin alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan standart 1*H*-BT türevlerinin alıkonma zamanları sonuçlar bölümünde verilmiştir. Örneklerde aranacak olan söz konusu *o*-FDA'ların nitrit ile türetme reaksiyonları Şekil 2.1'de verilmiştir.

Örneklerdeki *o*-FDA'ların belirlenmesinde standart FDA'ların 1*H*-BT türevlerinin GC-MS'deki alıkonma zamanları ve kütle spektrumlarından yararlanılmıştır.



Şekil 2.1 *o*-FDA'ların NO_2^- ile türetme reaksiyonları.

2.4.4. Standart *o*-FDA'ların Türetme için pH Grafiklerinin Çizilmesi

o-FDA'lar asidik ortamda nitrit ile kolaylıkla reaksiyona girerler. Reaksiyonun yüksek verimde gerçekleşmesi için ortam pH'sının ayarlanması gerekmektedir. Bunun için standart *o*-FDA'ların 25 µg/mL'lik stok çözeltiler hazırlanmış ve daha sonra her birinden aynı konsantrasyonda olacak şekilde belirli hacimler alınarak pH 1 ile 3 arasında 5 farklı aralıkta türetme işlemi yapılmış ve türevler ekstrakte edilerek GC-MS analizleri yapılmıştır. Bu işlem 1-5 µg/mL aralığında 5 farklı konsantrasyon değeri için tekrarlanmıştır. Elde edilen pik alanları pH değerine karşı grafiğe geçirilerek sonuçlar kısmında gösterilmiştir.

2.4.5 Standart *o*-FDA'ların 1*H*-BT Türevlerinin Ekstraksiyonu için pH Grafiklerinin Çizilmesi

Bu çalışmada önerilen metotta kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinde ortamın pH'sının ayarlanması çok önemli olduğundan her bir *o*-FDA'nın 1*H*-BT türevlerinin değişik pH'larda (5 ile 8 arasında) sulu ortamdan ekstraksiyon yapılmış ve pH değerlerine karşı GC-MS'den elde edilen pik alanları grafiğe geçirilmiştir. 1*H*-BT türevleri için çizilen grafik sonuçlar kısmında gösterilmiş olup bu grafiklerin elde edilmesi için izlenen yol aşağıda anlatılmıştır.

Standart 1*H*-BT türevleri suda çözülüp, 100 µg/mL'lik sulu çözeltileri hazırlanmış ve daha sonra aynı konsantrasyonda olacak şekilde her birinden belirli hacimler alınıp değişik pH'larda ekstrakte edilip analizleri yapılmıştır. Her bir pH değeri için GC-MS analizleri yapıp, pik alanları ve % pH verimi, pH değerlerine karşı grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden yararlanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu için optimum pH değerleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada pH grafiklerinden yararlanılarak *o*-FDA'ların 1*H*-BT türevleri karışımı için en uygun ekstraksiyon pH'sı seçilmiştir. Sonuçlar bölümünde bazı *o*-FDA'ların 1*H*-BT türevleri için pH'a karşı pik alanları ve % pH verimi grafikleri gösterilmiştir.

2.4.6 Standart *o*-FDA'ların 1*H*-BT Türevleri Olarak Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi

Standart *o*-FDA'ların kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi için toluen içerisinde çözülmüş standart 1*H*-BT türevlerinin konsantrasyonları gerekli seyreltmeler yapılarak 5-100 µg/mL, 0,1-5 µg/mL ve 0,1-5 ng/mL aralıklarında 5 farklı konsantrasyon değerleri belirlenip GC-MS analizleri yapılmıştır. Elde edilen pik alanları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek her bir

madde için kalibrasyon grafiği çizildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafikleri ve kalibrasyon grafiklerinden elde edilen denklem ve regreasyon katsayıları (r^2) sonuçlar bölümünde gösterilmiştir. Bu veriler ile örneklerdeki *o*-FDA'ların miktarlarının belirlenmesi sağlanmıştır.

2.4.7 Geliştirilen Metodun Algılama Limitinin Belirlenmesi

Standart 1*H*-BT türevlerinin 25 µg/mL olacak şekilde her birinin çözeltisi hazırlandı ve gerekli seyreltmeler yapılarak her biri için 5-0,1 ng/mL arasında değişik çözeltiler hazırlandı. Önerilen metot kullanılarak farklı konsantrasyonlarda GC-MS analizleri yapılarak en düşük algılama limiti 0,01-0,03 ng/mL olarak belirlenmiştir.

2.4.8 Saç Boyalarında *o*-FDA'ların Belirlenmesi

Saç boyası örnekleri analiz zamanına kadar serin ortamda bekletilmiştir. 0,30 g saç boyası örneği alınarak 30 mL 0,1 M HCl içerisinde 40 °C de 20 dk hidroliz edilip, çözelti süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzöntü oda sıcaklığına geldikten sonra pH 1'de 3x3 mL kloroform ile çalkalanarak kloroform fazı atılmıştır. Bu işlemden sonra geriye kalan sulu fazın pH'sı 0,1M NaOH ile 2'e ayarlanıp nitrit çözeltisi ile türetme işlemi yapılmıştır. Sulu faz pH'sı fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanıp 2 mL tolüen ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Tolüen fazı alınarak susuz sodyum sülfat üzerinden geçirilip azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra hacmi tolüen ile 500 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 1µL alınarak GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.4.9 Boyanmış Saç Örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi

Kuaförlerden temin edilen farklı renkteki boyanmış saç örnekleri çok bekletilmeden genelde aynı gün içerisinde analizleri yapıldı. 0,05-0,3 g boyanmış saç örnekleri 10-30 mL 2 M HCl içerisinde 65°C 20 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra süzölerek saç örneklerinin çözeltilerden ayrılması sağlanmıştır. Süzöntünün pH'sı 1'e ayarlanıp 3x3 mL kloroform ile çalkalanarak kloroform fazı atılmıştır. Bu işlemden sonra geriye kalan sulu fazın pH'sı 0,1M NaOH ile 2'e ayarlanıp nitrit çözeltisi ile türetme işlemi yapılmıştır. Sulu faz pH'sı fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanıp 2 mL tolüen ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Tolüen fazı alınarak susuz sodyum sülfat üzerinden geçirilip azot gazı altında kuruluğa kadar

uçurulduktan sonra hacmi toluen ile 500  L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan   zeltiden 1  L alınarak GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.4.10  evre örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi

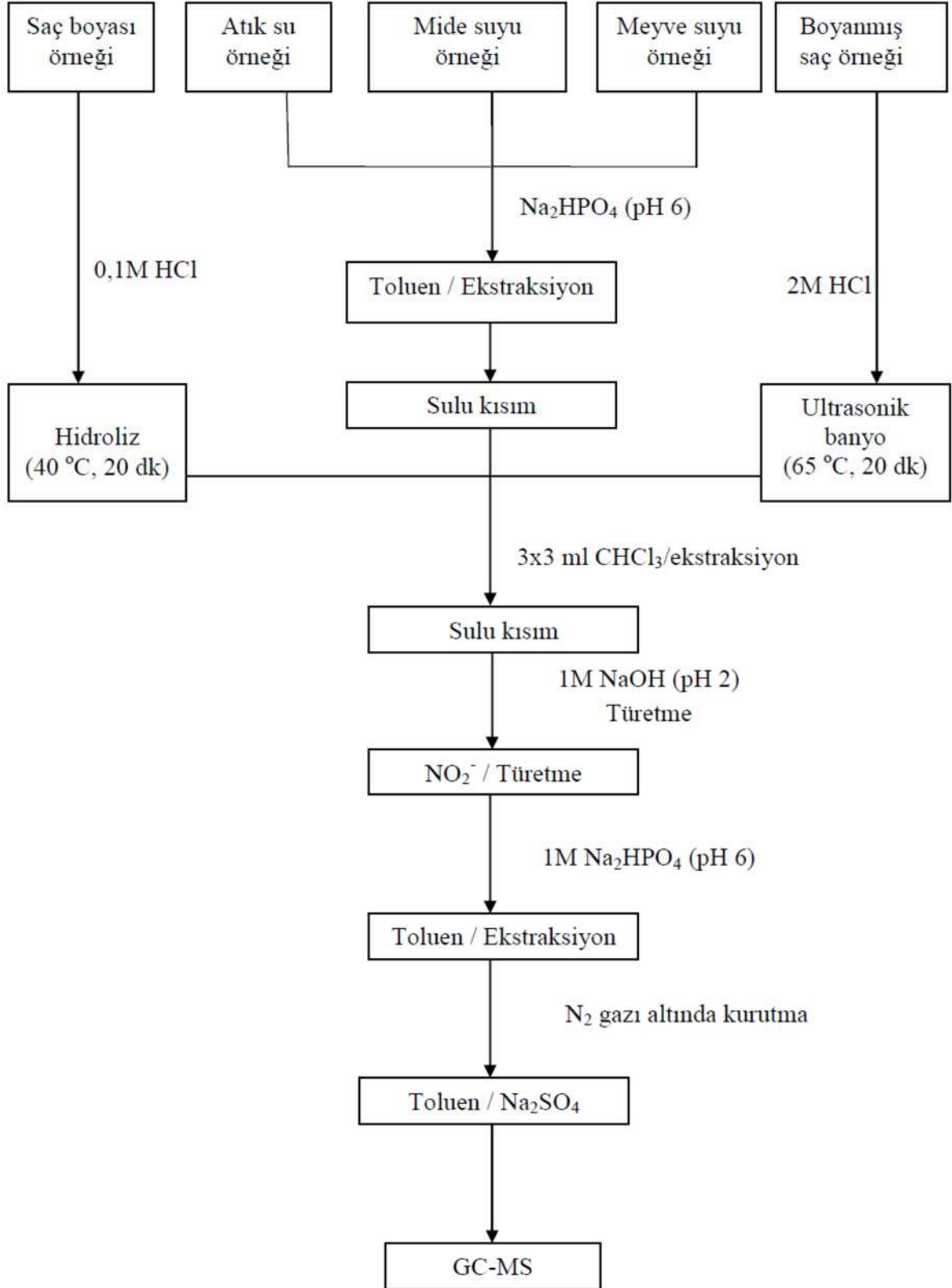
Zonguldak limanı ve deresi, Kozlu limanı ve deresi, Ankara deresi, boya fabrikalarından renkli şişelerde alınan örnekler analiz zamanına kadar buzdolabında saklanmıştır. Örneklerden 100 mL'lik kısım alınarak pH fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanıp toluen ile ekstrakte edilerek örnekte var olan 1*H*-BT türevleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Toluen fazı atılıp sulu faz pH'sı 0,1 M HCl ile 1'e ayarlandıktan sonra süzgeç kağıdı ile s z l p örnek içerisindeki parçacıklar uzaklaştırılmıştır. S z nt n n pH'sı 1 olacak şekilde 3x3 mL klorofom ile çalkalanıp organik faz atılmıştır. Su fazının pH'sı 0,1 M NaOH ile 2'ye ayarlandıktan sonra nitrit çözeltisi ile türetme işlemi yapılp, sulu çözeltinin pH'sı fosfat tamponu ile tekrar 6'ya ayarlanmıştır. Sulu faz 2 mL toluen ile 3 kez ekstrakte edildikten sonra toluen fazı alınıp susuz Na₂SO₄ üzerinden geçirilip azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra hacmi toluen ile 500  L'ye tamamlanmıştır. 1*H*-BT bileşiklerini içeren fazdan 1  L alınarak GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.4.11 Meyve Suyu örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi

250 mL kutular halinde farklı markalardan ve karışımlardan oluşan meyve suyu örnekleri analiz gününe kadar buzdolabında saklanmıştır. Meyve suyu örneklerinde 40'ar mL alınarak pH'sı fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanıp toluen ile ekstrakte edilip örnekte var olan 1*H*-BT türevleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sulu fazın pH'sı 0,1 M HCl ile 1'e ayarlandıktan sonra süzgeç kağıdı ile s z l p örnek içerisindeki tortular uzaklaştırılmıştır. S z nt n n pH'sı 1'de tutularak 3x3 mL klorofom ile çalkalanıp klorofom fazı atılmıştır. Su fazın pH'sı 1M NaOH ile 2'ye ayarlanıp nitrit çözeltisi ile türevlendirme işlemi yapılp, pH fosfat tamponu ile tekrar 6'ya ayarlanıp 2 mL toluen ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Toluen fazı alınarak susuz Na₂SO₄ üzerinden geçirilip azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra hacmi toluen ile 500  L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan   zeltiden 1 L alınarak GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.4.12 Mide Suyu Örneklerinde *o*-FDA'ların Belirlenmesi

Mide suyu örnekleri -40°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Mide suyu örnekleri 3-8 mL arasında alınıp ilk olarak mide pH ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin pH'sı fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanıp toluen ile ekstrakte edilmiştir. 1 M HCl ile pH'sı 1'e ayarlanan sulu faz santrifüjlendikten sonra çöken maddeler uzaklaştırılmıştır. pH'sı 1'e ayarlanmış çözelti klorofom ile çalkalanıp klorofom fazı atılmıştır. Su fazı pH'sı 1 M NaOH ile 2'ye ayarlanıp nitrit çözeltisi ile türevlendirme işlemi yapıp, pH fosfat tamponu ile tekrar 6'ya ayarlanıp 0,5 mL toluen ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Toluene fazı alınarak 2-3 dakika santrifüj edildikten sonra susuz Na₂SO₄ üzerinden geçirilip azot gazı altında kurutulduktan sonra hacmi toluen ile 500 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 1 µL alınarak GC-MS ile analiz edilmiştir. Çevre örnekleri, gıda örnekleri, saç boyası örnekleri, boyanmış saç örnekleri ve mide suyu örneklerindeki *o*-FDA'ların analizleri için önerilen metotun uygulandığı şematik olarak Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 Çevre örnekleri, gıda örnekleri, saç boyası örnekleri, boyanmış saç örnekleri ve mide suyu örneklerindeki *o*-FDA'ların analiz yönteminin şematik olarak gösterilmesi.

BÖLÜM 3

DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

o-FDA ve türevleri saç ve gıda boyalarında, çeşitli çevre örneklerinde bulunmaktadır ve dolayısıyla insanlarda bu bileşiklere maruz kalmaktadır. Saç boyası, boyanmış saç örnekleri, endüstri atık suları, deniz suyu, nehir suyu, meyve suyu örneklerinde ve mide suyu örneklerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan *o*-FDA ve türevleri GC-MS kullanılarak hassas ve spesifik olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen metot, örnekler içerisindeki *o*-FDA'ların nitrit ile türetilip, oluşan 1*H*-BT türevlerinin organik faza alınarak GC-MS analizlerini içermektedir. Bu metodun uygulanabilir olması için ilk olarak standartlar üzerinden optimize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle optimizasyon işleminin ilk basamağı olarak sulu ortamdaki *o*-FDA'ların türetilmesinde kullanılacak en uygun pH değeri belirlenmesinin ardından standart 1*H*-BT türevlerinin alıkonma zamanları belirlenmiş ve her bir standart için kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Daha sonra sulu fazdaki türevlerin (1*H*-BT'ler) sıvı-sıvı ekstraksiyon için en uygun pH değeri belirlenmiştir. Saç boyası, boyanmış saç, çevre, meyve suyu ve mide suyu örneklerine farklı konsantrasyonlarda standart *o*-FDA ve türevleri içeren çözelti ilave edilerek geliştirilen metot için *o*-FDA ve türevlerinin geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca standart çözelti ilavesi yapılmış örneklerin analizinden elde edilen S/N oranları kullanılarak *o*-FDA ve türevleri için metot algılama limitleri (LOD) hesaplanmıştır.

3.1 DENEYSEL SONUÇLAR

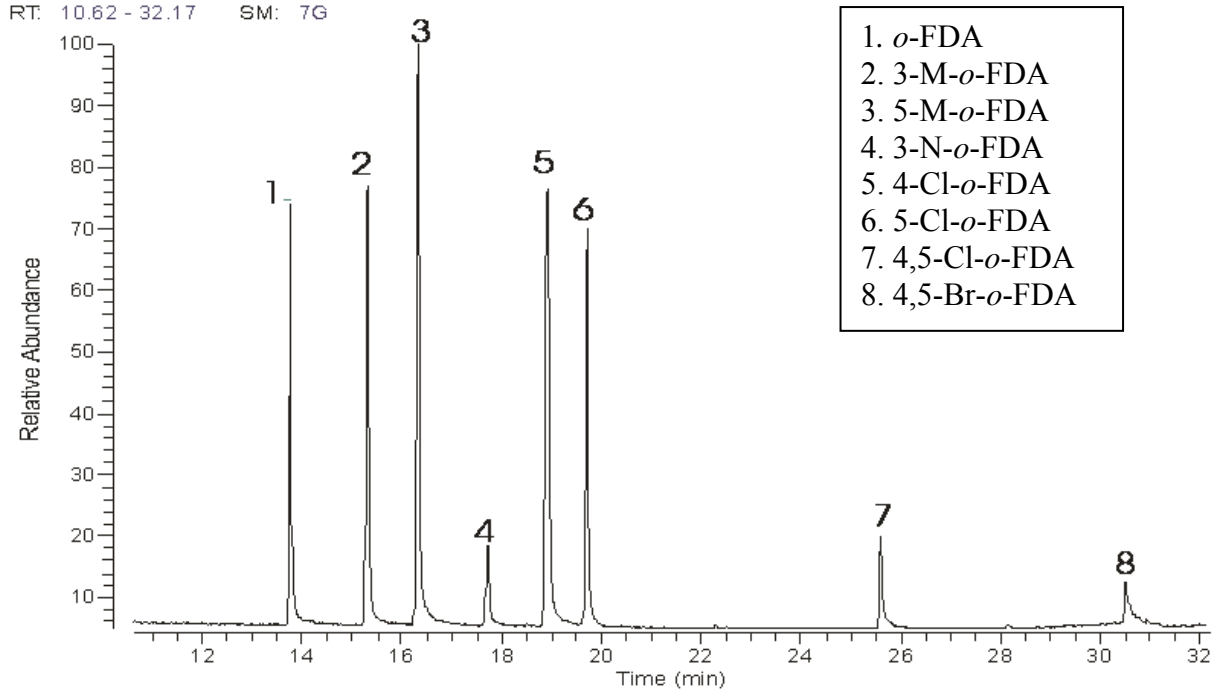
3.1.1 Standart 1*H*-BT Türevlerinin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi

Standart 1*H*-BT türevleri toluende çözeltileri hazırlanıp GC-MS ile analiz edilmiştir. Alıkonma zamanı her bir standart için ayrı ayrı belirlenmiştir. Metot örneklerle uygulandığında standartların alıkonma zamanları yardımıyla hangi maddenin örnekler

içerisinde bulunduğu yani nitel analizi yapılabilecektir. Standart 1*H*-BT türevlerinden oluşan karışıma ait GC-MS kromatogramı Şekil 3.1’de verilmiştir ve alıkonma zamanları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

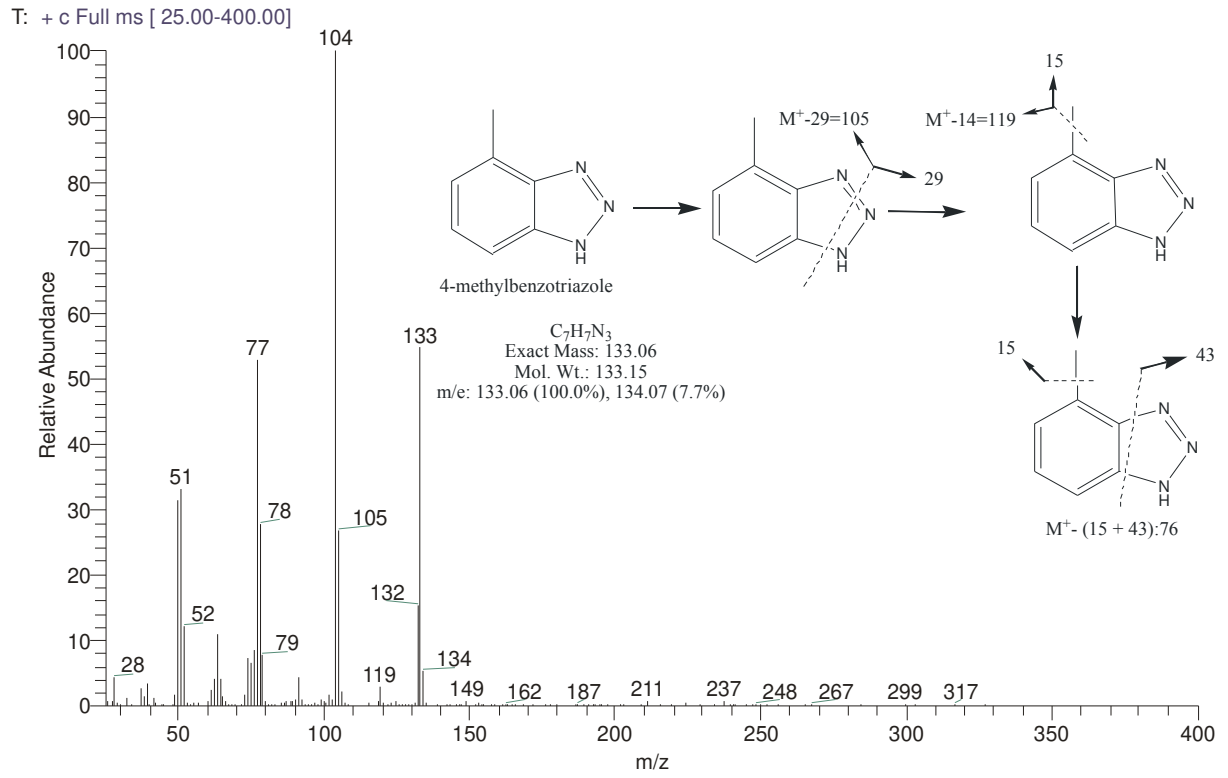
Çizelge 3.1 Standart 1*H*-BT türevlerinin GC-MS’de alıkonma zamanlarının belirlenmesi.
Deney Sayısı:5; Dakika:dk.

Standart1<i>H</i>-Benzotriazol Türevleri	Kısaltmalar	Alıkonma Zamanları (dk) GC-MS	Molekül Ağırlıkları (g/mol)
1 <i>H</i> -Benzotriazol	1 <i>H</i> -BT	13,76	119,12
4-Metil-1 <i>H</i> -Benzotriazol	4-M-1 <i>H</i> -BT	15,29	133,15
5- Metil-1 <i>H</i> -Benzotriazol	5-M-1 <i>H</i> -BT	16,33	133,15
7-Nitro-1 <i>H</i> -Benzotriazol	7-N-1 <i>H</i> -BT	17,73	164,12
6-Kloro-1 <i>H</i> -Benzotriazol	6-Cl-1 <i>H</i> -BT	18,89	153,57
5- Kloro-1 <i>H</i> -Benzotriazol	5-Cl-1 <i>H</i> -BT	19,24	153,57
5,6-Dikloro-1 <i>H</i> -Benzotriazol	5,6-Cl-1 <i>H</i> -BT	25,60	188,01
5,6-Dibromo-1 <i>H</i> -Benzotriazol	5,6-Br-1 <i>H</i> -BT	30,49	276,92

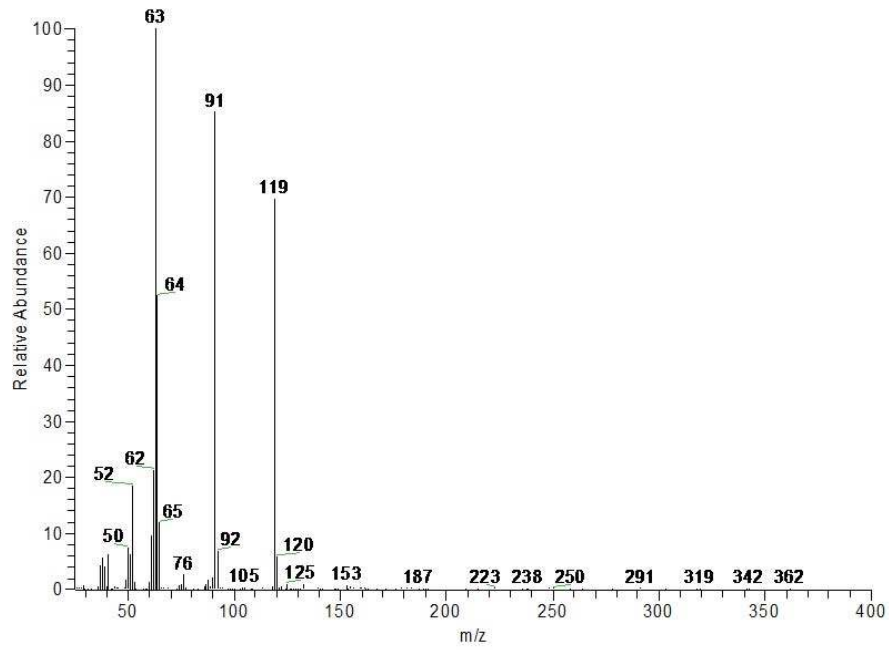


Şekil 3.1 Standart 1*H*-BT türevleri karışımının GC-MS kromatogramı.

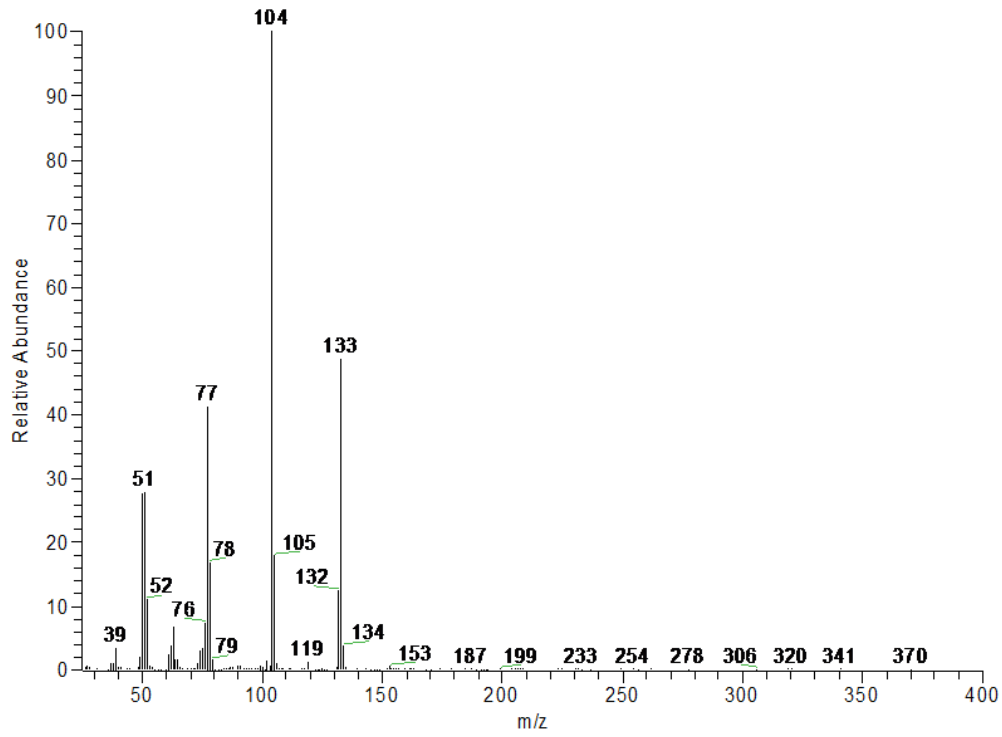
Alıkonma zamanları genel olarak molekül ağırlıkları ile doğru orantılı artmaktadır. Kromatogramda izomerlerin kolaylıkla ayrıldığı görülmektedir. Standart 1*H*-BT türevlerine ait kütle spektrumları Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de verilmiştir.



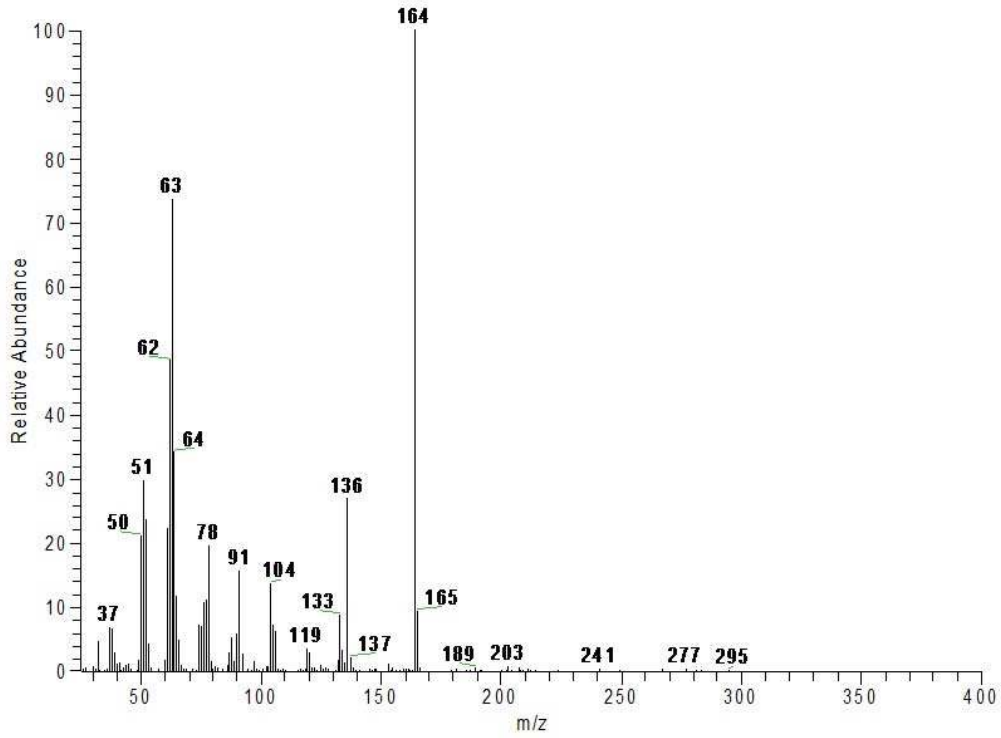
Şekil 3.2 4-M-1H-BT'nin kütle spektrumu.



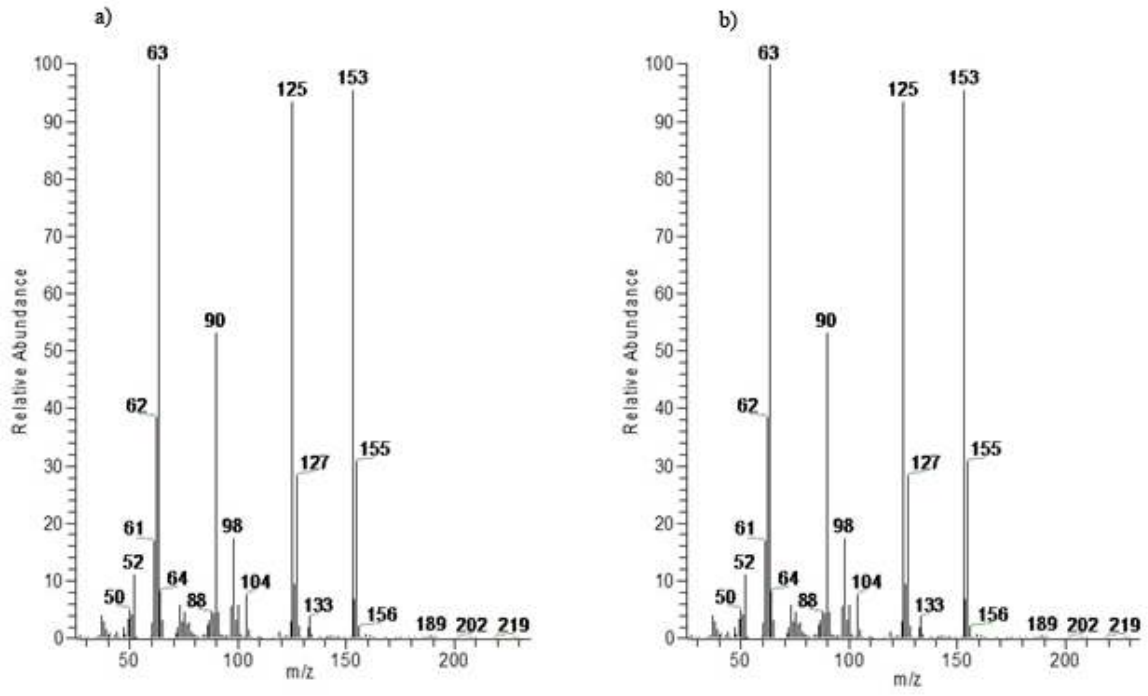
Şekil 3.3 1H-BT'nin kütle spektrumu.



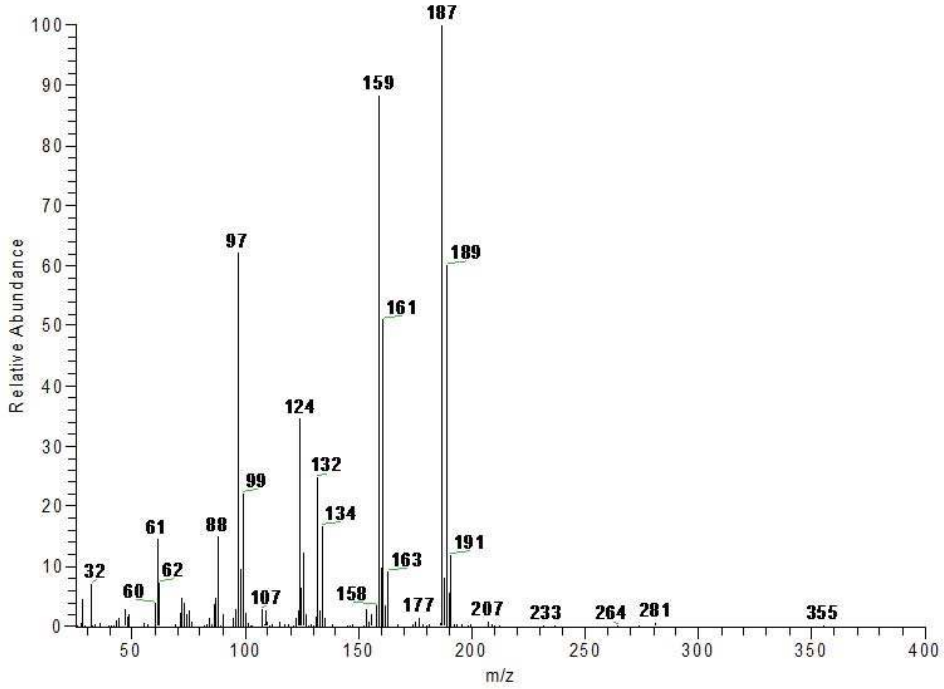
Şekil 3.4 5-M-1H-BT'nin kütle spektrumu.



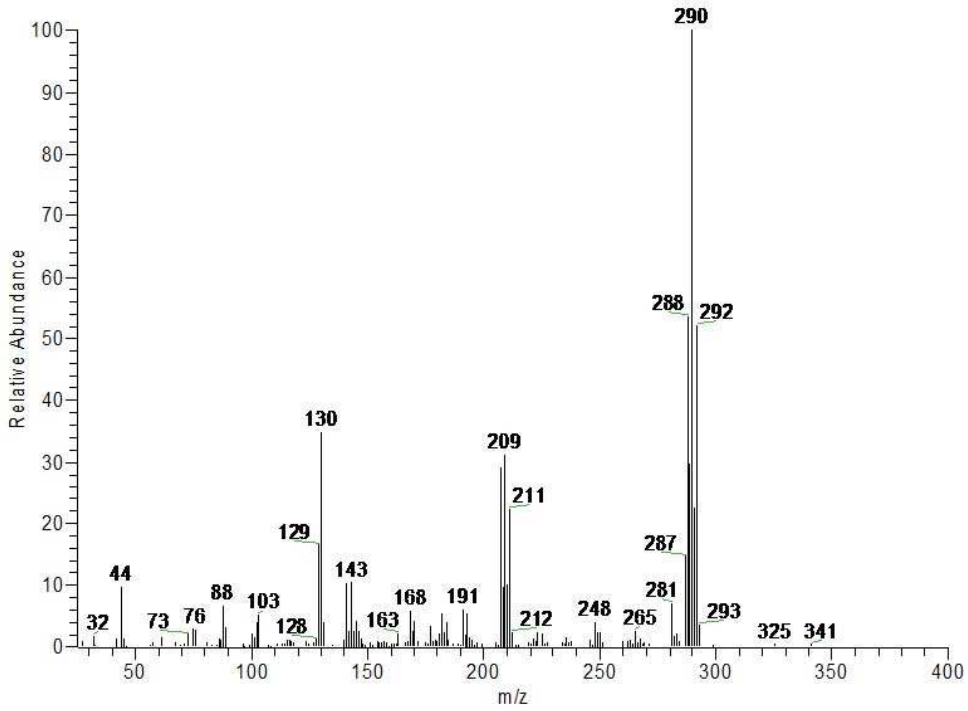
Şekil 3.5 7-N-1H-BT'nin kütle spektrumu.



Şekil 3.6 a) 6-Cl-1H-BT b) 5-Cl-1H-BT ait kütle spektrumu.



Şekil 3.7 5,6-Cl-1H-BT'nin kütle spektrumu.



Şekil 3.8 5,6-Br-1H-BT'nin kütle spektrumu.

Çizelge 3.2'de yukarıda spektrumları verilen bazı standart *o*-FDA kütle spektrumlarında ki temel pik, molekül iyon piki (M^+) ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri verilmiştir. Kütle spektrumlarında şiddeti en fazla olan pik temel pik ve bileşiğin molekül kütlesine eşit olan pik ise M^+ piki olarak belirtilmiştir. Moleküllerin parçalanma ürünleri olan temel ve molekül pikleri oluşan tüm standartlar için yorumlanmış ve diğer karakteristik pikler tespit edilmiştir.

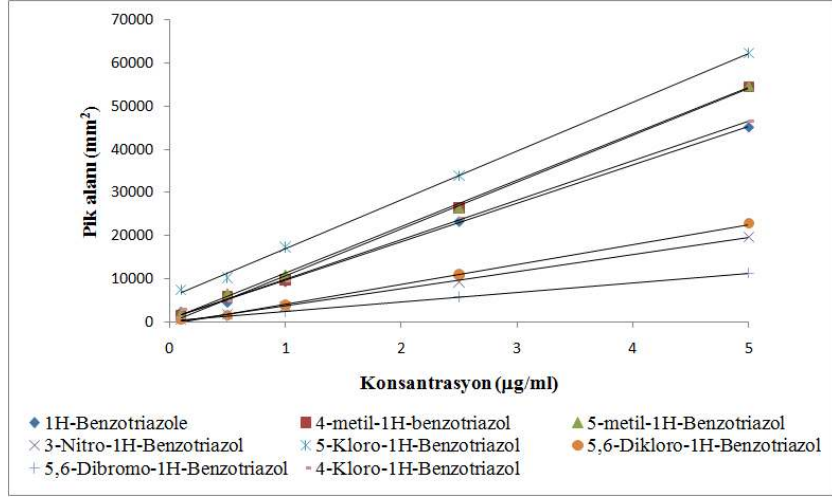
Çizelge 3.2 Standart 1*H*-BT türevlerinin kütle spektrumundaki temel pik, moleküler iyon piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri.

Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol	Temel Pik	Moleküler İyon Piki (M ⁺)	Diğer Karakteristik Pikler
1 <i>H</i> -BT	63	119	91, 64, 52
4-M-1 <i>H</i> -BT	104	133	77, 51, 28
5-M-1 <i>H</i> -BT	104	133	77, 51, 39
7-N-1 <i>H</i> -BT	164	164	136,63,51
4-Cl-1 <i>H</i> -BT	63	153	125,90,37
5-Cl-1 <i>H</i> -BT	63	153	125,90,50
4,5-Cl-1 <i>H</i> -BT	187	187	159, 97, 61
4,5-Br-1 <i>H</i> -BT	290	290	278,209,130

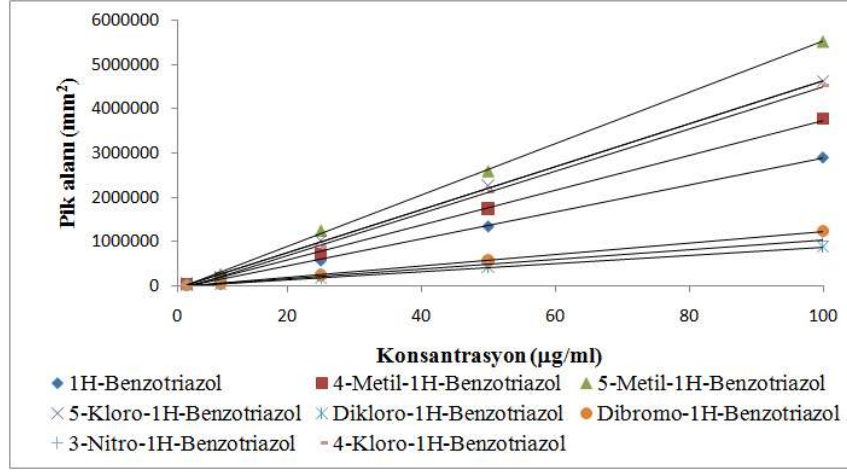
3.1.2 Standart 1*H*-BT Türevlerinin Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

Bilinen konsantrasyonda hazırlanan standart 1*H*-BT türevleri gerekli seyreltmeler yapılarak GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Pik alanı değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek üç farklı aralıkta kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Her bir 1*H*-BT türevleri için oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de verilmiştir.

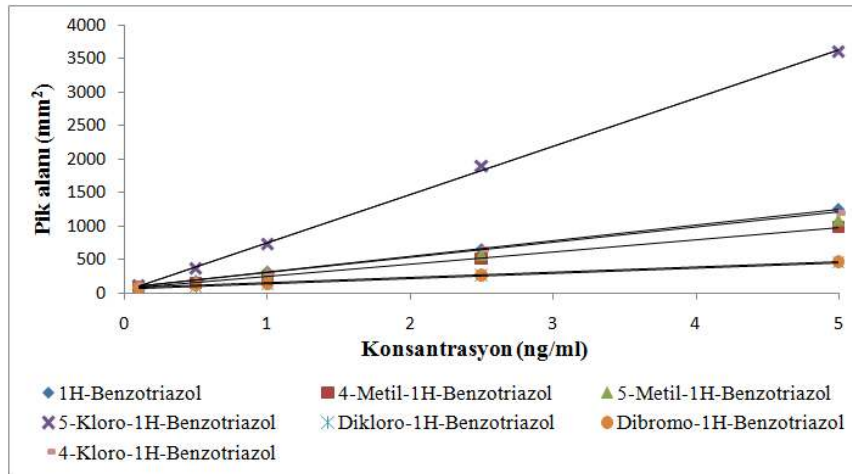
Çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler ve regrasyon katsayıları 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığı için Çizelge 3.3’te, 0,1-5 µg/mL konsantrasyon aralığı için Çizelge 3.4’te, 0,1-5 ng/mL aralığı için Çizelge 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.9 1H-BT türevlerinin 0,1-5 µg/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.10 1H-BT türevlerinin 5-100 µg/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.11 1H-BT türevlerinin 0,1-5 ng/mL değerleri arasındaki kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.3 Kalibrasyon işlemlerine ait (5-100 µg/mL) kalibrasyon denklemleri ve R² değerleri.

Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol	Kalibrasyon Denklemi	R ²
1 <i>H</i> -BT	$y = 30498x - 15632$	0,9998
4-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 39462x - 20131$	0,9997
5-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 57774x - 25615$	0,9995
7-N-1 <i>H</i> -BT	$y = 10732x - 48030$	0,9992
4-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 47846x - 27498$	0,9997
5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 48635x - 21955$	0,9996
4,5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 9121,0x - 34621$	0,9996
4,5-Br-1 <i>H</i> -BT	$y = 13171x - 77293$	0,9997

Çizelge 3.4 Kalibrasyon işlemlerine ait (0,1-5 µg/mL) kalibrasyon denklemleri ve R² değerleri.

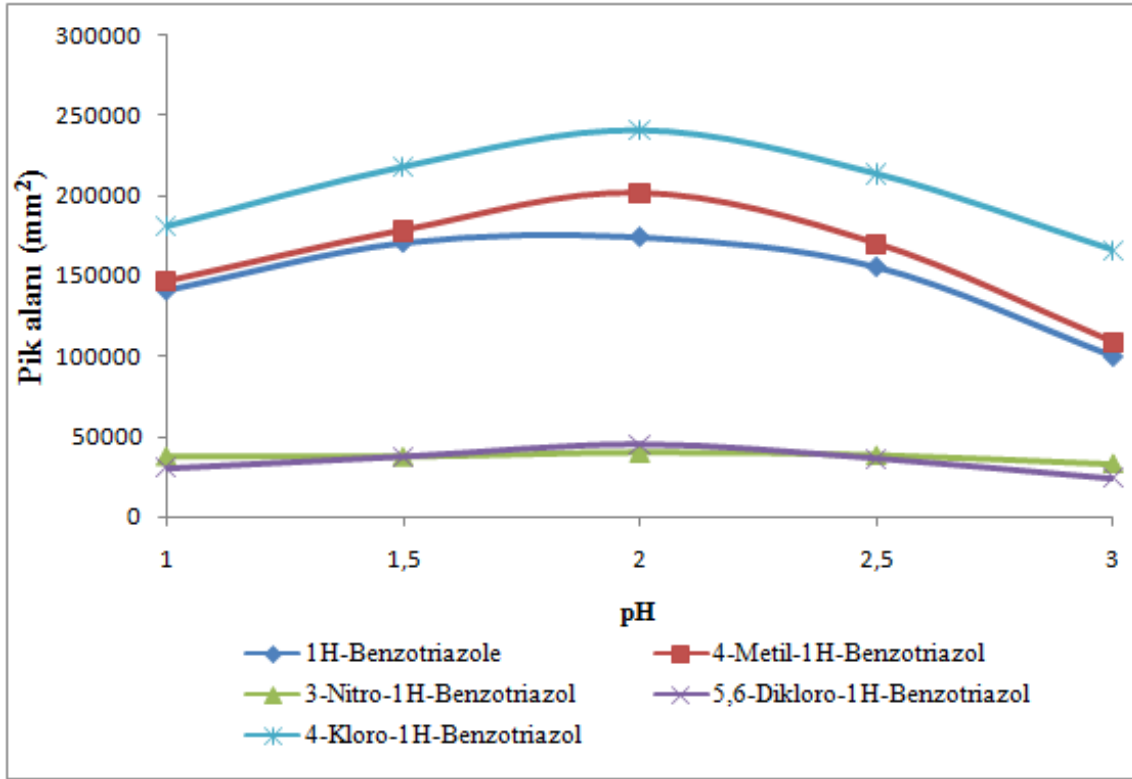
Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol	Kalibrasyon Denklemi	R ²
1 <i>H</i> -BT	$y = 8914,0x + 723,8$	0,9998
4-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 10813x + 10,91$	0,9995
5-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 10732x + 626,0$	0,9996
7-N-1 <i>H</i> -BT	$y = 3948,1x - 242,6$	0,9993
4-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 9115,1x + 903,9$	0,9995
5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 11312x + 5728$	0,9998
4,5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 4598,1x - 369,6$	0,9995
4,5-Br-1 <i>H</i> -BT	$y = 2217,1x + 309,1$	0,9994

Çizelge 3.5 Kalibrasyon işlemlerine ait (0,1-5 ng/mL) kalibrasyon denklemleri ve R² değerleri.

Standart 1 <i>H</i> -Benzotriazol	Kalibrasyon Denklemi	R ²
1 <i>H</i> -BT	$y = 234,5x + 72,92$	0,9997
4-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 183,3x + 64,63$	0,9996
5-M-1 <i>H</i> -BT	$y = 199,4x + 87,29$	0,9994
4-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 225,4x + 82,78$	0,9993
5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 720,7x + 24,53$	0,9994
4,5-Cl-1 <i>H</i> -BT	$y = 76,89x + 67,25$	0,9991
4,5-Br-1 <i>H</i> -BT	$y = 78,34x + 74,82$	0,9992

3.1.3 Standart *o*-FDA'ların Türetme İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Asidik ortamda gerçekleşen *o*-FDA'ların nitrit iyonu ile reaksiyonu için en uygun türetme pH'ı seçilerek türetmenin en yüksek verimde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bunun için ilk olarak elimizde bulunan *o*-FDA'ların her biri için 25 µg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimler alınarak konsantrasyonları 1-5 µg/mL olacak şekilde her bir konsantrasyon için pH 1-3 arasında 5 farklı aralıkta nitrit ile türetme işlemi yapıp, pH 6'da toluen ile ekstraksiyonu ardından son hacim 500 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemler her biri için aynı olacak şekilde hazırlanan çözeltilerden 1 µl GC-MS'e enjekte edilmiştir. Daha sonra türetme pH'ına karşı pik alanı grafiğe geçirilerek optimum türetme pH'ı belirlenmiştir. Şekil 3.12'de türetme pH'ına karşı pik alanları grafiğe geçirilmiştir.



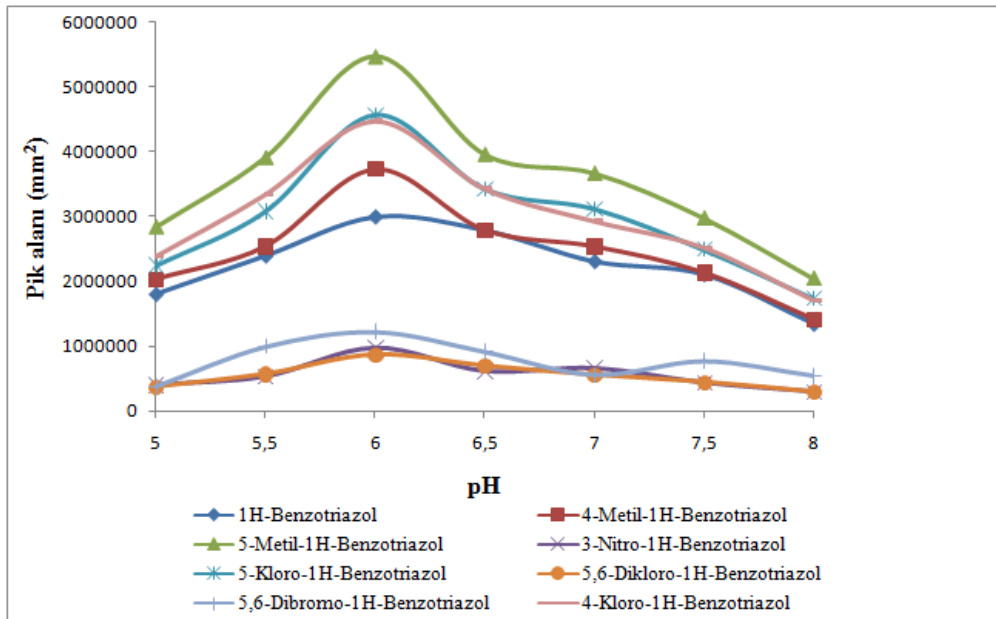
Şekil 3.12 Standart 1H-BT'lerin türetme pH'ına karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik.

Elde edilen sonuçlara göre en uygun türetme pH'ı 2 olarak seçilmiştir. Türetme işleminden sonra kalan su fazın pH'ı *o*-FDA ve türevlerinin ekstraksiyonu için en uygun pH olan 8'e (Akyüz and Ata 2008) ayarlanmış ve BEHPA içeren kloroform ile ekstrakte edilerek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda *o*-FDA ve türevlerine rastlanılmamıştır. Bu da ortamda bulunan *o*-FDA ve türevlerinin tamamen 1H-benzotriazol türevlerine dönüştüğünü göstermektedir.

3.1.4 Standart 1H-BT Türevleri İçin Optimum Ekstraksiyon pH Değerinin Belirlenmesi

Standart 1H-BT türevlerinin ekstraksiyonunda uygun pH değerlerinin belirlenmesi için her bir 1H-BT türevinin stok çözeltisi hazırlandı ve bu stok çözeltiden 100 µg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 100 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltilerin her biri pH 5-8 arasında 7 farklı pH değerinde ekstrakte edildikten sonra son hacim 500 µl'ye ayarlanmıştır. Bu miktardan 1 µl alınıp GC-MS analizi yapılmıştır. Bu işlemler her bir pH değerinde tamamen aynı olacak şekilde yapılmıştır.

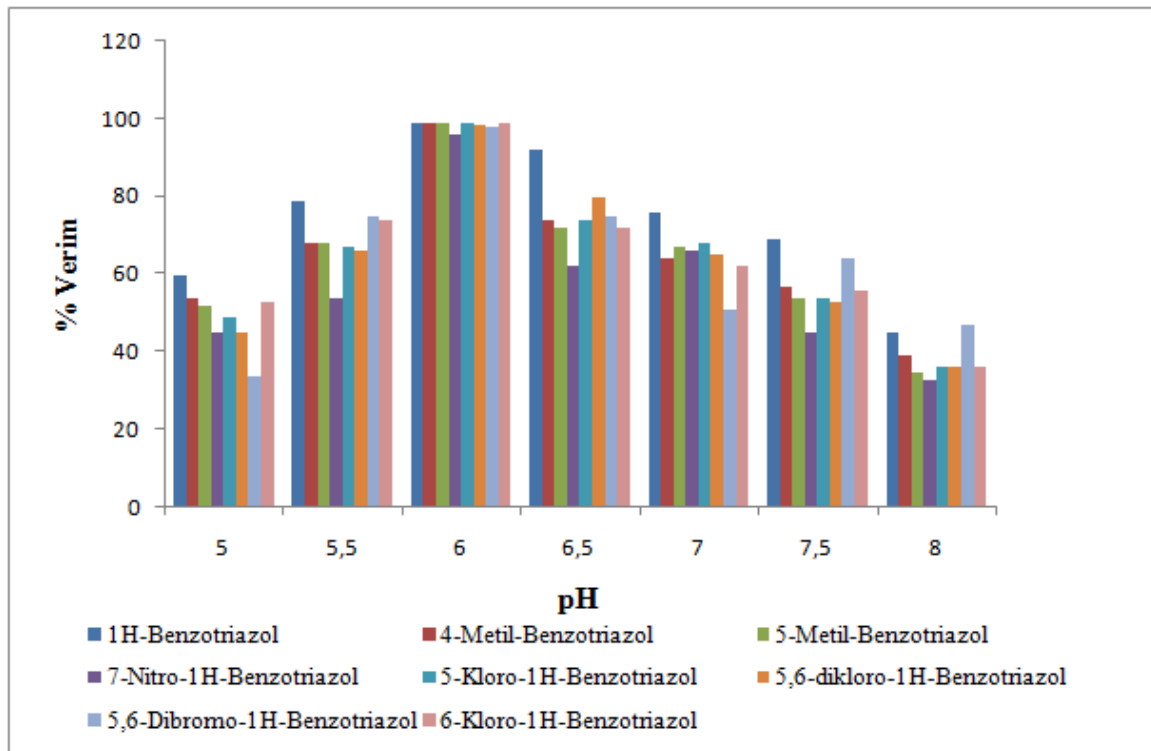
Her bir 1H-BT türevi için aynı konsantrasyonda ayrı ayrı pH değerleri için okunan pik alanı değerleri grafiğe geçirilerek en yüksek pik alanı değerine karşılık gelen optimum pH değeri belirlenmiştir. Bu değerlerden yola çıkarak örneklerde bulunması muhtemel o-FDA'lar göz önünde bulundurularak örneklerin analizlerinde kullanılacak en uygun pH değeri 6 olarak saptanmıştır. Bu pH değerlerinde 1H-BT standartları maksimum pik alanı vermektedir. Şekil 3.13'de 1H-BT türevlerin pH kalibrasyon grafiği verilmektedir.



Şekil 3.13 Standart 1H-BT türevlerin ekstraksiyon pH'ına karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik.

Metodu örneklerle uygulamadan önce ekstraksiyon pH'sının hesaplanmasının nedeni sulu fazda standartların moleküller halinde bulunduğu ve az çözündüğü pH'ın bulunmasıdır. Sulu

fazda molekül halde bulunan maddeyi en yüksek verimde organik faza alabiliriz. Şekil 3.14’de her bir standart için hesaplanan % pH verimleri pH’a karşı grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.14 Standart 1H-BT türevlerin ekstraksiyon pH’ına karşı % pH verim değişimini gösteren grafik.

3.1.5 Standart *o*-FDA’ların Örnek İçerisindeki Metot Geri Kazanımının Hesaplanması

Saç boyası ve boyanmış saç örneklerindeki *o*-FDA ve türevlerinin geri kazanım değerleri ve metot algılama limitlerinin hesaplanması için asit içerisindeki yaklaşık 0,30 g saç boyası ve boyanmış saç örneğine standart *o*-FDA ve türevlerini içeren standart çözeltilerden değişik miktarlarda alınarak örnekteki konsantrasyonları 1-100 ng/g olacak şekilde ilave edilmiştir. Standart ilavesi yapılan örneklerle metot uygulanıp analizleri yapıldıktan sonra *o*-FDA ve türevlerinin miktarları hesaplanmıştır. Standart ilavesi yapılmayan örneklerdeki *o*-FDA ve türevlerinin miktarlarının da hesaba katılmasıyla belirlenen miktarların başlangıçtaki miktarlara oranından uygulanan metodun geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik 3.1 kullanılmıştır. Ayrıca standart çözeltiler ilaveleri yapılmış saç boyası ve boyanmış saç örneklerinin analizlerinden elde edilen S/N oranları kullanılarak *o*-FDA ve türevleri için metot algılama limitleri (LOD) hesaplanmıştır. LOD değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik 3.2 kullanılmıştır. Saç boyası örneklerinin analizinde

uygulanan metot için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri, LOD, LOQ ve QI değerleri Çizelge 3.6’da verilmiştir.

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = [(M_x - M_y)/M] * 100 \quad (3.1)$$

M_x: Standart ilavesi yapılan kısımda tespit edilen bileşik miktarı

M_y: Standart ilavesi yapılmayan kısımda tespit edilen bileşik miktarı

M: Başlangıçta ilave edilen bileşik miktarı

$$\text{LOD (ng/g)} = M \text{ (ng)} * 3/(S/N)/ G \text{ (g)} \quad (3.2)$$

G: Örneklenen saç boyası/ boyanmış saç miktarı (g)

M: Başlangıçta ilave edilen madde miktarı (ng)

Çizelge 3.6 Saç boyası örneklerine uygulanan metot için *o*-FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

Bileşikler	Geri Kazanım (%) ± SS	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	QI
<i>o</i> -FDA	98,6 ±1,50	4,26	14,34	119, 91, 63
3-M- <i>o</i> -FDA	98,4 ±0,70	4,08	13,74	133, 104, 77
3-N- <i>o</i> -FDA	97,1±1,22	5,52	18,58	164, 136, 63
4-Cl- <i>o</i> -FDA	98,4 ± 1,55	3,76	12,66	153, 125,63
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	97,4±1,04	3,92	13,00	187, 159, 97

Boyanmış saç örneklerinin analizinde uygulanan metot için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri, LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Boyanmış saç örneklerine uygulanan metot için *o*-FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

Bileşikler	Geri Kazanım (%) ± SS	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
<i>o</i> -FDA	98,5 ± 0,70	5,41	18,21
3-M- <i>o</i> -FDA	97,9 ± 1,42	5,28	17,53
3-N- <i>o</i> -FDA	96,4 ± 1,75	6,01	20,23
4-Cl- <i>o</i> -FDA	98,2 ±1,70	5,21	17,14
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	97,5 ± 0,96	4,85	16,27

Mide suyu, meyve suyu ve çevre örneklerinde *o*-FDA ve türevlerinin geri kazanım değerleri ve metot algılama limitlerinin hesaplanması için, yaklaşık 5 mL mide suyu, 40 mL meyve suyu ve 100 mL çevre örneklerinden bilinen hacimlerde alınarak her bir kısmına standart *o*-FDA ve türevlerini içeren çözeltilerden değişik miktarlarda alınarak örnek içerisindeki konsantrasyonları 1-100 ng/mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Standart ilavesi yapılan örneklerle metot uygulanıp, analizleri yapılarak örneklerdeki *o*-FDA ve türevlerinin miktarları hesaplanmıştır. Standart ilavesi yapılmayan örneklerde bulunan *o*-FDA ve türevlerinin de hesaba katılmasıyla, belirlenen miktarların başlangıçtaki ilave edilen miktarlara oranından uygulanan metotlar için *o*-FDA ve türevlerinin geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik 3.1 kullanılmıştır. Ayrıca standart çözelti ilavesi yapılmış örneklerin analizinden elde edilen S/N oranları kullanılarak *o*-FDA ve türevleri için metot algılama limitleri (LOD) hesaplanmıştır. LOD değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik 3.3 kullanılmıştır.

$$\text{LOD (ng/mL)} = M \text{ (ng)} * 3 / (S/N) / V \text{ (mL)} \quad (3.3)$$

V: Örneklenen mide suyu/meyve suyu/ çevre örneği miktarı (mL)

M: Başlangıçta ilave edilen bileşik miktarı (ng)

Çevre örneklerinin analizinde uygulanan metot için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri ve LOD değerleri Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8 Çevre örneklerine uygulanan metot için *o*-FDA’ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

Bileşikler	Geri Kazanım (%) ± SS	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
<i>o</i> -FDA	98,8 ±1,74	0,04	0,13
3-M- <i>o</i> -FDA	99,1 ± 1,68	0,04	0,13
3-N- <i>o</i> -FDA	97,9 ± 2,00	0,05	0,16
4-Cl- <i>o</i> -FDA	98,5 ±1,63	0,03	0,10
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	98,0± 0,52	0,03	0,12

Meyve sularının analizinde uygulanan metot için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri, LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9 Meyve suyu örneklerine uygulanan metot için *o*-FDA'ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

Bileşikler	Geri Kazanım (%) $\pm$ SS	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
<i>o</i> -FDA	99,0 $\pm$ 1,90	0,03	0,11
3-M- <i>o</i> -FDA	98,8 $\pm$ 0,92	0,04	0,14
3-N- <i>o</i> -FDA	97,2 $\pm$ 1,76	0,06	0,20
4-Cl- <i>o</i> -FDA	98,9 $\pm$ 0,67	0,02	0,07
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	97,6 $\pm$ 1,22	0,02	0,08

Mide sularının analizinde uygulanan metot için hesaplanan geri kazanım yüzdeleri, LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10 Mide suyu örneklerine uygulanan metot için *o*-FDA'ların geri kazanım, LOD ve LOQ değerleri.

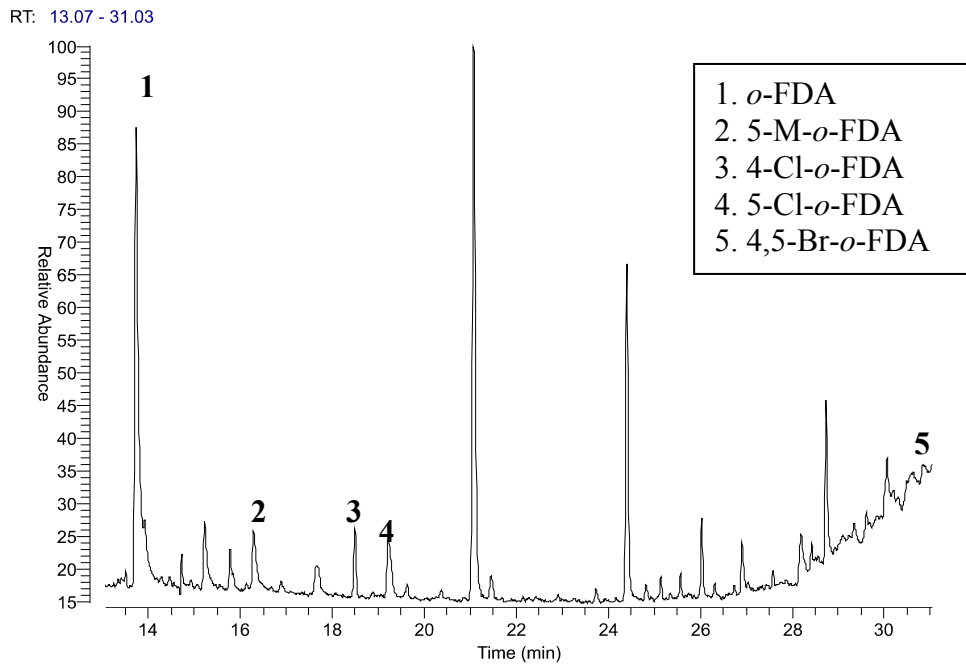
Bileşikler	Geri Kazanım (%) $\pm$ SS	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
<i>o</i> -FDA	98,1 $\pm$ 1,10	0,02	0,07
3-M- <i>o</i> -FDA	98,1 $\pm$ 1,17	0,01	0,04
3-N- <i>o</i> -FDA	96,9 $\pm$ 1,34	0,06	0,20
4-Cl- <i>o</i> -FDA	97,8 $\pm$ 0,95	0,01	0,04
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	97,9 $\pm$ 1,01	0,02	0,07

Örnekler içerisindeki *o*-FDA ve türevlerinin geri kazanım değerlerinden ve kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak saç boyası, boyanmış saç, meyve suyu, mide suyu ve çevre örneklerinde bulunan *o*-FDA ve türevlerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Standart *o*-FDA'ları bulunmayan 5-M-*o*-FDA, 5-Cl-*o*-FDA ve 4,5-Br-*o*-FDA konsantrasyonları yukarı değerler gözönünde bulundurularak hesaplanmıştır.

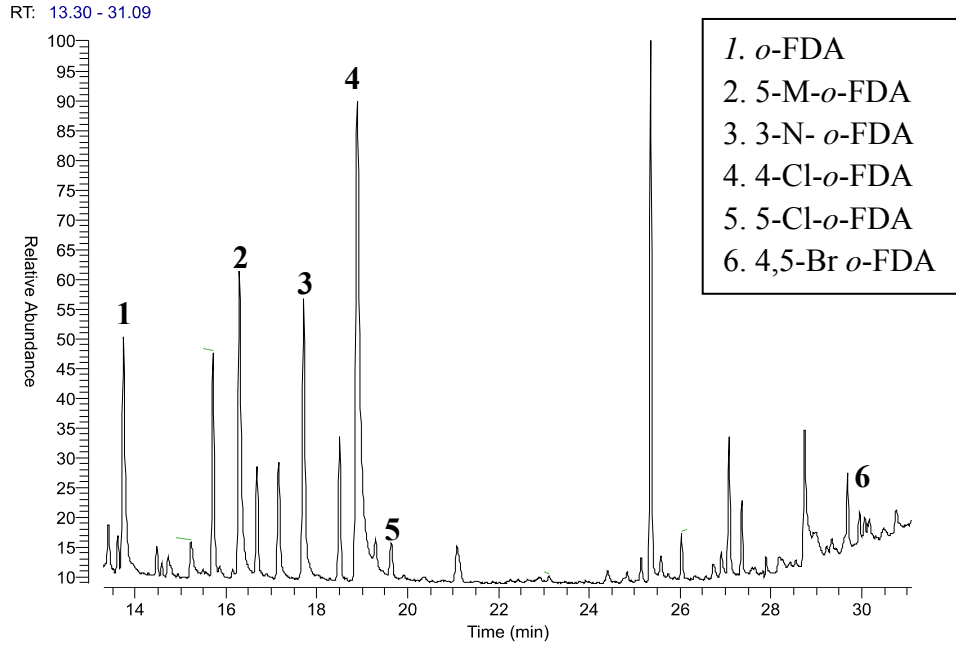
3.1.6 Saç Boyası Örneklerindeki *o*-FDA ve Türevleri

Saç boyası örnekleri HCl içerisinde hidroliz edilerek örnek içerisinde bulunan *o*-FDA türevlerinin sulu faza geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra pH'sı 1'e ayarlanıp, çöken maddeler süzme işlemiyle ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ön ekstraksiyon işlemi ile ortamda bulunan

safsızlıklardan kurtulunması sağlanmıştır. Bu çalışmada önerilen metot 15 farklı saç boyası örneğine uygulandıktan sonra elde edilen GC-MS sonuçlarına göre, standartların alıkonma zamanlarından ve GC-MS kütüphanesinden yararlanılarak örnek içerisindeki *o*-FDA'lar tespit edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinden ve saç boyası örnekleri için belirlenen geri kazanım değerlerinden yararlanılarak bileşiklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Şekil 3.15 ve 3.16'da bazı saç boyası örneklerinin GC-MS kromatogramları gösterilmiştir. Ayrıca örnek olarak bir saç boyası örneğinde belirlenen 7-N-1*H*-BT'nin kütle spektrumu Şekil 3.17'de verilmiştir. İncelenen saç boyası örneklerindeki *o*-FDA'ların konsantrasyonları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

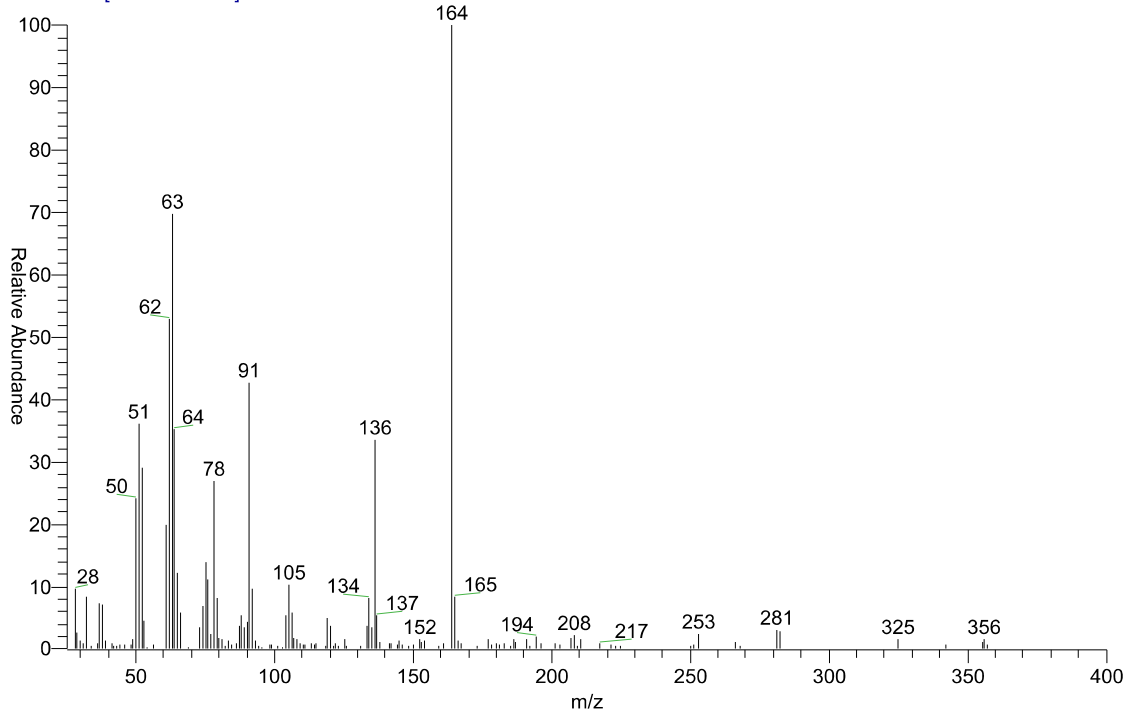


Şekil 3.15 Saç boyası örneği GC-MS kromatogramı.



Şekil 3.16 Saç boyası örneği GC-MS kromotogramı.

sacboyasi1005042013
T: + c Full ms [25.00-400.00]



Şekil 3.17 Saç boyası örneğinde boyası örneğinde belirlenen 7-N-1H-BT'nin kütle spektrumu.

Çizelge 3.11 Saç boyası örneklerinde belirlenen *o*-FDA'lar ve konsantrasyonları (µg/g).

Standart <i>o</i> -Fenilendiaminler	SB-1	SB-2	SB-3	SB-4	SB-5	SB-6	SB-7	SB-8	SB-9	SB-10	SB-11	SB-12	SB-13	SB-14	SB-15
	Kahve				Altın sarısı			Koyu kestane		Siyah			Kızıl		Mor
<i>o</i> -FDA	24,14	4,85	24,97	11,15	1,44	2,01	13,20	0,86	1,11	8,66	1,01	0,81	1,29	0,04	0,05
3-M- <i>o</i> -FDA	-	-	6,13	-	-	0,05	-	-	-	3,59	-	-	-	0,02	-
5-M- <i>o</i> -FDA	2,10	3,41	3,39	7,56	1,60	0,03	4,20	5,12	-	3,71	1,75	-	4,97	-	0,01
4-Cl- <i>o</i> -FDA	2,35	0,64	1,41	22,99	-	-	0,04	0,22	-	0,87	0,33	0,10	1,18	-	-
5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	-	-	3,03	1,60	-	0,18	1,12	18,92	0,24	-	0,04	-	-	-
3-N- <i>o</i> -FDA	-	-	-	36,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	3,96	3,46	-	4,93	-	-	-
4,5-Br- <i>o</i> -FDA	-	7,61	2,04	4,87	-	0,03	0,10	-	-	0,29	10,83	-	-	-	4,60
Toplam Konsantrasyon (µg/g)	28,59	16,5	37,9	86,0	4,64	2,12	17,7	7,32	24,0	20,8	13,9	5,88	7,44	0,06	4,66

İncelenen tüm numuneler içerisinde en yüksek toplam *o*-FDA ve türevlerinin konsantrasyonu (86,02 µg/g) kahve saç boyasında ve en düşük toplam *o*-FDA'ların konsantrasyonu ise (0,06 µg/g) kırmızı saç boyasında bulunmuştur. Literatürde (Cosmetology 1993) 4-N-*o*-FDA kahve saç boyalarında kullanıldığı belirtilmektedir. Bu çalışmada da kahve saç boyasında en yüksek *o*-FDA konsantrasyonunun diğer nitro türevi 3-N-*o*-FDA'ya (36,42 µg/g) ait olduğu görülmüştür. Akyuz ve Ata (2008) tarafından yapılan çalışmada saç boyası örneklerinde 1,66-8010 µg/g konsantrasyon aralığında *o*-FDA ve 0,02-22,4 µg/g konsantrasyon aralığında 4-Cl-*o*-FDA bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada 4-Cl-*o*-FDA konsantrasyonu (0,04-22,99 µg/g) Akyuz ve Ata tarafından belirlenen konsantrasyon aralığında bulunurken, *o*-FDA konsantrasyonunun (0,04-24,97 µg/g) düşük bulunduğu görülmüştür. *o*-FDA konsantrasyonundaki farklılığın incelenen saç boyalarının farklı markalar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Wang et al. (2005), saç boyalarında aromatik aminleri belirledikleri çalışmada *o*-FDA (0,28 µg/mL) ve 4-M-*o*-FDA'ya (0,44 µg/mL) rastlamışlardır. Yapılan çalışmada da analiz edilen örneklerde 4-M-*o*-FDA'nın izomerleri olan 3-M-*o*-FDA (0,02-6,13 µg/g) ve 5-M-*o*-FDA (0,01-7,56 µg/g) varlığı tespit edilmiştir. Örneklerde 4,5-Cl-*o*-FDA (3,46-3,93 µg/g) ve 4,5-Br-*o*-FDA (0,03-10,83 µg/g) olduğu belirlenmiştir. 4,5-Cl-*o*-FDA ve 4,5-Br-*o*-FDA türevlerinin belirlenmesi ile ilgili saç boyalarında yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Saç boyalarında renk farklılığına göre *o*-FDA'ların toplam konsantrasyonunda açık renk saç boyalarında koyu renk saç boyalarına göre azalma görülmüştür. Buna göre altın sarısı saç boyasında 2,12-17,7 µg/g, kahve saç boyasında 16,5 µg/g, koyu kestane saç boyasında 7,32-24 µg/g konsantrasyonunda *o*-FDA'lar bulunurken, kırmızı ve mor saç boyasında da düşük konsantrasyonda bulunmuştur.

Saç boyası ürünlerinin deri tarafından emildiği ve vücut içinde çeşitli reaksiyonlar ile aromatik aminlere dönüştüğü birçok çalışmada belirtilmektedir (Weiss and Angerer 2002). Saç boyalarında bulunan *o*-FDA'ların deriyle temas ettiğinde alerjik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir (Andrisano 1994).

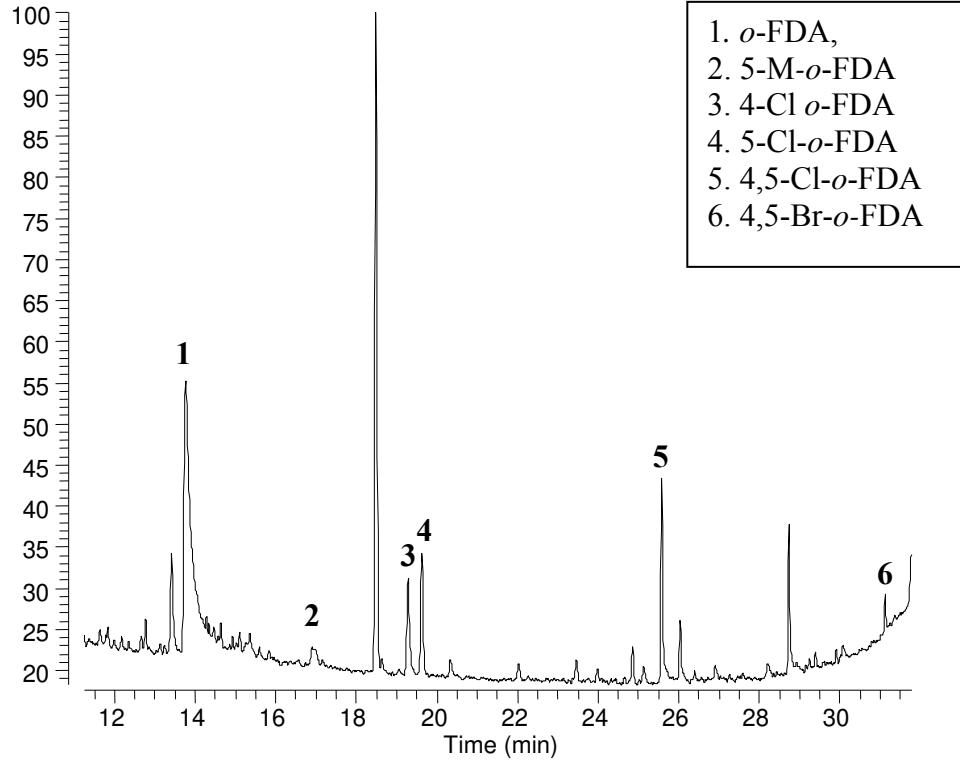
o-FDA'ların düşük konsantrasyonda dahi kanserojenik etkiye neden olduğu bilinmektedir. *o*-FDA türevleri arasında kanserojenik etkiye sahip, insan sağlığı açısından en zararlı bileşikler arasında olduğu düşünülen 4-Cl-*o*-FDA (US Department of Health 1978) bu çalışmada analizi yapılan saç boyalarında belirlenmiştir. *o*-FDA'lar sağlık açısından tehlikeli olarak

görüldüğünden Almanya başta olmak üzere birçok ülkede saç boyası içeriklerinde kullanımı yasaklanmıştır (Economy 2009).

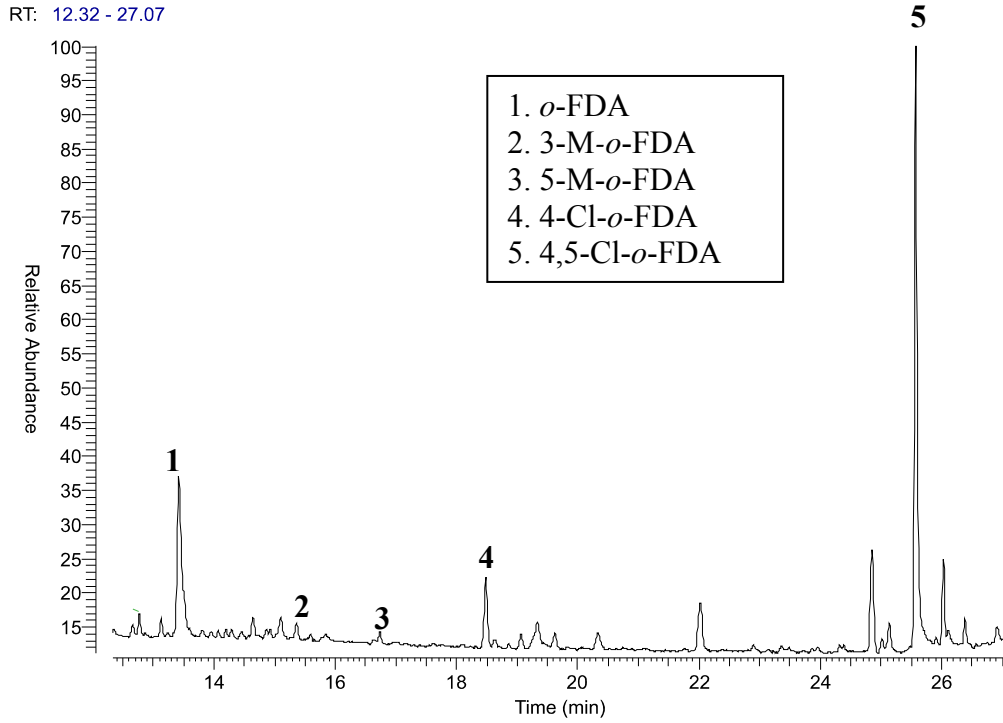
Saç boyalarının analizlerinde belirlenen *o*-FDA ve türevlerinin, boya içeriklerinde direk olarak, izomerlerinin yanında başarısız saflaştırmadan dolayı veya oksidasyon ürünü olarak saç boyalarında bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

3.1.7 Boyanmış Saç Örneklerindeki *o*-FDA ve Türevleri

Boyanmış saç örneklerine metot uygulandıktan sonra ilgili *o*-FDA'ların belirlenmesi için GC-MS analizleri yapılmıştır. Metot uygulanmadan önce saç örnekleri asitte denatüre edilerek boyanmış saç içerisinde bulunan *o*-FDA'ların sulu faza geçmesi sağlanmıştır. Sulu fazdaki *o*-FDA bileşiklerine optimize edilen metot uygulanmıştır. Örnekler içerisindeki *o*-FDA bileşikleri, standartların alıkonma zamanlarının karşılaştırılması ve kütle spektrumlarının yorumlanması ile belirlenmiştir. Örnek içerisindeki miktarları standartlar için hazırlanan kalibrasyon eğrisinden ve örnek içerisindeki geri kazanım değerleri yardımıyla hesaplanmıştır. Boyanmış saç örnekleri içinde ki *o*-FDA'ların konsantrasyonları Çizelge 3.12'de ve örneklerine ait GC-MS kromatogramları Şekil 3.18 ve 3.19'da verilmiştir. Boyanmış saç örneğinde bulunan 1*H*-BT'nin kütle spektrumu Şekil 3.20'de gösterilmiştir.



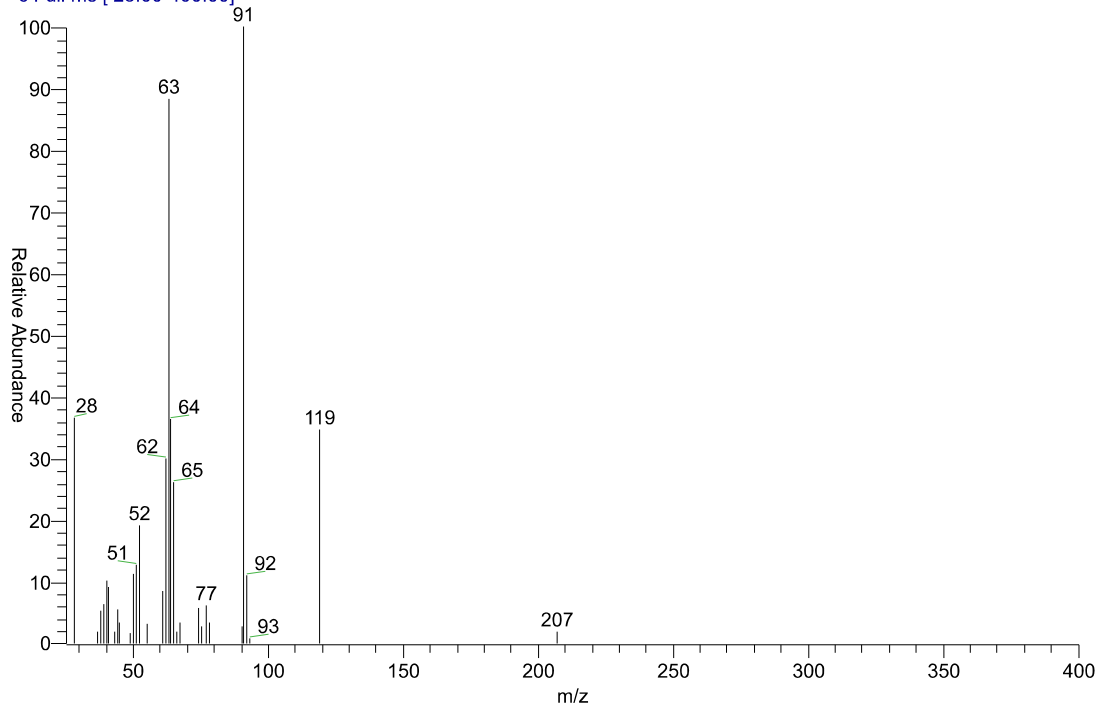
Şekil 3.18 Boyanmış saç örneği GC-MS kromatogramı.



Şekil 3.19 Boyanmış saç örneği GC-MS kromatogramı.

sac5 #923

T: + c Full ms [25.00-400.00]



Şekil 3.20 Boyanmış saç örneğinde belirlenen 1H-BT'nin kütle spekturumu.

Çizelge 3.12 Boyanmış saç örneklerinde belirlenen *o*-FDA'lar ve konsantrasyonları (µg/g).

Standart <i>o</i> -Fenilendiaminler	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9
	Kızıl		Sarı		Kahve			Siyah	
mg/g									
<i>o</i> -FDA	-	4,12	-	0,36	28,5	2,97	10	11,72	4,88
3-M- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	-	-	14,72	-	-
5-M- <i>o</i> -FDA	3,19	-	-	-	-	0,56	5,08	-	1,64
4-Cl- <i>o</i> -FDA	-	2,14	-	-	-	2,10	6,8	-	11,56
5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	-	0,28	-	-	2,15
3-N- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	7,57	12,14	-	-	-	3,87	356	1,98	-
4,5-Br- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	8,6	-	12,5	-	-
Toplam Konsantrasyon (µg/g)	10,76	18,4	-	0,36	37,1	9,78	405,1	13,7	20,23

Boyanmış saç örnekleri incelendiğinde *o*-FDA türevlerinin en yüksek toplam konsantrasyonda kahve saç örneğinde (405,1 µg/g), en düşük toplam konsantrasyonda ise sarı saç örneğinde (0,36 µg/g) bulunmuştur. Saç boyası örneklerinin sonuçlarına paralel olarak kahve ve siyah saç örneklerinde, sarı ve kızıl saç örneklerine göre daha yüksek konsantrasyonda *o*-FDA türevleri tespit edilmiştir. Akyuz ve Ata (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, boyanmış saç örneklerinde 4-Cl-*o*-FDA 0,02-13,57 µg/g arasında belirlenmiştir (Akyuz and Ata 2008). Bu çalışmada ise saç boyası içeriğinde sıklıkla kullanılan fakat kanserojenik etkisinden dolayı sınırlamalar getirilen 4-Cl-*o*-FDA 2,10-11,56 µg/g konsantrasyon aralığında belirlenmiştir. Zhou et al. (2004), *o*-FDA belirlenmesi için saç boyalarında yaptıkları çalışmada 1,27-1,47 µg/mL *o*-FDA tespit etmiştir. Bu çalışmada ki örneklerde 0,36-11,72 µg/g konsantrasyonlarında *o*-FDA bulunmuştur. İncelenen boyanmış saç örneğinin bir tanesinde 3-M-*o*-FDA belirlenmiştir. Örneklerde 5-M-*o*-FDA konsantrasyonları 0,56-5,08 µg/g aralığında bulunmuştur.

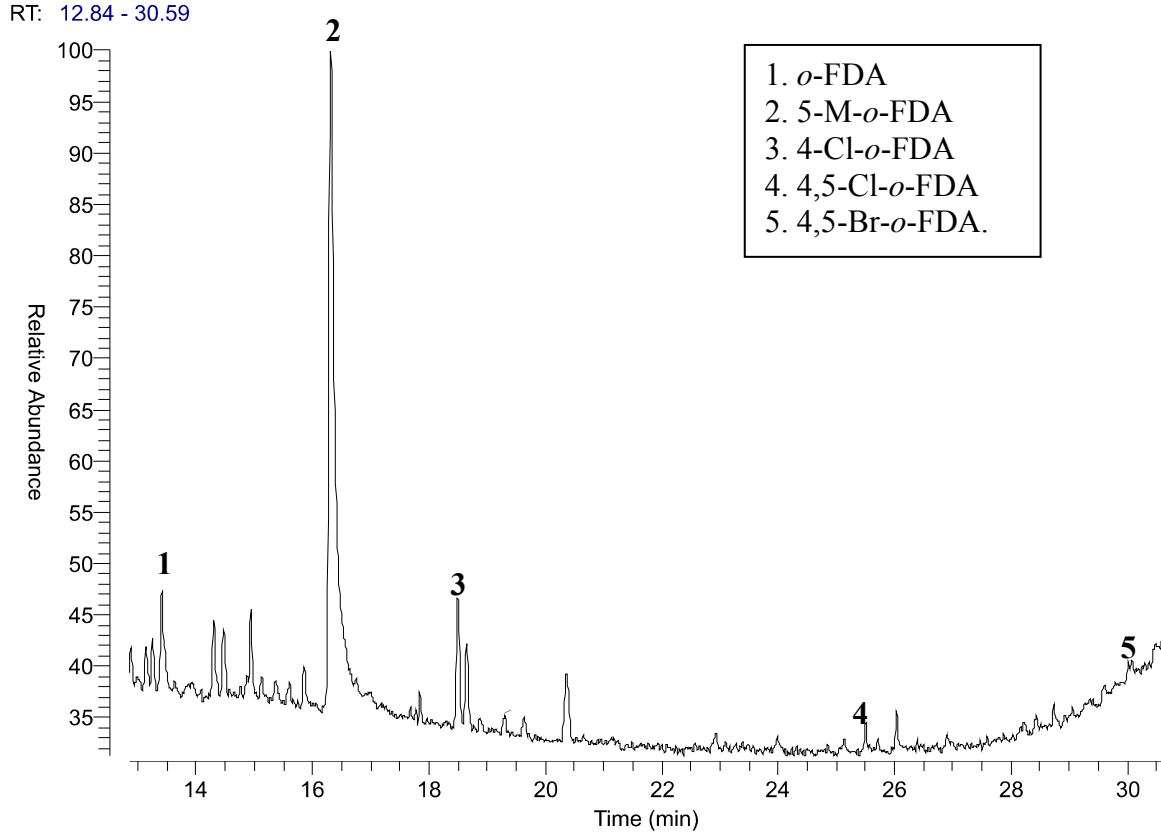
Benzer renklere sahip farklı saç boyası örneklerinde yapılan çalışmada değişik çeşitlilikte ve konsantrasyonda *o*-FDA'lar tespit edilmiştir. Saç boyalarında aynı rengi sağlayan farklı *o*-FDA türevleri mevcut olup bu maddelerin ucuz oluşu, kolay elde edilebilmesi gibi etkenlerin boya içeriklerinde farklılığın oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Fenilendiamin türevlerinin özellikle klorlu türevleri yüksek alerjik etkiye sahiptir. Kuaförlerde meslek alerjisine de *o*-FDA'lar da neden olduğu belirtilmektedir. Andrisano (1995) oksidasyon saç boyalarında bulunan ve alerjik reaksiyonlarda sorumlu olan *p*-FDA'nın sentez ve yıkım işlemleri sırasında oluşan *o*-FDA alerjik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Andrisano 1995). *o*-FDA boya içerisinde direk bulunabileceği gibi *p*-FDA izomeri olarak da saç boyalarına karışabilmektedir.

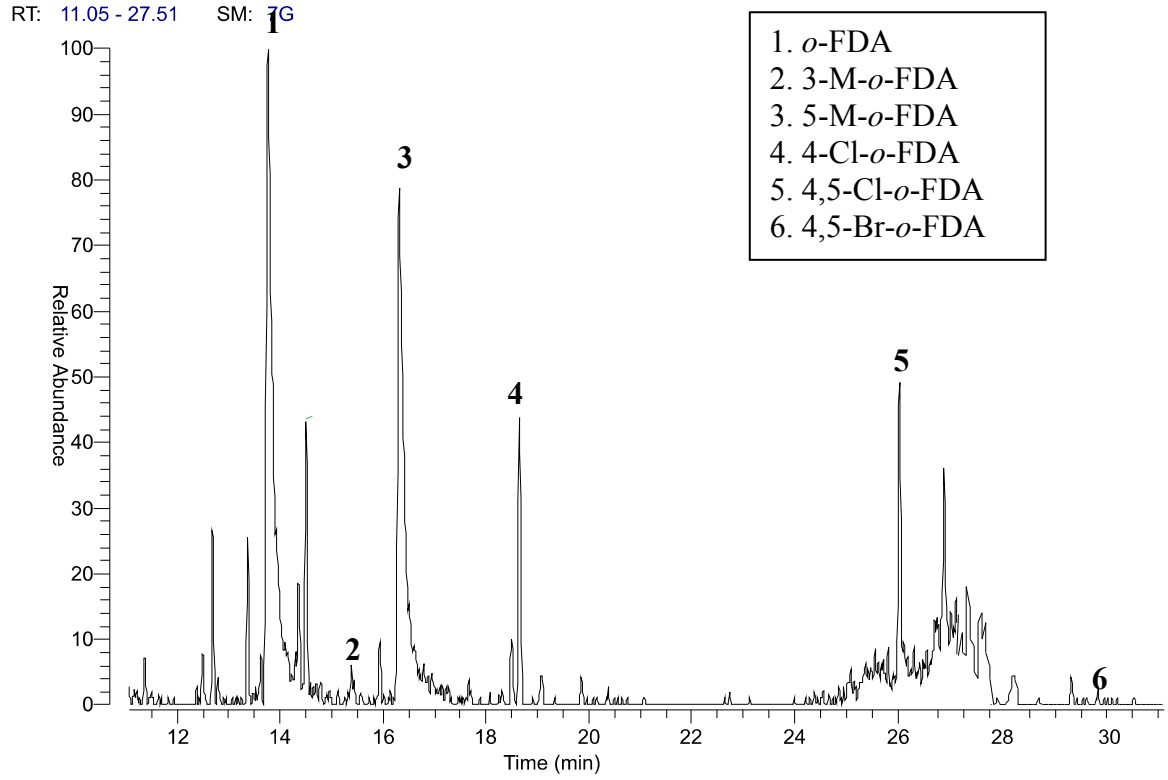
3.1.8 Çevre Örneklerindeki *o*-FDA ve Türevleri

Deniz suyu, dere suyu ve endüstri atık suyu örneklerine metot uygulanmadan önce pH'ı fosfat tamponu ile 6'ya ayarlanarak ortamda var olma ihtimali olan 1*H*-BT türevleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Örnekler bilinen metot uygulandıktan sonra ortamda bulunan *o*-FDA'ları, standartların GC-MS'te alıkonma zamanlarından ve GC-MS kütüphanesi verilerinden yararlanılarak bulunmuştur. *o*-FDA'ların miktarları oluşturulan kalibrasyon grafiği ve çevre örnekleri için belirlenen geri kazanım değerleri yardımıyla hesaplanmıştır. 15 farklı çevre

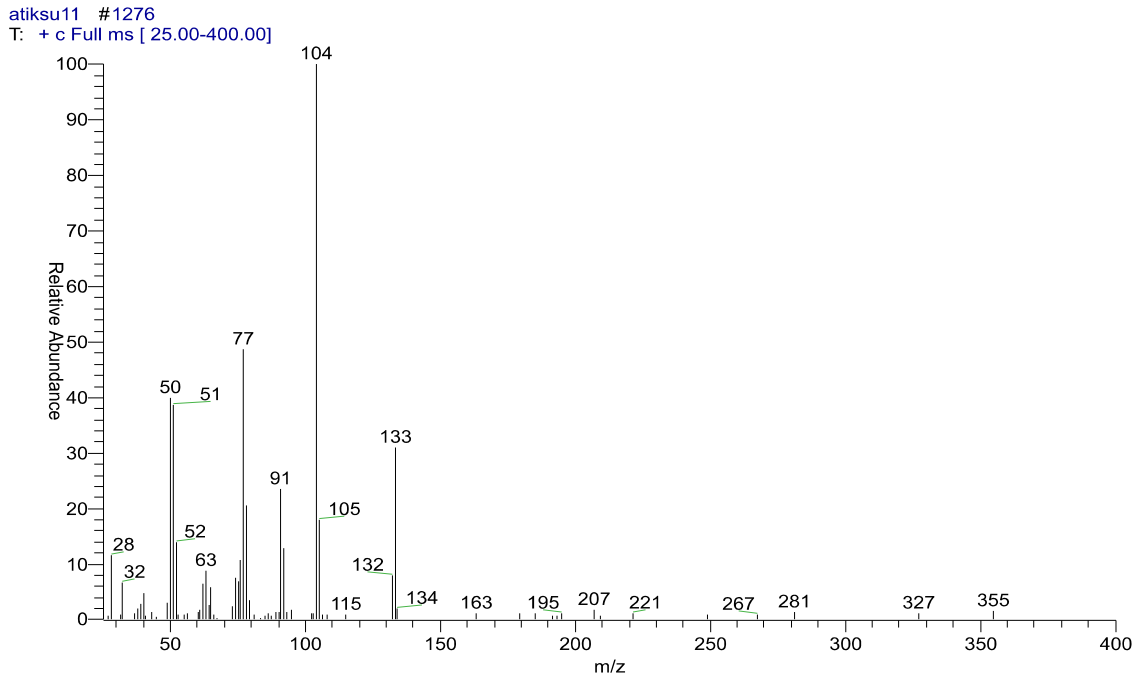
örneğine önerilen metot uygulanmıştır. Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de çevre örneklerinin GC-MS kromatogramı bulunmaktadır. Ayrıca örnek olarak çevre örneğinde belirlenen 5-M-1H-BT’nin kütle spektrumu Şekil 3.23’de verilmiştir. Çevre örnekleri içerisinde bulunan *o*-FDA’ların konsantrasyonları Çizelge 3.13’de verilmiştir.



Şekil 3.21 Çevre örneği GC-MS kromatogramı.



Şekil 3.22 Çevre örneği GC-MS kromatogramı.



Şekil 3.23 Çevre örneğinde belirlenen 5-M-1H-BT'nin kütle spektrumu.

Çizelge 3.13 Çevre örneklerinde belirlenen *o*-FDA'lar ve konsantrasyonları (µg/l).

Standart <i>o</i> -Fenilendiaminler	Ö-1	Ö-2	Ö-3	Ö-4	Ö-5	Ö-6	Ö-7	Ö-8	Ö-9	Ö-10	Ö-11	Ö-12	Ö-13	Ö-14	Ö-15
	Deniz suyu				Endüstriyel atık su					Nehir suyu					
<i>o</i> -FDA	3,50	4,53	3,83	4,22	1,42	0,37	2,25	0,93	0,70	4,51	1,30	5,26	1,75	0,35	1,01
3-M- <i>o</i> -FDA	-	-	-		-	-	1,90	-	1,34	1,10	-	0,89	-	-	-
5-M- <i>o</i> -FDA	0,17	5,28	-	6,67	3,79	5,00	6,62	-	2,89	8,60	-	5,26	14,17	-	-
4-Cl- <i>o</i> -FDA	-		5,91	-	-	-	1,09	-	-	7,89	-	0,12	7,45	8,91	-
5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	2,43	0,39	-	6,38	14,53	-	-	-	-	-		-	-	-
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	-	-	3,61	-	-	4,98	-	2,51	2,41	0,51	2,01	0,51	-	-
4,5-Br- <i>o</i> -FDA	5,36	-	1,28	6,77	-	19,86	14,24	17,93	-	20,97	-	15,56	4,66	2,69	1,34
Toplam Konsantrasyon (µg/l)	9,03	12,2	11,4	17,3	11,6	39,8	31,1	18,9	7,44	45,5	1,81	29,1	28,5	11,9	2,35

Deniz suyu, boya endüstriyel atık suyu ve nehir suyu örneklerinde GC-MS analizlerinde *o*-FDA türevleri belirlenmiş olup, örneklerde bulunan *o*-FDA'ların konsantrasyonları µg/l olarak Çizelge 3.9'da verilmiştir. Boyar madde üreten fabrikalardan alınan 5 farklı endüstriyel atık suyun analizlerinde *o*-FDA türevleri belirlenmiştir. Sun et.al (2009), boyar madde endüstrisi atık suyu üzerinde kapiler elektroforez kullanarak yaptıkları benzer çalışmada 14,05 µg/l konsantrasyonunda *o*-FDA tespit etmişlerdir. Metot için en düşük algılama limiti 5.4×10^{-3} µg/l'dir. (Sun et al. 2009). Bu çalışmada ise atık sularda belirlenen *o*-FDA konsantrasyonu 0,37-2,25 µg/l arasındadır. Atık su örneklerinde 3-M-*o*-FDA (1,34µg/l, 1,90 µg/l), 5-M-*o*-FDA (2,89-6,62 µg/l), 4-Cl-*o*-FDA (1,09 µg/l), 5-Cl-*o*-FDA (6,38µg/l, 14,53 µg/l), 4,5-Cl- *o*-FDA (4,98µg/l) ve 4,5-Br-*o*-FDA (14,24-19,86 µg/l) türevleride belirlenmiştir. *o*-FDA'ların boya endüstrisinde ham madde olarak kullanılması ve aynı zamanda bu sanayilerin yan ürünü olarak da oluşması bu sonuçları desteklemektedir (Wang et al. 2008a). Kago et al.(1980), endüstriyel atık sularda aromatik aminleri belirlemek için geliştirdikleri GC-MS metodu ile 1-3 µg/l konsantrasyon aralığındaki aromatik aminleri belirlenmişlerdir (Kago 1980). Bu çalışmada ise endüstriyel atık sularda belirlenen *o*-FDA'ların konsantrasyonu 0,17-20,97 µg/l arasındadır.

Tekstil sanayi ve boya sanayinde kullanılan azo boyar maddeleri çevrede çok kısa sürede bakteriyel bozunma sonucu kanser yapıcı aromatik aminlere dönüşmektedir (Donlon et al. 1997). Boya sanayinde kullanılan azo boyalarının anaerobik bakteriyel bozunması sonucu oluşan *o*-FDA türevlerinin bu sanayilerin atık sularına karıştığı düşünülmektedir.

Kozlu ve Zonguldak bölgelerinde Aralık-Nisan aylarında toplanan deniz suyu numuneleri analiz edilerek *o*-FDA'ların konsantrasyonları ve çeşitliliği arasındaki farklar belirlenmiştir. Zonguldak deniz suyu örneğinde aralık ayında belirlenen *o*-FDA'ların konsantrasyonu 3,61-6,77 µg/l aralığında ve nisan ayında yapılan analizlerde ise 0,17-5,36 µg/l konsantrasyonlarında *o*-FDA'lar tespit edilmiştir. Aralık ayında Kozlu deniz suyu numunesinde yapılan analizlerde 2,43-5,28 µg/l aralığında değişen konsantrasyonda, nisan ayında ise 0,39-5,91 µg/l konsantrasyon aralığında *o*-FDA'lar belirlenmiştir. Deniz suyu örneklerinde de aralık ve nisan ayı örneklerinde, *o*-FDA çeşitliliği ve konsantrasyonları arasında fark gözlemlenmiştir. Aralık ayında Zonguldak ve Kozlu deniz suyu örneklerinde *o*-FDA konsantrasyonları nisan ayına oranla daha yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Bu farklılığa kış aylarında atmosferik partikül ve havadaki *o*-FDA'ların yağmur ile birlikte denize karışmasının, denize dökülen dere suyundaki *o*-FDA konsantrasyonundaki değişimin

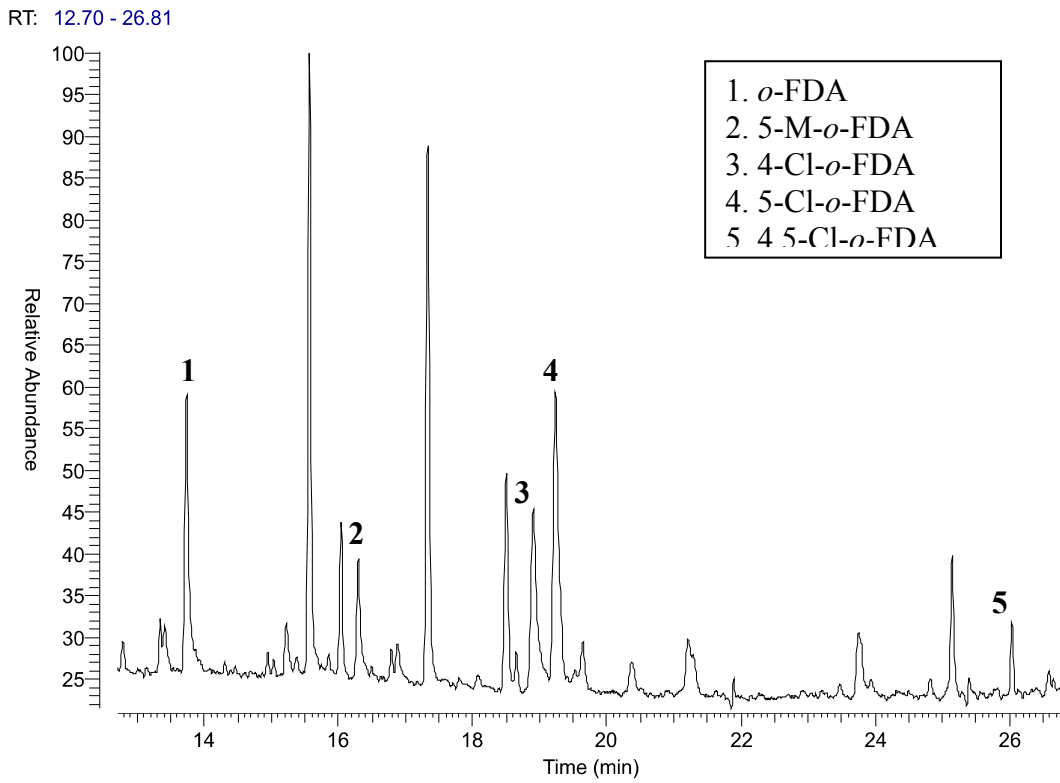
ve güneşli günlerde *o*-FDA'ların yükseltgenme ile hidroksil ve nitrolu bileşiklere dönüşmesinin neden olduğu düşünülmektedir. Müller et al. (1997), su örneklerinde aromatik aminlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada metodun en düşük algılama limiti 0,05 µg/l olarak belirlenmiştir (Müller et al. 1997). Bu çalışmada ise en düşük algılama limiti 0,01 ng/mL olarak belirlenmiş olup, deniz suyu numunesinde 0,17-6,77 µg/l konsantrasyon aralığında *o*-FDA'lar belirlenmiştir.

Zonguldak, Ankara ve Kozlu derelerinde aralık ve nisan aylarında alınan numuneler üzerinde yapılan analizlerde konsantrasyonları 0,89-20,97 µg/l arasında *o*-FDA'lar tespit edilmiştir. Akyuz ve Ata (2006) tarafından nehir suyu örnekleri üzerinde yapılan çalışmada *o*-FDA 4,23-11,47 ng/l, 3-M-*o*-FDA ise 46,86-108,25 ng/l konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada ise dere suyu örneklerinde belirlenen *o*-FDA konsantrasyonu 0,35-5,26 µg/l daha yüksek konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Ayrıca dere suyu örneklerinde 4-M-*o*-FDA'nın 3-M-*o*-FDA (0,89 µg/l, 1,10µg/l) ve 5-M-*o*-FDA (5,26-14,17 µg/l) gibi metil içeren türevleri de belirlenmiştir.

Aralık ayında Zonguldak, Ankara ve Kozlu nehir sularında sırasıyla belirlenen toplam *o*-FDA'ların konsantrasyonları 28,5 µg/l, 45,5 µg/l, 2,35 µg/l bulunurken nisan ayında sırasıyla 11,9 µg/l, 29,1 µg/l, 1,81 µg/l bulunmuştur. Aralık ve nisan aylarında dere sularında söz konusu bileşiklerin konsantrasyonlarındaki farklılığa deniz suyu örneklerinde de bahsettiğimiz etkenlerin sebep olduğu düşünülmektedir. Analiz sonuçlarını incelediğimizde Zonguldak ve Kozlu dere sularına oranla Ankara dere suyunda daha yüksek konsantrasyonda *o*-FDA'ların bulunması Ankara'nın daha fazla nüfus ve sanayi yoğunluğuna sahip olmasından dolayı daha yüksek miktarda evsel atık ve bazı atık suların dereye bırakıldığı fikrini vermektedir.

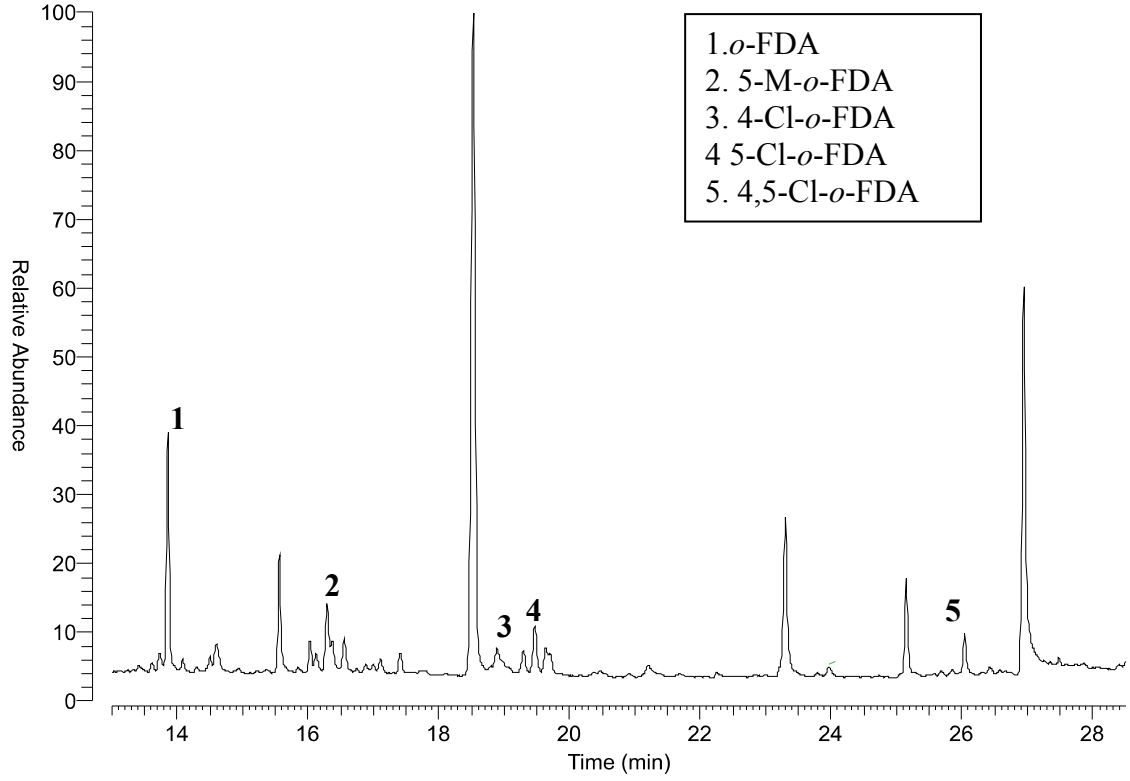
3.1.9 Gıda Örneklerindeki *o*-FDA ve Türevleri

Gıda örneği olarak 15 farklı meyve suyu örneği kullanılmıştır. Farklı marka ve çeşitte meyve suyu örnekleri toplanmış ve analizleri yapılmıştır. Örneklerdeki *o*-FDA'lar, standartların alıkonma zamanı ve kütle spektrumları yardımıyla aydınlatılmıştır. Belirlenen *o*-FDA'ların pik alanı değerleri kalibrasyon eğrilerinde yerine konularak miktarları belirlenmiştir. Örnekler için belirlenen konsantrasyonlar Çizelge 3.14'de verilmiştir. Meyve suyu örneklerinin GC-MS kromatogramları Şekil 3.24 ve Şekil 3.25'de ve bir meyve suyu örneğinde belirlenen 4-Cl-1*H*-BT'nin kütle spektrumu Şekil 3.26'da verilmiştir.



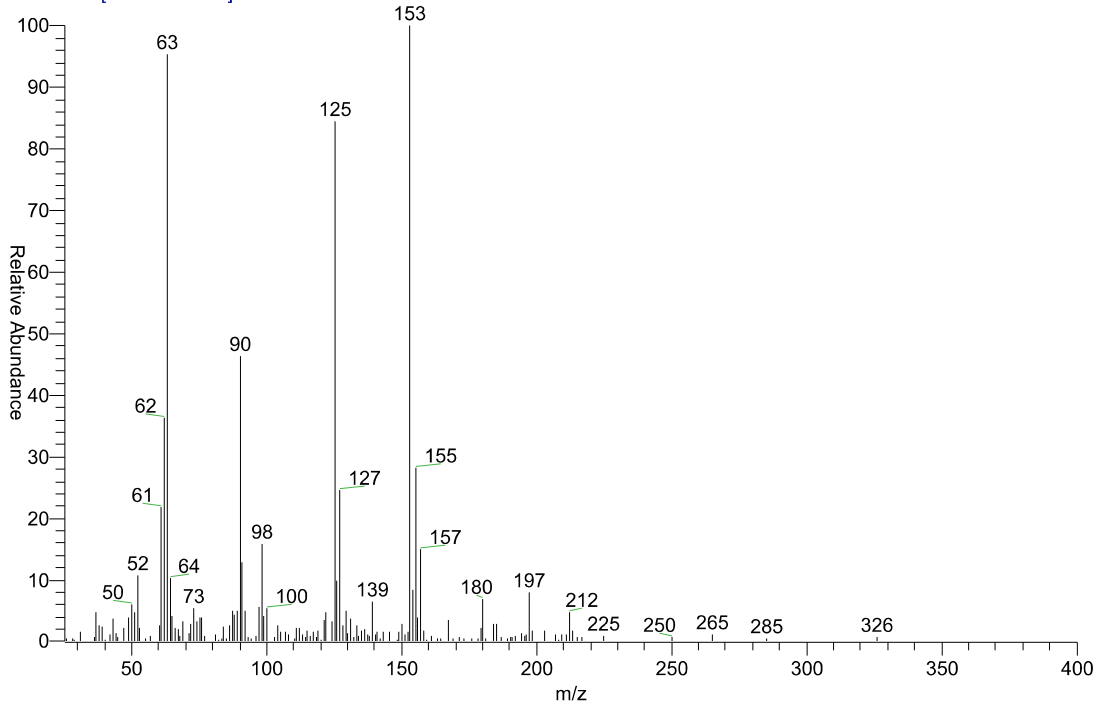
Şekil 3.24 Meyve suyu örneği GC-MS kromatogramı.

RT: 12.99 - 28.49



Şekil 3.25 Meyve suyu örneği GC-MS kromatogramı.

seftalisuyu040402013
T: + c Full ms [25.00-400.00]



Şekil 3.26 Meyve suyu örneğinde belirlenen 4-Cl-1*H*-BT'nin kütle spektrumu.

Çizelge 3.14 Meyve suyu örneklerinde belirlenen *o*-FDA'lar ve konsantrasyonları (µg/l).

Standart <i>o</i> -Fenilendiaminler	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6	G-7	G-8	G-9	G-10	G-11
	Karışık					Kayısı		Şeftali			Vişne
<i>o</i>-FDA	13,79	2,22	0,30	39,04	12,02	170	7,47	20,82	17,88	16,72	53,94
3-M-<i>o</i>-FDA	0,38	1,34	2,63	-	-	-	-	-	-	-	-
5-M-<i>o</i>-FDA	0,38	1,46	4,72	10,45	8,79	232	4,29	6,52	75,76	51,36	14,14
4-Cl-<i>o</i>-FDA	-	1,26	-	24,20	25,25	21,11	18,18	19,55	5,61	30,35	47,17
5-Cl-<i>o</i>-FDA	-	-	6,92	31,46	-	0,24	-	8,23	-	33,23	10,15
3-N- <i>o</i>-FDA	-	-	29,4	-	48,99	-	-	-	-	-	-
4,5-Cl- <i>o</i>-FDA	-	-	80,7	29,55	44,65	-	12,47	88,54	-	31,62	-
4,5-Br- <i>o</i>-FDA	-	-	453	-	51,77	170	-	-	47,33	-	-
Toplam Konsantrasyon (µg/l)	14,55	6,28	577,7	134,7	191,5	593,3	42,41	143,7	146,6	163,3	125,4

Zonguldak bölgesindeki marketlerden çeşitli markalara ait meyve suyu örnekleri toplanmış ve bu örneklerde *o*-FDA türevlerinin analizi yapılmıştır. Ayrıca karışık meyve suyu örneklerinde 5 farklı marka, şeftali suyu örneklerinde 3 farklı marka, kayısı örneklerinde 2 farklı marka ve vişne örneği alınarak hem meyve suyunun özelliği hem de marka karşılaştırılarak *o*-FDA konsantrasyonları belirlenmiştir. Meyve suyu analizlerini incelediğimizde en yüksek toplam *o*-FDA ve türevlerinin konsantrasyonu (593,3 µg/l) kayısı suyu örneğinde ve en düşük toplam *o*-FDA ve türevlerinin konsantrasyonu (6,28 µg/l) karışık meyve suyu örneğinde olduğu görülmüştür.

5 farklı karışık meyve suyunda toplam *o*-FDA'ların konsantrasyonlarının 6,28-577,7 µg/l arasında olduğu bulunmuştur. Aynı değişiklik diğer meyve suyu örneklerinde de görülmektedir. Bu farklılığın nedeni olarak, renklendirmek amaçlı farklı bileşikler ve gıda boyar maddeleri kullanıldığı düşünülmektedir. Şeftali suyunda farklılık gözlemlense de yüksek oran da bir değişim görülmemiştir. Şeftali suyu örneklerinde aranan *o*-FDA ve türevlerinin çoğunun olduğu gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmalarda sadece kahve saç boyasında bulunan 3-N-*o*-FDA 29,4 µg/l ve 48,99 µg/l konsantrasyonlarında iki farklı karışık meyve suyunda tespit edilmiştir. Sarı renklendirici olarak gıda ürünlerinde kullanılan Sunset Yellow FCF gıda boyasında *o*-FDA'nın belirlenmesi ile ilgili yapılan benzer çalışmada HPLC analizi sonucunda *o*-FDA 0,49 nM/l konsantrasyonunda bulunmuştur (Shelke et al. 2005). Bulunan bu analiz sonucu tespit edilen *o*-FDA sonuçlarımızı desteklemektedir. Bununla birlikte gıda ürünlerinde direk olarak *o*-FDA'nın belirlenmesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Gıda ürünlerinde kullanılan azo boyar maddeleri *o*-FDA gibi aromatik aminlerin diazolanmasıyla hazırlanmaktadır. Bu boyar maddeler anaerobik ortamda kanserojenik aromatik aminlere dönüşmektedir (Zhu et al. 2002). Analiz sonuçlarını incelediğimizde *o*-FDA türevleri direk olarak renklendirmek amacıyla da meyve suyu örneklerinde bulunduğu düşünülmektedir.

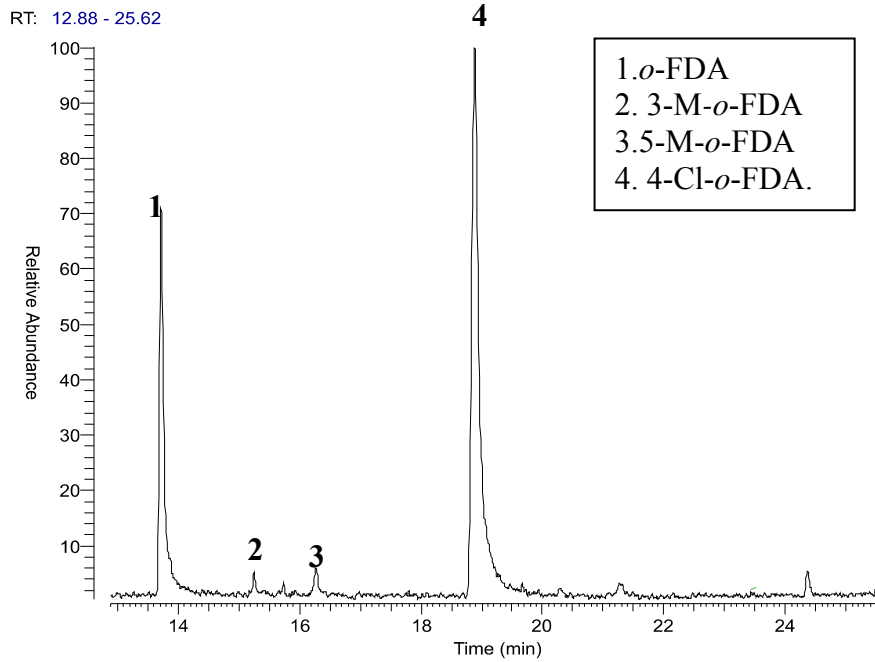
Gıdalarda bulunan aromatik aminler yüksek konsantrasyonlarda gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır. Meyve suyu örnekleri üzerinde Vieira et.al.(2007) tarafından portakal suyu örneklerinde aminlerin belirlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada türevlendirme reaktifi olarak ortofitaldialdehit (OPA) kullanılmış, floresans dedektör ile yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında amin analizleri gerçekleştirilmiştir ve ortalama 53.5 mg/l

konsantrasyonunda 9 adet amin belirlemişlerdir. Geliştirdikleri metodunun en düşük algılama limiti 3,85 mg/l'dir (Vieira et al. 2007). Bu metodun algılama limiti ise 0,01 ng/mL'dir.

Geliştirilen bu metot ile daha önce bununla ilgili herhangi çalışmada bulunmamasına rağmen meyve suyu örneklerine uygulanarak, bu örneklerde bulunan toksik özelliğe sahip *o*-FDA'ların ne seviyede bulunduğu belirlenmiştir.

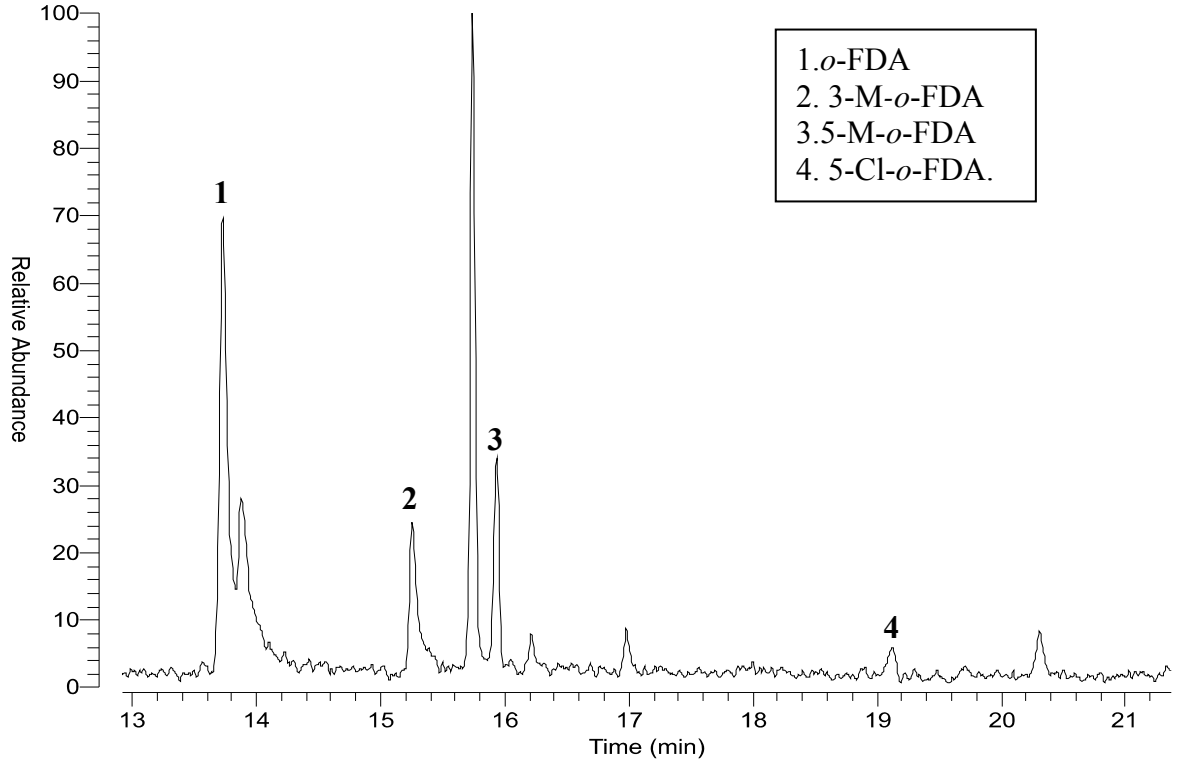
3.1.10 Mide Suyu Örneklerindeki *o*-FDA ve Türevleri

B.E.Ü Uygulama ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniğine başvuran ve tanı amacıyla endoskopi yapılan 16 hastadan *o*-FDA'ların kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması için mide sıvısı toplanmıştır. Örneklerden izole edilen *o*-FDA'lara metot uygulandıktan sonra elde edilen 1*H*-BT türevlerinin kromatogramlarındaki piklerinin alıkonma zamanları ile standart 1*H*-BT türevlerinin kromatogramlarındaki alıkonma zamanları karşılaştırılarak *o*-FDA'lar tespit edilmiştir. Şekil 3.27 ve 3.28'de mide suyu örneklerinin GC-MS kromatogramları verilmiştir. Ayrıca örnek olarak belirlenen 3-M-1*H*-BT'nin kütle spektrumu Şekil 3.29'da verilmiştir. Mide suyu örnekleri içerisinde bulunan *o*-FDA'ların konsantrasyonları ise Çizelge 3.15'de her bir örnek için ayrı ayrı verilmiştir.



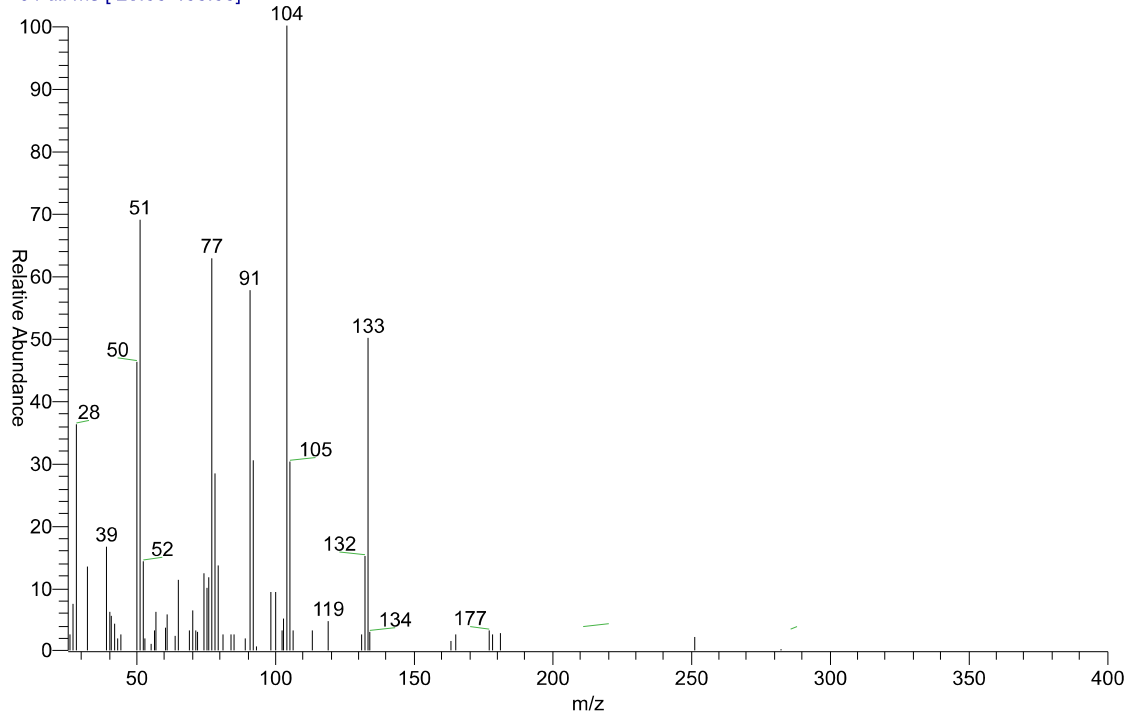
Şekil 3.27 Mide suyu örneği GC-MS kromatogramı.

RT: 12.91 - 21.36



Şekil 3.28 Mide suyu örneği GC-MS kromatogramı.

gulsenmidesuyu03042013
T: + c Full ms [25.00-400.00]



Şekil 3.29 Mide suyu örneğinde belirlenen 4-M-1H-BT'nin kütle spektrumu.

Çizelge 3.15 Mide suyu örneklerinde belirlenen *o*-FDA'lar ve konsantrasyonları (ng/mL).

Standart <i>o</i> -Fenilendiaminler	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8	M-9	M-10	M-11	M-12	M-13	M-14	M-15	M-16
<i>o</i> -FDA	1,21	-	339	-	781	-	-	-	-	-	218	20,67	440	78,31	111	18,44
3-M- <i>o</i> -FDA	15,74	80,72	197	-	4,44	16,45	3,70	-	-	-	23,81	22,96	92,43	34,71	67,61	4,14
5-M- <i>o</i> -FDA	0,04	-	-	-	0,69	2,72	-	-	-	63,37	52,31	-	-	29,47	18,74	9,54
4-Cl- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	0,38	74,17	-	-	-	-	66,6	-	0,52	62,97	-	-
5-Cl- <i>o</i> -FDA	-	320	0,16	-	-	-	-	-	-	2049	-	-	-	-	0,18	-
4,5-Cl- <i>o</i> -FDA	21,80	-	-	-	21,80	-	-	542	-	-	-	1105	-	2735	-	-
4,5-Br- <i>o</i> -FDA	-	-	-	-	-	-	14,87	471	378	-	-	-	-	295	8,74	-
Toplam Konsantrasyon (ng/mL)	38,8	400,7	536,2	-	808,3	93,3	18,6	1013	378	2112	360,1	1149	533	3235	206	32,1

Mide suyu örneklerine ait sonuçlar incelendiğinde en yüksek toplam *o*-FDA konsantrasyonunda 4,5-Cl-*o*-FDA (444,25 ng/mL) bulunurken, en düşük toplam konsantrasyonun da 5-M-*o*-FDA (176,9 ng/mL) bulunmuştur. Ayrıca en yaygın olarak 3-M-*o*-FDA dört örnek dışında diğer mide sularında 3,70-197 ng/mL konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin yanında örneklerde *o*-FDA (1,21-781 ng/mL), 4-Cl-*o*-FDA (204,6 ng/mL), 5-Cl-*o*-FDA (0,16-2049 ng/mL) ve 4,5-Br-*o*-FDA (21,80-2735 ng /mL) türevleri belirlenmiştir. Örneklerde *o*-FDA türevlerinin değişik konsantrasyonlarda bulunmasının nedeni hasta gruplarının farklı yaşam koşullarına sahip olması, *o*-FDA'lara maruz kaldıkları kaynaklarda bu bileşiklerin değişik konsantrasyon da bulunmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Mide suyu gibi biyolojik sıvılarda *o*-FDA izomeri olan *p*-FDA ile ilgili çalışma yapılırken, *o*-FDA'ların belirlenmesi ile ilgili literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Mide suyunda *p*-FDA'nın belirlenmesi için Stambouli et.al.(2004) tarafından yapılan çalışmada *p*-FDA, TFA ile türetildikten sonra GC-MS analizler sonucu mide sularında bulunan *p*-FDA belirlenmiştir. Mide suyu içerisinde 0,25 mg/l *p*-fenilendiamin bulunmuştur (Stambouli et al. 2004).

İnsan vücuduna bazı aromatik aminler çeşitli yollarla girebilmekte ve birçok zararlı etki göstermektedir. Özellikle *o*-FDA gibi aminler insanlara deri yoluyla kolaylıkla nüfuz etmektedir (Bronaugh 1984). Saç boyası gibi kozmetik ürünleri kullanan bireylerde bu tür bileşiklerin biyolojik sıvılarında belirlenmesi ve yüksek konsantrasyonda bulunması yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir. Wang et al (2003), saç boyası kullanan bayanların idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada *p*-FDA'yı belirlemiştir. Bu çalışmada da 15 farklı saç boyası örnekleri incelenmiş ve *o*-FDA ile birlikte diğer 6 türevinde bulunduğu görülmüştür (Wang et al. 2003). Bu sonuçlar doğrultusunda, saç boyasında bulunan *o*-FDA'ların *p*-FDA benzeri gibi biyolojik sıvılarda bulunması muhtemeldir. Saç boyasında içeriklerinde sıklıkla kullanılan *p*-FDA'ların sentez ve yıkım işlemleri sırasında da *o*-FDA oluşabilmektedir (Marzulli 1978). Mide suyu örneklerinde *o*-FDA'ların bulunması bu literatür bilgilerini desteklemektedir.

Çeşitli gıda ürünlerinde, tekstil sanayisinde, ilaç ve kozmetik ürünlerinde bulunan azo boya ile ilgili yapılan çalışmada, bu tür boyaların insan sağlığı açısından en büyük tehlikesinin tükürük, ter ve mide suyuyla toksik özellik gösteren aromatik aminlere dönüşebileceği belirtilmiştir (Pielesz 1999). *o*-FDA azo boya boyalarının bozunma ürünü olduğu

daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Garrigos et al. 2002). Literatür bilgileri *o*-FDA'ların vücutta metabolit olarak da bulunabileceği fikrini desteklemektedir.

o-FDA'lar ile ilgili yapılan çalışmalarda kanserojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Chen et al. 2006). Ayrıca *o*-FDA gibi aromatik aminler, vücut içerisinde bulunduğunda nitro dönüştürücü enzimlerle çeşitli dönüşümler geçirerek hücrelerde kanserin başlamasına öncülük etmektedir (Weiss and Angerer 2002).

Bu çalışmada meyve suyu örneklerinde yapılan analizler sonucu *o*-FDA türevlerini içerdiği belirlenmiştir. İncelenen mide suyu örneklerinde de *o*-FDA'ların tespit edilmesi renklendirici içeren meşrubat gibi çeşitli gıda ürünlerinde bu bileşiklerin kaynağının kullandıkları gıda ürünleri olabileceği düşünülmektedir.

Mide suyu örneklerinin genel analiz sonuçlarına bakıldığında belirlenen *o*-FDA'ların hem vücut içerisinde çeşitli bozunmalar sonucu hem dış etkiler ile vücuda karışan *o*-FDA'ların konsantrasyonu önerilen çok düşük konsantrasyonda dahi bu metot ile belirlenebileceği bu çalışma ile verilmektedir.

3.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERMELER

o-FDA türevleri, toksik ve mutajenik etkileri nedeni ile saç boyalarında, tekstil boyalarında, gıdalarda kullanımları kısıtlanmış veya yasaklanmıştır. Kullanımları boyalarda tamamen yasaklanmadığından dolayı sentez ve yıkım işlemleri sonucunda ortamda oluşabilmektedirler veya ortamda direk bulunmaktadırlar. Saç boyası, boyanmış saç, biyolojik sıvı, çevre ve gıda örneklerinde kanserojen ve mutajen etkileri bilinen *o*-FDA ve türevleri çok düşük konsantrasyonda bulunabileceklerinden dolayı söz konusu maddelerin analizlerine imkan sağlayan analitik metotların geliştirilmesi büyük önem kazanmaktadır. Bu çalışmada söz konusu maddelerin hassas ve spesifik olarak belirlenmesi için analitik bir metot geliştirilmiştir.

Metot; söz konusu bileşiklerin nitrit ile 1*H*-BT türevlerine dönüştürülmesi, 1*H*-BT türevlerinin örneklerden ekstraksiyonu ve GC-MS analizlerini içermektedir.

Çalışmanın sonucunda saç boyası ve boyanmış saç örneklerinde önerilen metot uygulanarak *o*-FDA'lar belirlenmiştir. Siyah, kahve ve koyu kestane gibi daha koyu renk ağırlıklı saç boyalarında *o*-FDA'lar diğer boya örneklerine göre nispeten daha fazla miktarda ve çeşitlilikte olduğu görülmüştür. Bu türevlerin varlığı farklı marka saç boyalarına göre değişiklik göstermektedir. Saç boyası markalarındaki değişik renklerin analizi sonucunda, ucuz ve yaygın olarak kullanılan saç boyası ürünlerinde toksik ve kanserojen *o*-FDA'ların daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle kalıcı saç boyaları yerine doğal boyalar ya da açık renk saç boyaları tercih etmenin insan sağlığı açısından daha iyi bir seçim olacaktır.

Çevre örnekleri analiz sonuçlarını incelediğimizde boyar madde atık sularında 0,37-2,25 µg/l konsantrasyonunda *o*-FDA bütün örneklerinde olmak üzere diğer türevleride örneklerde hassas bir şekilde belirlenmiştir. Deniz suyu ve dere suyu örneklerinin sonuçlarında ise *o*-FDA'ların konsantrasyonlarının kış aylarında yaz aylarına oranla arttığı gözlemlenmiştir. Bu farklılığın nedeni havada biriken bazı maddelerin yağmur ve kar ile denize karışması veya güneş ışığının etkisi ile *o*-FDA'ların yükseltgenme ile hidroksil ve nitrolu bileşiklere dönüşmesi neden olabilir. Sonuçlar, önerilen metodun söz konusu *o*-FDA'ların çevre örneklerinde hassas ve spesifik belirlenmesi için kullanılabileceğini göstermektedir.

Önerilen metot uygulanarak meyve suyu örneklerinde *o*-FDA türevleri belirlenmiştir. Özellikle karışık ve şeftali suyu örneklerinde *o*-FDA türevlerin çeşitliliğinin fazla olduğu ve konsantrasyonlarının da yüksek olduğu belirlenmiştir. İncelenen meyve suyu örneklerinde söz konusu maddelerin varlığı bu tür gıdaların tüketilmesinde dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

Geliştirilen metot mide sıvılarına uygulanmış ve *o*-FDA türevleri belirlenmiştir. Metot, mide sularında 0,01 ng/mL seviyelerinin altındaki *o*-FDA ve türevlerinin belirlenmesine imkan tanımaktadır. Literatürü incelendiğinde, benzer çalışma bulunmasına rağmen mide sularında *o*-FDA'lar ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ileri ki çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir. İncelenen mide suyu örneklerinde *o*-FDA türevlerinin belirlenmesinin nedeni, renklendirici içeren meşrubat gibi çeşitli gıda ürünlerinde bu bileşiklerin kullanılması olabilir.

Bu çalışmada, saç boyası, boyanmış sa, biyolojik sıvılarda, evre ve gıda örneklerinde eser miktarlardaki *o*-FDA türevlerinin analizlerinden elde edilen sonuçlar, önerilen bu metodun hassas ve güvenilir olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahlström L-H, Sparr Eskilsson C and Björklund E** (2005) Determination of banned azo dyes in consumer goods. *TrAC.*, 24 (1): 49-56.
- Akyuz M and Ata Ş** (2008) Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47 (1): 68-80.
- Akyuz M and Ata Ş** (2006) Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 1129 (1): 88-94.
- Al-Tufail M, Mahier T, Tate J and Haq A** (1996) Rapid identification of phenylenediamines in traditional hair dyes by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Toxicol. Lett.*, 88 (1001): 13-13.
- Andrisano V G R, Pietra AMD, Carrini V** (1994) HPLC Analysis of Oxidation Hair Dyes in Permanent Hair Colorants. *J. Liq. Chromatogr. Related Techno.*, 17: 2919-2937.
- Ashby R W T** (1988) Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.*, 204: 17–115.
- Ashby R W T** (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat. Res.*, 257: 229-306.
- Babish G D** (1991) Mutagens in Cosmetologists and Dental Personel. *J. Tox. Environ. Health.*, 34: 197-206.
- Baker J T** (1984) *10 SPE Applications Guide*. Phillipsburg, 2: 96-110
- Bhaskar M, Gnanamani A, Ganeshjeevan R J, Chandrasekar R, Sadulla S and Radhakrishnan G** (2003) Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by Streptomyces SP. *J. Chromatogr. A.*, 1018 (1): 117-123.
- BiW H, Feng P, Qi Y, You X, Zhen J, Zheng M, Qu B, Fu Z, Chen M, and Chein HT B W** (1992) Mortality and cancer incidence of bladder cancer of benzidine-exposed workers in China. *Am. J. Ind. Med.*, 21: 481-489.
- Bronaugh RL C E** (1984) Percutaneous Absorption of Hair Dyes: Correlation with Partition Coefficients. *J. Invest. Derm.*, 83: 124-127.
- Burnett C, Fuchs C, Corbett J and Menkart J** (1982) The effect of dimethylsulfoxide on the mutagenicity of the hair dye p-phenylenediamine. *Mut. Res. Lett.*, 103 (1): 1-4.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Burnouf D Y and Fuchs R P P** (2000) The early detection of frameshift mutations induced by a food-borne carcinogen in rats: a new tool for molecular epidemiology. *R. Mut. Res.*, 462 (2-3): 281-291.
- Cancer** (1982) Some Aromatic Amines, Anthraquinones and Nitroso Compounds, and Inorganic Fluorides Used in Drinking Water and Dental Preparations. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 27: 341.
- Casella IG G M** (2001) Determination of electroactive organic acids by anion-exchange chromatography using a copper modified electrode. *J. Chromatogr. A.*, 912: 223-233.
- Chang W Y, Sung Y-H and Huang S D** (2003) Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.*, 495 (1-2): 109-122.
- Chanlon S, Joly-Pottuz L, Chatelut M, Vittori O and Cretier J L** (2005) Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. *J. Food Compos. Anal.*, 18 (6): 503-515.
- Chen S C, Chen C H, Chern C L, Hsu L S, Huang Y C, Chung K T and Chye S M** (2006) p-Phenylenediamine induces p53-mediated apoptosis in Mardin–Darby canine kidney cells. *Toxicol. in Vitro*, 20 (6): 801-807.
- Chung K T, Murdock C A, Stevens Jr S E, Li Y S, Wei C I, Huang T S and Chou M W** (1995) Mutagenicity and toxicity studies of p-phenylenediamine and its derivatives. *Toxicol. Lett.*, 81: 23-32.
- Colvin M E, Felton J S** (1998) Chemical and biological factors affecting mutagen potency. *Mutat. Res.*, 400: 479–492.
- Corbett J F** (1999) An historical review of the use of dye precursors in the formulation of commercial oxidation hair dyes, *Dyes Pig.*, 41: (1–2) 127-136.
- Cosmetology S C** (1993) Evaluation and opinion on B 24: 4-nitro-o-phenylenediamine.
- Dalane M, Skarping, G J** (1985) Trace analysis of amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection. *J. Chromatogr. A.*, 331: 321-328.
- Dalane M, Lundh T and Mathiasson L** (1985) N-permethylation of polyamines at trace levels for gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A.*, 322 (0): 169-176.
- Dong S, Chi L, Zhang S, He P, Wang Q and Fang Y** (2008) Simultaneous determination of phenylenediamine isomers and dihydroxybenzene isomers in hair dyes by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2): 653-659.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Donlon B, Razo-Flores E, Luijten M, Swarts H, Lettinga G and Field J** (1997) Detoxification and partial mineralization of the azo dye mordant orange 1 in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1): 83-90.
- Drummer O H** (1999) Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J. Chromatogr. B.*, 733 (1–2): 27-45.
- Dunkel E Z, Brusick E M, McGregor K M and Rosenkranz V F S** (1985) Development of a standard protocol for in vitro cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: Comparison of results for 22 compounds in two laboratories. *Environ. Mutagen.*, 7: 1-19.
- Economy M** (2009) *Trade and Industry of Japan*.
- Evgen'ev M I, Garmonov S Y, Shakirova L S and Brysaev A S** (2002) Flow-Injection Determination of Toxic Aromatic Amines in Medicinal Preparations. *J. Anal. Chem.*, 57 (12): 1103-1108.
- Feldmann R J M H** (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Derm.*, 54: 399-404.
- Fernandes J O and Ferreira M A** (2000) Combined ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *J. Chromatogr. A.*, 886 (1-2): 183-195.
- Fieser L F and Fieser M** (1958) *Organic Chemistry, Chap. 25, 3rd Edition*, Reinhold, New York.
- Garrigós M C, Reche F, Marín M L and Jiménez A** (2002) Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. *J. Chromatogr. A.*, 976 (1-2): 309-317.
- Gichner T, Stavreva D A and Van Breusegem F** (2001) o-Phenylenediamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mut. Res.*, 495 (1–2): 117-125.
- Hazardous Substances Database** (2011) *Department of Health and Human Services, National Library of Medicine, Bethesda, MD*.
- Hehre W J, Random L, Schleyer P R, Pople J A** (1986) *Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, 386.
- Hušek P** (1991) Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chromatogr. A.*, 552 (0): 289-299.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- IARC** (1993) Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of haircolourants, some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 57: 7-398.
- Kago M, Akiyama T and Shinohara R** (1980) Detection and identification of trace organic substances in the aquatic environment. *J. Uoeh.*, 2: 285-300.
- Kataoka H** (1996) Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis, *J. Chromatogr. A.*, 733 (1-2): 19-34.
- Kataoka H, Ohru S, Kanemoto A and Makita M** (1993) Determination of ammonia as its benzenesulphonyldimethylaminomethylene derivative in environmental water samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 633 (1-2): 311-314.
- Knepper T P, Sacher F, Lange F T, Brauch H J, Karrenbrock F, Roerden O and Lindner K** (1999) Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Was. Man.*, 19 (2): 77-99.
- Körös Á, Hanczkó R, Jámbor A, Qian Y, Perl A and Molnár-Perl I** (2007) Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography: A deproteinization study. *J. Chromatogr. A.*, 1149 (1): 46-55.
- Kuz'mina N V, Khizbullin F F, Gadomskii T Y and Maistrenko V N** (2008) Gas-chromatographic determination of aliphatic amines in natural surface water and wastewater. *J. Anal. Chem.*, 63 (7): 664-667.
- Lin CE C Y, Wang T Z** (1999) Monitoring of the conjugation reaction between human serum transferrin and fluorescein isothiocyanate by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 1051 (1-2): 241-252.
- Markland W R** (1966) "Hair Preparations", *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2nd edition 10.
- Marzulli F and Maibach H** (1978) Hair Dye Toxicity-A Review. *J. of Envirol. Path. Toxicol. Lett.*, 1: 509-530.
- Meyer A, Blömeke B and Fischer K** (2009) Determination of p-phenylenediamine and its metabolites MAPPD and DAPPD in biological samples using HPLC-DAD and amperometric detection, *J. Chromatogr. B.*, 877 (16-17): 1627-1633.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Milman H A** (1984) Apparent Correlation between Structure and Carcinogenicity of Phenylenediamines and Related Compounds. *Environ. Health Perspect.*, 56: 261-273.
- Mosley-Foreman C, Choi J, Wang S and Yu H** (2008) Phototoxicity of phenylenediamine hair dye chemicals in Salmonella typhimurium TA102 and human skin keratinocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 46 (12): 3780-3784.
- Motekaitis R J and Martell A E** (1988) Potentiometric determination of the stabilities of cobalt(II) complexes of polyamine Schiff bases and their dioxygen adducts. *Inorg. Chem.*, 27 (15): 2718-2724.
- Müller L, Fattore E and Benfenati E** (1997) Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry in water samples. *J. Chromatogr. A.*, 791 (1–2): 221-230.
- Nohynek G J, Fautz R, Benech-Kieffer F and Toutain H** (2004) Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food Chem. Toxicol.*, 42 (4): 517-543.
- Pagga U and Brown D** (1986) The degradation of dyestuffs: Part II Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, 15 (4): 479-491.
- Palmiotto G, Pieraccini G, Moneti G and Dolara P** (2001) Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy. *Chemosphere*, 43 (3): 355-361.
- Pel E, Bordin G and Rodriguez A R** (1998) HPLC Candidate Reference Method for Oxidative Hair Dye Analysis. I. Separation and Stability Testing. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 21 (6): 883-901.
- Pielesz A** (1999) The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. *J. Molec.Struct.*, 511: 337-344.
- Pielesz A, Baranowska I, Rybak A and Włochowicz A** (2002) Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. *Ecotox. Environ. Safe.*, 53 (1): 42-47.
- Pinheiro H M, Touraud E and Thomas O** (2004) Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes Pig.*, 61 (2): 121-139.
- Puig D and Barceló D** (1996) Determination of phenolic compounds in water and waste water. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 15 (8): 362-375.
- Riedel K S, Gerhard E, Johannes H, Heinz W and Anthony R** (2006) Determination of Three Carcinogenic Aromatic Amines in Urine of Smokers and Nonsmokers. *J. Anal. Tox.*, 30 (3): 187-95.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Rothman N B V, Hayes R B, Kashyap R, Parikh DJ, Kashyap S K, and Schulte B M, Jaeger M, Talaska G** (1996) The impact of interindividual variability in N-acetyltransferase activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 5084-5089.
- Sahasrabudhhey B, Jain A and Verma K** (1999) Determination of ammonia and aliphatic amines in environmental aqueous samples utilizing pre-column derivatization to their phenylthioureas and high performance liquid chromatography, *Analyst.*, 124 (7): 1017-1021.
- Sainthorant C M P, Dreux M, Baudry A and Goetz N** (1995) Separation of phenylenediamine, phenol and aminophenol derivatives by micellar electrokinetic chromatography Comparison of the role of anionic and cationic surfactants. *J. Chromatogr. A.*, 717: 167-179.
- Schmidt T C, Less M, Haas R, von Löw E, Steinbach K and Stork G** (1998) Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine: I. Derivatization. *J. Chromatogr. A.*, 810 (1-2): 161-172.
- Schnuch A, Geier J, Uter, P J** (1997) Association between occupation and contact allergy to the fragrance mix: a multifactorial analysis of national surveillance data, *Contact Dermatitis*, 37: 200-209.
- Schut E G S** (1999) DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinog.*, 20: 353-368.
- Scott T S** (1962) Carcinogenic and Toxic Hazards of Aromatic Amines. *Br. J. Ind. Med.*, 20 (3): 251-252.
- Shelke M, Sanghi S K, Asthana A, Lamba S and Sharma M** (2005) Fast separation and sensitive detection of carcinogenic aromatic amines by reversed-phase μ -liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.*, 1089 (1-2): 52-58.
- Singh V, Gupta M, Jain A and Verma K K** (2003) Determination of aromatic primary amines at $\mu\text{g l}^{-1}$ level in environmental waters by gas chromatography-mass spectrometry involving N-allyl-N'-arylthiourea formation and their on-line pyrolysis to aryl isothiocyanates. *J. Chromatogr. A.*, 1010 (2): 243-253.
- Skarping G, Renman L, Sangö C, Mathiasson L and Dalene M** (1985) Capillary gas chromatographic method for the determination of complex mixture of isocyanates and amines. *J. Chromatogr. A.*, 346: 191-204.
- Skog K, Solyakov A, Arvidsson P and Jägerstad M** (1998) Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 803 (1-2): 227-233.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Soler-Niedziela L, Nath X J S, Ong T** (1991) Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. *Mutat. Res.*, 259: 43-48.
- Sparr Eskilsson C, Davidsson R and Mathiasson L** (2002) Harmful azo colorants in leather: Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques. *J. Chromatogr. A.*, 955 (2): 215-227.
- Stambouli A, Bellimam M A, El Karni N, Bouayoun T and El Bouri A** (2004) Optimization of an analytical method for detecting paraphenylenediamine (PPD) by GC/MS-iontrap in biological liquids. *Forensic Sci. Int.*, 146: 87-92.
- Sun Y, Liang L, Zhao X, Yu L, Zhang J, Shi G and Zhou T** (2009) Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Water Res.*, 43 (1): 41-46.
- Suter F S, Poetter-Locher F, Swingler T and Wilson L** (1998) 4-Chloro-o-phenylenediamine: a 26-week oral (in feed) mutagenicity study in Big Blue™ mice. *Mutat. Res.*, 414: 149-156.
- Talaska G** (2003) Aromatic Amines and Human Urinary Bladder Cancer: Exposure Sources and Epidemiology. *J. Environ. Sci. Health., Part C* 21 (1): 29-43.
- Talaska G S M, Casetta G, Tizzani A and Vineis P** (1994) Carcinogen-DNA adducts in bladder biopsies and urothelial cells: a risk assessment exercise. *Cancer Letts.*, 84: 93-97.
- Tanada N K M, Hara K, Hieda Y, Takamoto M and Kashimura S** (1991) Identification of human hair stained with oxidation hair dyes by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Forensic. Sci. Int.*, 52: 5-11.
- Tanada N K M, Hara K, Hieda Y, Takamoto M and Kashimura S F** (1994) Demonstration of oxidation dyes on human hair. *Forensic. Sci. Int.*, 64: 1-8.
- Terashi A, Hanada Y, Kido A and Shinohara R** (1990) Determination of primary and secondary aliphatic amines in the environment as sulphonamide derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 503 (0): 369-375.
- Tripathi M, Khanna S K and Das M** (2007) Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. *Food Cont.*, 18 (3): 211-219.
- Ugland H G, Krogh M and Rasmussen K E** (1997) Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 701 (1): 29-38.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- US Department of Health, Public Health Service** (1978) 4-Chloro-o-phenylenediamine for possible carcinogenicity. *Natl. Cancer Inst. Carcinog. Tech. Rep. Ser.*, 63: 1-115.
- Van Duren B L** (1980) Carcinogenicity of hair dye components. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 3: 237-251.
- Van Neste A, Duce R A and Lee C** (1987) Methylamines in the marine atmosphere. *Geophys. Res. Lett.*, 7: 711-714.
- Vieira S M, Theodoro K H and Glória M B A** (2007) Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chem.* 100 (3): 895-903.
- Wang L H and Tsai S J** (2003) Simultaneous determination of oxidative hair dye p-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids. *Anal. Biochem.*, 312 (2): 201-207.
- Wang P G and Krynitsky A J** (2011) Rapid determination of para-phenylenediamine by gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring in henna-containing cosmetic products. *J. Chromatogr. B.*, 879 (20): 1795-1801.
- Wang Q, Tang H, Xie Q, Jia X, Zhang Y, Tan L and Yao S** (2008a) The preparation and characterization of poly(o-phenylenediamine)/gold nanoparticles interface for immunoassay by surface plasmon resonance and electrochemistry. *Colloids Surf. B.*, 63 (2): 254-261.
- Wang S P and Huang T H** (2005) Separation and determination of aminophenols and phenylenediamines by liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chim. Act.*, 534 (2): 207-214.
- Wang S, Mosley C, Stewart G and Yu H** (2008b) Photochemical reaction of a dye precursor 4-chloro-1,2-phenylenediamine and its associated mutagenic effects. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 197 (1): 34-39.
- Weiss T and Angerer J** (2002) Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 778 (1–2): 179-192.
- Westley J W and Halpern B** (1968) Use of (-)-menthyl chloroformate in the optical analysis of asymmetric amino and hydroxyl compounds by gas chromatography. *J. Org. Chem.*, 33 (10): 3978-3980.
- Wu Y, Jiang F, Chen L, Zheng J, Deng Z, Tao Q, Zhang J, Han L, Wei X, Yu A and Zhang H** (2011) Determination of phenylenediamine isomers in hair dyes by coal cinders micro-column extraction and MEKC. *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (7): 2141-2147.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Zhou J, Xu H, Wan G H, Duan C F and Cui H** (2004) Enhancing and inhibiting effects of aromatic compounds on luminol–dimethylsulfoxide–OH[–] chemiluminescence and determination of intermediates in oxidative hair dyes by HPLC with chemiluminescence detection. *Talanta*, 64 (2): 467-477.
- Zhu L, Tay C B and Lee H K** (2002) Liquid–liquid microextraction of aromaticamines from water samples combined with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 963: 149-155.

ÖZGEÇMİŞ

Elif YILDIZ 1985 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Gaziantep'te tamamladı. 2003 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında mezun olduktan sonra Osmangazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Anabilim Dalı'nda Tezsiz Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2009 yılında mezun olduktan sonra 2010 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2010 yılından beri BEÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, İncivez/ZONGULDAK

Tel : (372) 2574010-1779

E-posta : ozdalelif@gmail.com