

T.C.
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

SİĞARA FİLTRE ZİFİRİNDE BENZ(A) PİREN'İN
HPLC İLE TAYİNİ

Ş.FATMA ÖZDEMİR

T.C.

YÜKSEK LİSANS

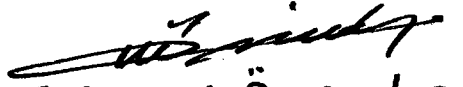
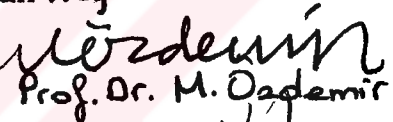
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. MUSTAFA ÖZCİMDER

SAMSUN
EYLÜL-1989

T.C.
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Bu çalışma jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.


Başkan Prof. Dr. M. Özcimder

Üye Prof. Dr. M. Özdemir

Üye Prof. Dr. A. Ölmez

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .9./.11./1989.


Prof. Dr. Feri KÖKSAL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada sigara içimi sırasında oluşan organik maddelerden kanserojen etkisi olan benz(a) pirenin, BaP, yüksek basınç sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirildi. Sigara filtreleri önce asetonitril ile çözüldü sonra farklı pH larda n-heksan ile ekstraksiyonlar yapıldı. Kromatografik kolon olarak LiChrosorb RPC 18, hareketli faz olarak da %84 asetonitril-su karışımı kullanıldı. Geri alınabilirlik % 50 dolayında ve farklı üç sigaradaki benz(a) piren miktarları sırasıyla 0.076, 0.039, 0.081 µg/ filtre bulundu.

SUMMARY

In this study a method has been developed for the determination of benz(a)pyrene in cigarette filter . The method was based on the acetonitril and n-hexane extractions of the analyt from filtre and high pressure liquid chromatographic analysis of the extract using LiChrosorb RPC 18 reversed-phase column. The extraction yield was found to be 50% by applying the proposed method benz(a) pyrene content of three different cigarettes filters were found as 0.076, 0.039, 0.081, $\mu\text{g}/\text{filter}$.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmam sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, bana her zaman manevi yönden destek olan, bilginin artmasında büyük katkıları bulunan ve modern bir teknik olan yüksek basınç sıvı kromatografisini öğrenmemi sağlayan değerli hocam Sayın Prof.Dr.Mustafa ÖZCİMDER'e en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında numune temininde yardımlarını gördüğüm Fizik Bölümü görevlilerinden Mustafa Üstün'e, teknik yardımlarından dolayı bölümümüz teknisyeni Kazım Canbolat'a ve yine numune temininde yardımcı olan Kimya ve Matematik Bölümü görevlilerinden Dursun B. Yüksel, Şeref Adıgüzel ve Mehmet Ardal'a teşekkür ederim.

Bu tezi yazan sekreter Nuran Karakum ve Gönül G. Özyıldırım'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ.....	1
1.1.	Tütün ve Tarihçesi.....	1
1.1.1.	Kurutma.....	1
1.1.2.	Fermentasyon.....	3
1.2.	Dumanın Meydana Gelişi ve İçeriği.....	4
1.2.1.	İçilmekte Olan Tütünün Bölgeleri.....	4
1.2.2.	Dumanın Meydana Gelişi.....	5
1.3.	Parçalanma Şartları.....	5
1.3.1.	İçme Olayı ve Parametreleri.....	5
1.4.	Dumanın Fiziko-Kimyasal Karakteristikleri.....	7
1.5.	Aerosol Sistemin Değişmesi ve Bozulması.....	7
1.6.	Dumanın Kimyasal Bileşimi.....	7
1.6.1.	Genel Bileşim Tablosu.....	8
1.6.2.	Dumanda Kimyasal Sınıflar.....	10
1.7.	Filtreler.....	18
1.7.1.	Filtre Maddeleri.....	19
1.7.2.	Filtre Çeşitleri.....	20
1.8.	Ters-Faz Sıvı Kromatografisi.....	20
1.8.1.	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi Cihazı.....	24
1.9.	Tütünde Madde Tayini.....	28
1.9.1.	Benz(a) Piren Tayini.....	30
1.9.2.	Araştırmanın Amacı.....	31
2.	DENEYSEL ÇALIŞMA.....	31
2.1.	Materyal.....	31
2.2.	Cihaz.....	32
2.3.	Yöntem.....	32
2.3.1.	Geri Alınabilirlik.....	33
2.3.2.	Sigara İzmaritlerinde Benz(a) Piren Tayini.....	36
2.4.	Kromatografik Şartlar.....	37
2.5.	Kalitatif-Kantitatif Değerlendirme.....	37
3.	BULGULAR, TARTIŞMA.....	37
	Kaynaklar.....	43

1.GİRİŞ

1.1. Tütün ve Tarihçesi

Tütün içimi ilk kez Amerika yerlilerinden öğrenilmiş ve ziraati de bu ülkede başlamıştır. 16. yüzyılda dünyanın iklimi uygun bölgelerine yayılmıştır. 1600'de Akdeniz Bölgesi'ne, 1601'de Java Adası'na, 1605'te Çin ve Hindistan'a ulaşmıştır. Türkiye'de ise tütün ziraati 1601'de başlamıştır.

Tütün 17. yüzyıldan sonra yurdumuzda ve dünyada yayılmaya devam etmiş, 19. yüzyılda da ince kağıda sarılarak sigara biçiminde tüketilmeye başlanmıştır(Yıldırım, 1988).

Tütün tüketimi çeşitli şekillerde olur;

1) Tüketen kişinin organizması, tütünün kendisi ile değil, bunun yanmasından üreyen dumanla temasa geçme şeklindedir; bu tarzdaki tüketime "içme"denir. Bu kategoriye giren tüketim biçimleri sigara, puro, pipo ve nargile tarzında olanlardır.

2) Enfiye ve çiğneme tütünlerinin tüketiminde ise, tüketicinin organizması doğrudan doğruya tütünle temasa gelir.

2. kategoriye giren tüketim tarzları günümüzde önemlerini kaybetmiş, tüketim 1. kategoriye girenler tarzında yaygın hale gelmiştir. Bu nedenle tütün tüketimi "içme" biçiminde incelenecektir. Buna geçmeden önce tütün üretiminin son iki safhası olan kurutma ve fermentasyon işlemlerine değinelim.

1.1.1. Kurutma

Yeni hasad edilmiş yeşil yapraklar endüstri ilk maddesi değildirler. Bu yapraklar kurutma ve fermentasyon işlemlerine tabi tutularak endüstri ilk maddesi haline yani içilebilir bir duruma gelirler. Kurutma işlemi yalnız tütün yapraklarındaki suyun giderilmesi demek değildir. Bu işlemi en iyi ingilizce bir terim olan "curing" kelimesi anlatır. Bu terim iyileştirme, düzeltme(tedavi) anlamlarını taşımaktadır.

Şartları az çok farklı olan çeşitli kurutma yöntemleri vardır. Kurutma işlemi başlıca iki faza ayrılır;

- 1) Sarartma fazı
- 2) Kurutma fazı

Sarartma fazında klorofil parçalanır ve yaprak rengi sarıya döner. Bu safhada yapraklar canlılıklarını kaybetmemelidir. Aksi takdirde kurutma işleminden beklenen değişimlere ulaşılmaz.

Yeni hasad edilmiş yapraklarda ortalama olarak % 85-90 kadar su vardır. Kurutma işleminden önce kısa bir süre uygulanan soldurmada bu oran % 80-85'e iner. Sarartma fazındaki su kaybı, başlangıç suyuna göre % 20-25 kadardır. Esas kurutmadaki su kaybı başlangıç suyunun % 50-55'i kadardır. Buharlaşıma süresi ne kadar kısa olursa renk o kadar açık sarı olur.

Başlıca kurutma yöntemleri şunlardır:

- Air-curing(havada kurutma)
- Flue-curing(borulu ya da ısıtmalı kurutma)
- Sun-curing(güneşte kurutma)
- Fire-curing(ateşte kurutma)

Air-curing

Puroluklar, kara tütünler, Burley ve Marylandlar gibi koyu renkli tütünlerin üretiminde uygulanır. İşlem kapalı hangarlarda ve güneş ışınlarının doğrudan doğruya yaprak üzerine düşmeyecekleri şekilde yapılır. Bu prensibe göre kurutma adi sıcaklıkta ve yeteri kadar hava nemi ortamında yapılır.

Flue-curing

Isıtma ile yapılır. 5 gün gibi kısa sürede tamamlanır.

Sun-curing

Tütüncülükte en eski yöntemdir. Şark sigaralıkları yetiştiren ülkelerde İtalya, Cezayir gibi kurak yerlerde uygulanır.

Yöntem genellikle küçük yapraklı tütünlere uygulanır. Yaprakların yüzleri hep bir yönde olmak üzere sicimlere dizilir. Böylece 2-3 m uzunluğunda diziler oluşturulur ve kısa bir süre soldurmaya bırakılır. Dizilerin 1 metresine

400-600 kadar yaprak geçirilir. Kurutma 15 gün kadar sürer. İklim şartlarına göre yaprakların renkleri açık sarıdan kırmızıya kadar değişir.

Fire-curing

Bu yöntem iyi gelişmiş, kalın damarlı ağır tütünler üzerine uygulanır. Yakılan ateşten çıkan dumanlar sayesinde yapraklar özel bir aroma ve içim kazanırlar. Bu tütünler koyu renkli, kalın dokulu, reçinesi yüksek ve çok nikotinlidir. Dumanın ve alevin fazla olmamasına dikkat edilir.

Yığın kurutması

Yapraklar dizi yapılmadan hücrecikler veya çerçeveler içine istif edilir. Daha sonra aralarından sıcaklık ve bağıl nemi ayarlanmış hava akımı geçirilir. Bu yöntemle işçilik, yakıt ve yerden tasarruf edilir. Isıtma ile kurutma yapıldığından bir nevi flue-curing'dir.

1.1.2. Fermentasyon

Tütünün endüstri ilk maddesi olarak üretilmesinde en son işlemleri içeren bir terimdir. Kurutmada olduğu gibi fermentasyon işlemlerinde de çeşitli tip ve içerikteki tütünlere uygulanan işlemler farklıdır.

Bir fermentasyonda kızışma(ısı çıkışı), kuru madde kaybı ve kimyasal-fiziksel değişimler ne kadar belirli olursa o fermentasyon o kadar "şiddet" li meydana gelmiş olur. Fermentasyon olayı başlıca dört faktöre bağlı olarak gelişir.

a) Tütünün kendi içeriği:

Bunu bir dereceye kadar genetik faktörler, fakat asıl yaprakların fermentasyona kadar etkisi altında bulunduğu üretim faktörleri tayin eder.

b) Tütünün nemi:

Fermentasyonda meydana gelen olayların en belli başlısı enzimler tarafından kataliz edilen oksidasyon işlemidir. Dokuda yeterli miktarda su bulunmalıdır. Ancak bu şekilde reaksiyonlar enzimler tarafından kataliz edilebilir.

c) Sıcaklık:

Enzim aktivitesi belli sıcaklık sınırları içinde mümkün olur. Fermantasyonda rol oynayan çeşitli enzimlerin faaliyeti için uygun ısı dereceleri 20° ve 70°C lar arasındadır.

d) Oksijen:

Çok sıkı denkler hariç daima yeteri kadar oksijen bulunur. Fermantasyonun olabilmesi için oksijen şarttır.

Fermantasyon işleminin asıl hedefi fiziksel değişimlerdir. Burada aroma gelişir, kurutulmuş yapraklarda görülen acılık ve otumsu çeşni kaybolarak içim düzelir ve üretilen tütünde aranan nitelikler oluşur. Yaprakların rengi tekdüzeleşir, koyulaşır, biraz donuklaşır ve yeşil nüanslar kaybolur.

Su ve kuru madde kaybından dolayı ağırlık kaybı görülür. Elestikiyet ve uzama direnci azalır, higroskoposite düşer, yanma kabiliyeti yükselir. Yaprak yüzeyinin yapışkanlığı azalır ya da hemen hemen kaybolur.

Bütün bu değişmelerle kimyasal değişmelerin derecesi fermantasyonun şiddetine göre hafif ya da yüksek olur. Fermantasyonun şiddeti, tütünün yükseldiği ısı derecesi ve bunun süresi ile ölçülür. Fermantasyondan sonra tütün sigara, puro vb., hale getirilir.

Fermantasyon işlemleri sırasında dezavantaj olarak küflenme, yanma ve yoğunlaşma gibi olaylar da olur.

Tütünün hazırlanışına kısaca değindikten sonra şimdi de içme ve içme olayı sonucu oluşan kimyasal maddeleri inceleyelim.

1.2. Dumanın Meydana Gelişi ve İçeriği

1.2.1. İçilmekte Olan Tütünün Bölgeleri

a) Kül bölgesi(kıyılmış ya da parça halindeki tütün dokusunun bütün organik bileşikleri yandıktan sonra geri kalan kül kesimi).

b) Ateş bölgesi(kül bölgesinin arkasında, kömürleşme ve yanmakta olan, kızıl dereceye kadar ısınmış bulunan kesim).

c) Kömürleşme bölgesi(ateş bölgesinden yayılan ısınn etkisi ile parçalanana(bozunan) tütün dokusu kesimi).

d) Kuruma bölgesi(ateş bölgesinden yayılan ısınn etkisiyle henüz parçalanmaya başlamamış olan, kurumuş dolguluk kesim).

e) Yoğunlaşma bölgesi(hemen kuruma bölgesinin arkasında bulunan uzunca bir kısım. (sigara, puro vb., içinden geçen dumanın bazı bileşenlerinden bir kısmı yoğunlaşır).

f) İzmarit(ya da ağız bölgesi, tüketilmeden atılan kesimdir).

1.2.2. Dumanın Mevdana Gelişi

Kuruma bölgesi ile ateş bölgesi arasındaki dolguluğun, ısınn etkisi ile yanma, parçalanma ve buharlaşması ile birçok gaz ve buharların bir karışımı oluşur. Bu gazlar ve buharlar karışımı, nefes çekme aralarında sigaranın ucundan dışarıya doğru ve nefes çekme sırasında ise içine doğru uzaklaşır. Her iki yönde de ateşbölgesinden uzaklaşması ile soğuyan karışımın buhar halinde bulunan katı ve sıvı maddelerinin bir kısmı yoğunlaşarak çok küçük tanecikler oluşur. Bu olay, gaz ve buharlar karışımının yaklaşık olarak 300°C' a kadar soğuması ile gerçekleşir. Böylece birisi katı ve sıvıların karışımı olan tanecikler, diğeri de gaz ve buharların bir karışımı olan gaz fazları olmak üzere iki fazlı bir sistem, başka bir deyimle bir aerosol oluşur. Tanecikler fazı gaz fazı içinde dağılmış bulunduğundan, buna "dağılmış faz" gaz fazına da "dağıtıcı faz" denir. Nefes çekme sırasında ağıza gelen dumana "asal duman", nefes aralarında sigaranın, puronun veya piponun ucundan çıkarak dışarıya giden dumana da "yan duman" denir. Duman kelimesinden asal duman kastedilmektedir.

1.3. Parçalanma Şartları

1.3.1. İçme Olavı ve Parametreleri

İçme olayı, içicinin ağız boşluğunda yapılan bir basınç düşüklüğü ile başlar. Böylece dış basınç ile ağız boşluğundaki basınç arasında oluşan fark yüzünden ateşlenmiş bulu-

nan sigaranın içinden bir hava akımı geçer. Sigaranın tüketimi aralıklı nefes çekmelerle devam eder ve ateş bölgesinin izmarit bölgesinin sınırına dayanması ile sona erer. İçme olayında başlıca üç parametre vardır;

-Depresyon (Basınç düşüklüğü)

-Nefes süresi

-Nefes aralığı

İlk nefes çekme ile ağız boşluğundaki basınç düşmeye başlar, bir minimumdan geçip veniden dış basınç seviyesine yükselir. Bir nefes çekme için geçen süreye "nefes süresi", birbirini izleyen iki nefes çekme arasında geçen süreye de "nefes aralığı" denir. Tek bir sigaranın içilmesi sırasında dumana geçen toplam zifir miktarı üzerinde, bırakılan izmarit boyunun ve içme olayının gerçekleştiği çevredeki hava nem oranının da etkileri vardır. Bu nedenle içme olayının parametreleri şu şekilde sıralanabilir;

-Nefes hacmi

-Nefes süresi

-Nefes aralığı

-İzmarit boyu

-Hava nem oranı

Bu parametrelerden ilk ikisi arasında şöyle bir bağıntı vardır;

Çekilen havanın hacmi v , çekiş süresi (nefes süresi) t ile gösterilirse:

$$\text{debi} = \frac{v}{t} \text{ olur.} \quad (1)$$

Yani zaman birimi içinde çekilen havanın hacmine "debi" denir.

Bu orana da "çekme hızı" denir. Belli bir süre içinde ne kadar çok hava çekilirse, sigaranın ateş kesiminden içeriye doğru olan akımın hızı o kadar büyük olacaktır. Bu hız, bir yandan yanma sıcaklığına etki eder ve böylece parçalanma şartlarında değişikliğe sebep olur. Diğer yandan da parçalanma bölgesinde oluşan gaz ve buharların buradan uzaklaşmalarında rol oynar. Bu şekilde dumanın bileşimine ve fizikokimyasal yapısına etki eder.

1.4. Dumanın Fiziko-Kimyasal Karakteristikleri

Dumanın fiziko-kimyasal karakteristikleri başlıca şu elemanları etkiler. Dumanda bulunan maddelerin iki faz arasındaki dağılımları, dumanın pH'sı, taneciklerin boyutları, konsantrasyonları, hareketleri, elektrostatik yükler vb.

1.5. Aerosol Sistemin Değişmesi ve Bozulması

Yeni oluşmuş dumana "doğal duman" denir. Doğal duman, kapalı bir kap içine alınıp orada bırakılırsa, zamanla seyreldiği ve en sonunda gözden kaybolduğu görülür. Tanecikler düşerken birbirleri ile çarpışıp birleşirler ve bu suretle gittikçe boyutları büyür, konsantrasyonları küçülür. Taneciklerin birleşmesiyle kütleleri büyüdükçe düşme hızları artar ve bir süre sonra kabın dibinde bir zifir tabakası halinde çökelmiş olurlar. Böylece tanecikler fazı gaz fazından tamamen ayrılmış olur. Aerosol sistemin bozulmasıyla duman gözden kaybolmuş olur. Taneciklerin çarpışarak birleşip gittikçe büyük taneler haline gelmesine "topaklanma" denir. Özellikle sigara dumanında, başta nikotin olmak üzere, fizyolojik etki ve sağlık bakımından önemli olan başlıca bileşikler tanecikler fazında bulunurlar, bundan dolayı, bu etkin duman bileşiklerinin içici organizması tarafından alınmasında, topaklanma çok önemli rol oynar.

1.6. Dumanın Kimyasal Bileşimi

Tütün yaprağının kimyasal kompozisyonunun içerdiği bütün bileşiklerin, dumanın içim kalitesi üzerinde herhangi bir şekilde yansiyabilme özelliği vardır.

Tütün tamamen insanoğlu tarafından tüketilen tek üründür. Diğer ürünler insan tarafından katı veya sıvı halde alınırken, tütün bulunduğu şekil olan katı halde değil, parçalanma ve kuru destilasyon işlemleri sonunda katı kütleden gaz haline geçiş sırasında oluşan duman olarak tüketilir. Tütünün kimyasal kompozisyonu ve yanma şartları, her ikisi birlikte dumanı etkilemede önemli rol oynarlar. Tütün bileşiklerinin dışında olup da, duman kalitesini ve orgonoleptik özellikleri etkileyen nem oranı, sigaranın dolgunluk durumu, çekiş uzunluğu gibi başka faktörler de vardır.

Sigara dumanı kompozisyonu tesbit edilmek üzere sayısız araştırma yapılmıştır. Fakat bu analizler yalnızca yanma olayında meydana gelen ürünleri göstermekte olup, yanma bölgesinde ne olup bittiğini söylememektedir.

Dünyanın en hızlı yayılan ve en uzun süren salgını olarak nitelenen tütün, tüm uyarılara ve sağlık bakımından bütün dezavantajlarına rağmen dünya ekonomisindeki etkisini, tarım ürünleri arasındaki önemli yerini korumaktadır. Genellikle "içme" şeklinde tüketilen tütünün sağlığa zararlı oluşu nedeni ile içim sırasında oluşan organik maddelerin türünü ve miktarını belirlemek için yapılan çalışmalar aralıksız sürmektedir. Tütün ve yanma ürünleri içinde tesbit edilebilen organik ve anorganik maddelerin sayısı 3000'i geçmiştir.

1.6.1. Genel Bileşim Tablosu

a) Gaz Fazı

Sigaralarda asal dumanın gaz fazının hacimca % 95 inden fazlasını başlıca yedi gaz oluşturur (Tablo 1). Bunların başlıcaları nefes çekmede sigaranın içine giren havadaki azot ve oksijen ile organik maddelerin yanma ürünü olan CO_2 ve CO dür. Bu gazların konsantrasyonları çeşitli faktörlere göre az çok farklar gösterir, fakat ortalama olarak aşağıdaki tabloda gösterilen oranlarda bulunurlar.

Tablo 1. Sigara Dumanı Kompozisyonu

Gaz	Hacim(%)
Azot	73
Oksijen	10
Karbondioksit	9.5
Karbonmonoksit	4.2
Hidrojen	1
Argon	0.6
Metan	0.6

Gaz fazında bunlardan başka, küçük miktarlarda birtakım gazlar ve uçucu maddelerin buharları bulunur. Bunların başlıcalarının konsantrasyonları Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2. Dumanda Bulunan Diğer Maddeler

Gaz ve Buharlar	Konsantrasyon (ppm)
Parafinler (metan dahil)	87 000
Asetilen, etilen, propilen vb.	31 000
Formaldehid	30
Asetaldehid	3 200
Metanol	700
Aseton	1 100
Metiletilketon	500
Amonyak	300
Azotdioksit	250
Metilnitrit	200
Hidrojen sülfür	40
Hidrojen siyanür	1 600
Metilklorür	1 200

b) Tanecikler fazı

Tanecikler fazının yaklaşık % 10-15'ini su oluşturur. Bir sigaranın içilmesinde dumana yaklaşık olarak 400 mg su karışır. Bunun en büyük kısmı parçalanma ürünü olup bir kısmı da tütünde nem olarak bulunan sudan ileri gelir. Dumana karışan bu kadar suyun en büyük kısmı yan akımlarla dışarı gider, yalnızca 10-15 mg kadarı asal dumanda kalır. Zifirin içerdiği su miktarı ise 3-4 mg'dır. Zifirin geriye kalan bir kısmını Tablo 3'de verilen kimyasal sınıflar, bir kısmını reçineler, reçine asitleri ve bir kısmını da diğer çeşitli maddeler oluşturur.

Tablo 3. Zifirde Kimyasal Sınıflar

Kimyasal Sınıflar	Tanecikler fazının kitlesine göre %
Asitler	7.7 - 12.8
Alkoller	5.3 - 8.3
Karbonil bileşikler	8.5
Alifatik hidrokarbonlar	4.9
Aromatik hidrokarbonlar	0.44
Fenoller	1.0 - 3.8

Bir ya da birkaç nefeste ya da sigaranın tam tüketiminde elde edilen dumanın kitlesine "duman verimi" denir. Bunun gibi duman bileşenlerinden herhangi birinin bir ya da birkaç nefeste ya da sigaranın tam tüketiminden dumana geçen miktarına o bileşenin verimi denir (Örneğin: ilk üç nefesteki nikotin verimi, karbonmonoksitin bir sigara için verimi gibi). Waltz-Hauesemann ve arkadaşları duman verimini şu şekilde ifade etmişlerdir; n sayıdaki nefeste elde edilen duman verimi Q_n ise;

$$Q_n = n \cdot Q_1 \cdot b$$

Q_1 : İlk nefesteki verim

b : Duman için ya da herhangi bir bileşen için bir katsayı. Örneğin; zifir için deneysel olarak $b = 1.25$ nikotin için $b = 1.35$ bulunmuştur.

Tek bir sigaranın tüketiminde dumana geçen zifir miktarı ortalama olarak 20-40 mg arasındadır (Aksu, 1967).

1.6.2. Dumanda Kimyasal Sınıflar

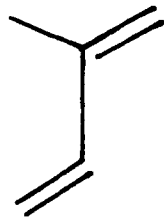
a) Hidrokarbonlar

Bunların küçük moleküllü olanları (C_1-C_4) gaz fazında, daha büyük molekülleri de tanecikler fazında bulunurlar.

Kosak'a göre n- $(C_{22}-C_{36})$ ile izo- $(C_{21}-C_{32})$ alkanları, yaklaşık olarak tanecikler fazındaki parafinlerin 1/3 ünü oluşturur (Aksu, 1967).

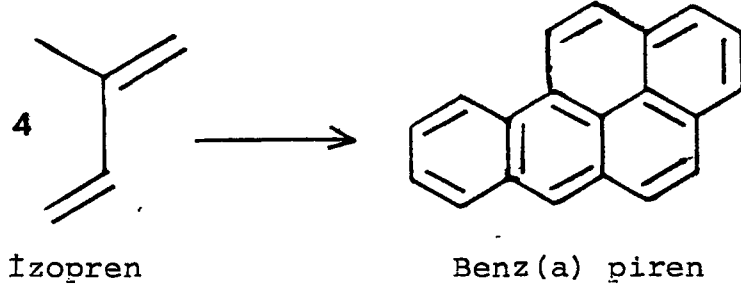
Doymamış hidrokarbonların küçük moleküllü temsilcileri olarak dumanın gaz fazında etilen, propilen, butadien, izo-butilen, asetilen, metil asetilen bulunur.

Bunlardan başka doymamış hidrokarbon olarak izopren ve bunun polimer ve türevleri vardır. Dumandaki doymamış hidrokarbonların % 50-80 kadarını izopren oluşturur.

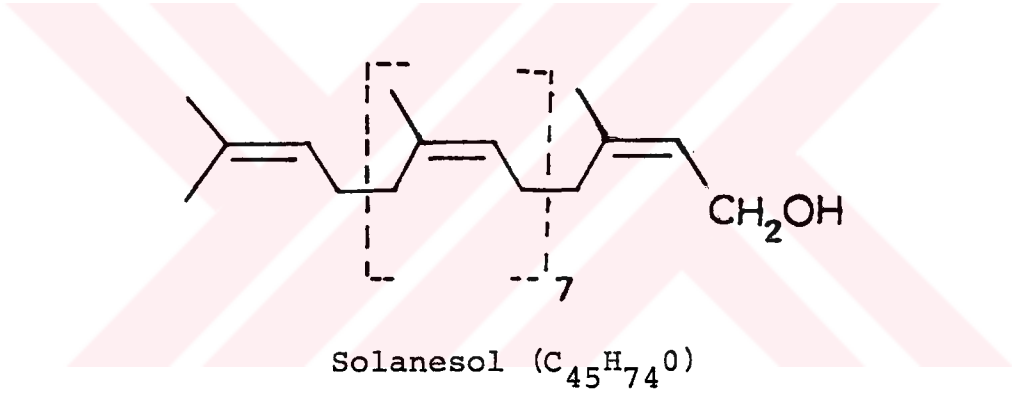


İzopren

İzoprenin 600°C da parçalanmasından polisiklik hidrokarbonlardan benz(a) piren meydana gelir.



İzoprenin kendisi de solanesol, borneol ve linalool gibi terpenik bileşiklerin 500-750°C da parçalanmasından oluşmaktadır. Dumandaki izoprenin kaynaklarından birini meydana getiren solanesolün yapısı aşağıdaki gibidir.



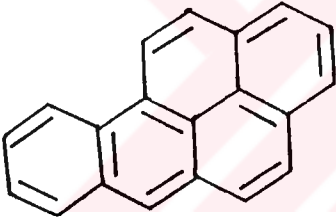
Yine solanesol'ün parçalanma ürünlerinden C₁₀ lu terpen türevi hidrokarbonlar meydana geldiği deneysel olarak gösterilmiştir. Bunlar bir yandan da izoprenin dimerize olmasından meydana gelirler. Tanecikler fazında C₁₀H₁₆ kapalı formülüne sahip en az 11 çeşit dipenten bulunmuştur. Bunlar da solanesol'ün parçalanma ürünlerindendir.

İlk madde tütünde bulunan çeşitli ftadienlerden duman da da bulunduğu tesbit edilmiştir.

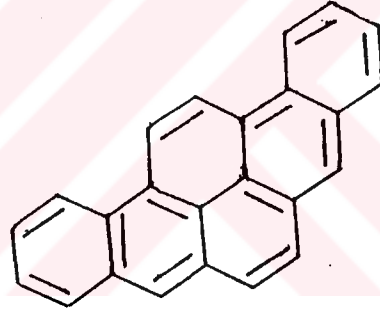
Altı izopren molekülünün polimerizasyon ürünü olan squalene ve bir izomeri olan izo-squalene de dumanda bulunan terpenik hidrokarbonlardandır. Squalene, zifirin % 0.35 kadarını meydana getirir.

Squalene ($C_{30}H_{50}$)

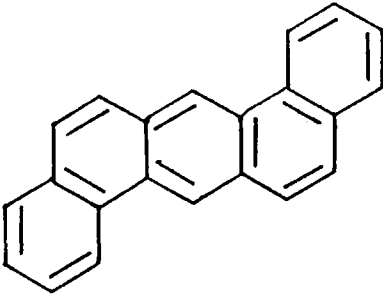
Tütün dumanında çeşitli alifatik hidrokarbonlar vardır. Son yıllarda da çok çeşitli aromatik hidrokarbonların varlıkları tesbit edilmiştir. Bunlardan polisiklik(çok halkalı) hidrokarbonlardan bazılarının kanserojen etkili oluşları araştırmacıların bu alana dikkatini fazlaca çekmiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan kanserojen etkili olup, miktarca başta gelen benz(a) pirendir. Bunun ve bu seriden olan başlıca kanserojenlerin yapıları aşağıdaki gibidir.



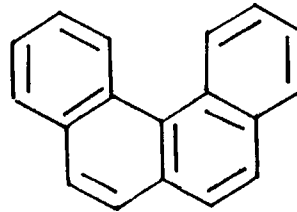
Benz(a)piren



Dibenzo(a,i)piren



Dibenzo(a,h)antrasen



Benzo(c)fenantren

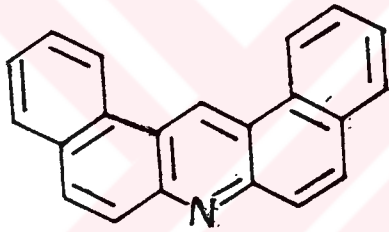
Dumanda bulunan benz(a) piren miktarı hakkında çeşitli kaynaklardan az çok farklı rakamlar verilmiş bulunmaktadır. Cardon tek sigaranın dumanında $0.16 \mu\text{g}$, Laterjet 100 sigaranın dumanında $1.2 \mu\text{g}$ bulmuşlardır(Aksu,1967). Çeşitli on va-

yından alınan ortalama ise 16 $\mu\text{g}/1000$ sigaradır (Aksu,1967).

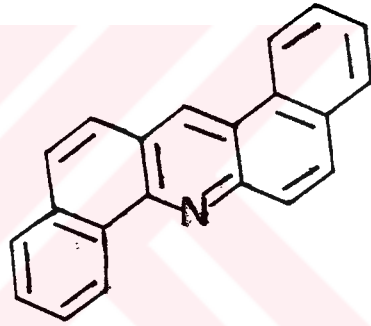
Polisikliklerden benz(a)piren gibi maddelerin kanserojen olmaları, araştırmacıları bu maddelerin oluşumlarını önleme ya da dumandaki miktarlarını azaltma yollarına yöneltmiştir. Bu nedenle tütüne bazı katkı maddeleri katılmıştır. Katkı maddelerine "inhibitör(engelleyici)" denir. Örneğin Alvord tütüne % 2-4 kadar katılan amonyum sülfomat ($\text{H}_2\text{NSO}_4\text{NH}_4$)'ın, 3,4-BP'nin dumandaki miktarını % 90 dan fazla indirdiğini tesbit etmiştir (Aksu,1967).

b) Heterosiklik bazı maddeler

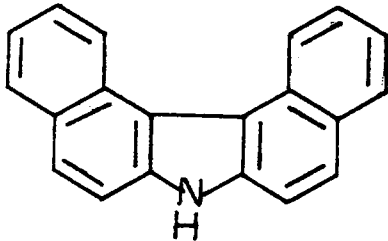
Tanecikler fazında kanserojen etkili hetero-polisiklik maddeler de vardır. Bunlardan bazılarının yapıları aşağıda gösterilmiştir:



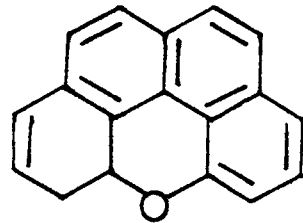
Dibenz(a,j)akridin



Dibenz(a,h)akridin



7H-Dibenz(a,g)karbazol



1,8,9-Perinaftoksanten

c) Alkoller

Benzil alkol

Dietilenglikol

Etanol

Etilenglikol

Gliserin

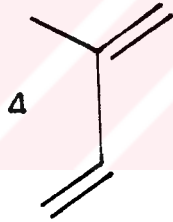
Metanol

 β -Fenetil alkol

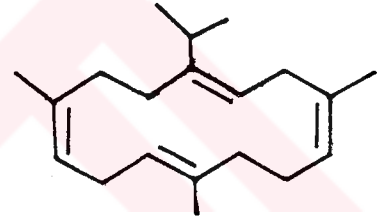
Solanesol

Trietilenglikol

1959 yılına kadar dumanda bu alkoller tesbit edilmiş, daha sonra da C_{17} den C_{23} 'e kadar doymuş normal primer alkollerin dumanda bulundukları, daha sonra da birtakım doymamış alkollerin varlıkları tesbit edilmiştir. Bu doymamış alkollerin bir kısmı, "izoprenoid" denilen ve ondört karbon üyeli, üç çifte bağlı bir makro-halkanın türevidirler. Dört izopren molekülünün aşağıdaki gibi kondanse olmalarından, 1-izopropil-4,8,12-trimetil-siklotetradesen (Duvan) nın üç çifte bağlı doymamış türevleri meydana gelmektedir.



İzopren



Duvan

Duvan'ın bu doymamış türevlerine, üç çifte bağı belirtmet üzere "Duvatrien" ler denir. Dumanda bulunan doymamış alkollerden bir kısmı da duvatrien türevidirler.

d) Esterler

Dumanda bulunan esterlerden bazıları şunlardır:

Etil asetat

Etil n-butirat

Etil n-kaproat

Etil izo-valerat

Etil β -metilvalerat

Etil propiyonat
 Metil asetat
 Metil nitrit
 Solanesil laurat
 Solanesil miristat
 Solanesil palmitat
 Solanesil oleat
 Solanesil linoleat
 Solanesil asetat

Solanesil esterlerinin % 65 kadarını palmitat ve oleat, % 30 kadarını da linoleat meydana getirmektedir.

e) Karbonil Bileşikleri

Küçük moleküllü karbonil bileşiklerinin varlıkları çok önceleri tesbit edilmiştir. Bunlara örnek asetaldehid, propiyonaldehid, aseton, metiletilketon verilebilir. Son zamanlarda glioksal, diasetil gibi dikarbonil bileşikleri de dumanda bulunmuş olduğu gibi dipalmitilketon gibi büyük moleküllü ketonların varlığı da tesbit edilmiştir.

f) Asitler

1871'de Vohl ve Eulenberg tütün dumanında küçük moleküllü uçucu asitlerin varlığını tesbit etmişlerdir (Aksu, 1967). Dumandaki asitlerin % 50 sini asetik asit, % 25 ini de formik asit oluşturmaktadır. Uçucu asitler toplamı, sigara dumanında puro dumanındakinin 3 katı kadardır. Sigara dumanında uçucu olmayan asitlerin % 75 ini laktik-glikolik-süksinik ve malonik asitler meydana getirmektedir.

g) Fenoller ve Polifenoller

Tütün dumanında basit, küçük moleküllü fenollerin bulunması küçük moleküllü asitlerin bulunması ile beraber olmuştur. Son yıllarda fenollerin sağlığa zararlı olduklarının anlaşılması bu alanda çok sayıda araştırmanın yapılmasına yol açmıştır. Böylece çeşitli fenollerin varlıkları tespit edilmiştir.

Dumanda tütündekinden fazla fenol bulunmaktadır. Bu da bunların hücre zarı maddelerinin parçalanma ürünleri

olduğuna delildir. Filtreli sigaranın dumanındaki fenol miktarı da filtresiz sigaranın dumanındaki fenol miktarından daha azdır. Bu da fenollerin filtreler tarafından önemli derecede tutulduklarını göstermektedir.

h) Alkaloidler ve Bazlar

Dumanda bulunan alkaloidlerin en önemlisi nikotindir.

-Dumanda Nikotin

Nikotin, tütün yaprağından elde edilmeden önce, ilk kez Malens tarafından dumanda belirlenmiştir (Aksu, 1967). Nikotinin sigara, puro, pipo ve nargilenin tüketiminden dumana geçişı, yaprak dokusunda bulunan nikotin tuzlarının ısının etkisiyle dissosiye olmasından serbest kalan bu alkaloidin buharlaşması ile olur. Bu arada sigaranın dolguluğunda bulunan nikotinin bir kısmı oksitlenerek ya da parçalanarak başka maddelere dönüşür, bir kısmı nefes aralarında yan dumana geçer, bir kısmı da izmaritte tutulur. Asal dumana geçen nikotinin miktarına "nikotin verimi" denir. Nikotinin ateş bölgesinde kimyasal değişmelere uğramasından nornikotin, miosmin, nikotin, N-metilmiosimin, nornikotin, nikotinamid, β -pikolin, piridin, pridinaldehid, aminopiridin gibi maddelerin ürettiğı belirlenmiştir. Buna karşılık, yaprak dokusunda bulunan oksinikotinin parçalanmasından nikotin oluştuğı Pyriki tarafından ileri sürülmüştür. Bu araştırmacı, oksinikotin içermeyen sigara örneklerinin dumanındaki nazaran, oksinikotinli örneklerde nikotin veriminin belirli farkla daha yüksek olduğunu söylemiştir (Aksu, 1967).

Nikotin verimi üzerinde yanma sıcaklığının da bir etkisi söz konusudur. Düşük yanma sıcaklığında nikotin verimi yüksek sıcaklıktakinden daha fazladır. Nikotin verimi, tütürülen tütündeki nikotin seviyesine bağlıdır.

Sigaraların sıklık derecelerinin de nikotin verimi üzerinde oldukça etkisi vardır. Nikotin verimi sıklık dereceleriyle ters orantılı olarak değişir. İzmaritte kalan nikotin miktarı da aynı şekilde sıklık derecesiyle ters orantılı olarak değişir.

Sigara, puro vb. tüketiminde, nikotinin asal ve yan dumanlara geçen, izmaritte kalan ve parçalanarak dönüşen miktarları arasındaki orana "nikotin dağılışı" denir.

Sigara dumanında asitler tümünün eşdeğer miktarı, bazlar tümününkinden yüksek olduğu için burada nikotin asitlerle tuzlar oluşturur ve bu suretle pratikçe tamamı tanecikler fazına katılır. Purolar gibi bazik olanların dumanında asitler-bazlar dengesi tersine olduğundan başka bir deyişle reaksiyon bazik olduğu için nikotinin küçük bir kısmı tuz halinde bağlanmadan kalır ki buna "serbest nikotin" denir. Bu serbest nikotin puro dumanının başlıca gaz fazında, buhar halinde bulunur. Bununla beraber yapılan bir inceleme ağıza alınan dumanda, insan vücudu sıcaklığında, nikotin tuzlarının disosiyasyon sabiti ve ortam pH sine göre küçük bir serbest nikotin buharı basıncı bulunduğunu göstermiştir. Bu serbest nikotin, ağız boşluğu çeperindeki salyada çözünerek denge bozulur, yeniden bir miktar nikotin basıncı ortaya çıkar ve bu mekanizma dumanın ağızda kaldığı sürece devam eder.

Pipo tütünleri çoğunlukla yüksek nikotinlidir. Bu nedenle nikotin verimi yüksektir. Pipo lülesi içinde ateş kesiminin kesiti, sigaranınki ile karşılaştırılamayacak kadar büyüktür, bu da nefes başına düşen nikotin verimini bu oranda büyültür. Nargilede de nargile şişesindeki suyun dibinden yukarı doğru çıkan dumanlı bullerin içerdiği serbest nikotin molekülleri, bulün çeperlerini oluşturan su tarafından tutulur.

Bazı araştırmacılar, purolarda nem oranı yükseldikçe, bazik reaksiyonla buharların tütün dokusuna o kadar kolay nüfus ederek nikotini tuzlarından daha kolay açığa çıkardıklarını ve sonuç olarak serbest nikotin oranının yükseldiğini ileri sürmektedirler (Aksu, 1967).

-Amonyak, Bazlar ve diğer Alkaloidler

Dumandaki bazların en kuvvetlisi amonyak olduğu için bunun tamamı tanecikler fazında tuz halinde bağlı olarak bulunur. Nikotini tuzlardan açığa çıkaran da amonyaktır. Tüketilen tütüne göre dumana geçen nikotin miktarının % 0.020-0.217 arasında değiştiği Pyriki tarafından bildirilmiştir (Aksu, 1967).

i) Amino Asitler

Tütün dumanında az oranda bulundukları birkaç araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu sınıf bileşikler, iç-iyon şebekesi karakterinde olduklarından pek uçucu olmayan maddelerdir. Bundan dolayı da dumanda ancak küçük miktarlarda bulunmuşlardır. Örneğin tek sigara için glutamik asit verimi 10 µg, glutamin verimi de 7 µg bulunmuştur (Aksu,1967).

j) Karbonhidratlar

Karbonhidratların oldukça büyük moleküllü ve çok sayıda hidroksil grupları taşıyan bileşikler olduğu düşünülecek olursa, bunların dumanda önemli miktarlarda bulunamayacağı önceden bilinebilir. Bununla beraber levoglukosan(1,6-anhidro-β-D-glukoz) gibi bazı anhidro şekerlerin bulunduğu belirlenmiştir. Japon araştırmacılar da kendi tütünlerindeki dumanda indirgen şekerlerin bulunduğunu kromatografik yöntemle tayin etmişlerdir(Aksu,1967).

k) Anorganikler

Dumanın gaz fazında karbondioksit ve karbonmonoksitin ortalama konsantrasyonları hakkında daha önce bilgi verilmişti.Son yıllarda tütün dumanında azotmonoksit ve azotdioksit gibi azot oksitleri bulunduğu söylenmiştir. Dumanın gaz fazında bulunan anorganiklerden biri de H₂S dir. Son yıllarda bazı metallerin iz halinde dumana geçtikleri belirlenmiştir. Ayrıca tütünlerde insektisidlerden ileri gelen arseniğe rast gelinmiştir. As₂O₃ cinsinden 0.5-1.5 ppm arsenik içeren Rus tütünlerinden dumana geçen miktarın % 4-5 olduğu belirtilmiştir. Tütündeki bu miktar arsenik,topraktan alınan arseniktir; insektisidlerden kalan arsenik miktarları çok daha yüksektir. Böylece miktarın yükselmesiyle dumana geçen yüzde de yükselmektedir(Aksu,1967).

1.7. Filtreler

Sigara dumanındaki nikotin ve zifir miktarını azaltmak amacıyla uygulanan ilk teknolojik yöntem filtrelerdir. Filtreasyon işleminde sıvı ve katı tanecikler filtre maddesi tarafından mekanik olarak tutturulur. Bazı duman bileşenlerinin

filtre ile tutulduktan sonra aerosol buharı ile elüsyonu ve çeşitli tipteki filtre maddeleri ile kimyasal ya da fiziksel ilişkiye dayanan seçici filtrasyon şeklinde olur.

1.7.1. Filtre Maddeleri

En çok kullanılan filtre maddeleri sellüloz asetat ve saf sellülozdur. Polipropilen, cam yünü, poliüretan ve rayon da filtre maddesi olarak kullanılabilir.

Filtre yapımında en çok kullanılan sellüloz asetat seçici olarak fenollerini tutar. Asetat filtresi yapımında primer sellüloz asetat veya sekonder sellüloz asetat kullanılır. Yapım sırasında sellüloz asetillendirilerek sellüloz triasetat haline getirilir. Daha sonra kısmi sabunlaştırma ile sellüloz diasetatı dönüştürülür. Sellüloz diasetat asetonda çözülerek küçük delikli bir yüzeyden püskürtülür, daha sonra çözücü buharlaştırılarak çok sayıda sürekli bükülmüş birbirine paralel liflerden oluşan kablolar elde edilir (Asetat towu). Elde edilen tow, tow işleme makinasına belirli bir kalınlıkta verilir; elyafa yayılma ve açılma işlemleri uygulandıktan sonra adsorban taneciklerin liflerin yüzeyine yapışmasını sağlamak için madde eklenerek filtre çubuğu makinasına verilir. 20 mm uzunluğunda, 50 mm sıklığında (su sütunu) bir sellüloz asetat filtresinin toplam filtrasyon etkinliği % 43 tür.

Seçiciliği artırmak için filtre maddesine bazı katkı maddeleri ilave edilir. Örneğin asetat filtresinde katkı maddesi olarak gliserin triasetat (triasetin), polietilen glikol, trietil sitrat ve asetil trietil sitrat kullanılır.

Her sigara filtresi filtre maddesine bağlı olarak dumanın kompozisyonunu kalitatif olarak değiştirir. Bir filtrede parçacık fazı büyük oranda tutulduğu takdirde dumanındaki buhar fazının akışı kolaylaşır ve bu da içimi olumsuz etkiler. Buhar fazının istenilen oranda tutularak dengeli filtrasyon sağlanabilmesi için filtreye birtakım adsorban maddeler ilave edilir. Filtre yapımında adsorban olarak aktif kömür, aktiviteyi farklı karbon, magnezyum silikat ve silikajel kullanılmaktadır.

1.7.2. Filtre Çeşitleri

Mono Filtreler: Tek filtre maddesi kullanılarak yapılan filtrelerdir. Saf sellüloz ve sellüloz asetat filtresi örnek olarak verilebilir.

Dual Filtreler: İki çeşit filtre maddesi kullanılarak yapılan filtrelerdir. Asetat-sellüloz veya asetat-asetat filtresi örnek olarak verilebilir.

Cavity Filtreler: Bu filtrelerle tanecik ve buhar fazının dengeli filtrasyonu temin edilebilir. Bu filtrelerin yapımı bir veya iki çeşit filtre maddesinin arasına adsorban madde ilavesiyle gerçekleştirilebilir.

-Asetat-aktif kömür+magnezyum silikat-saf sellüloz

-Asetat-aktif kömür-asetat

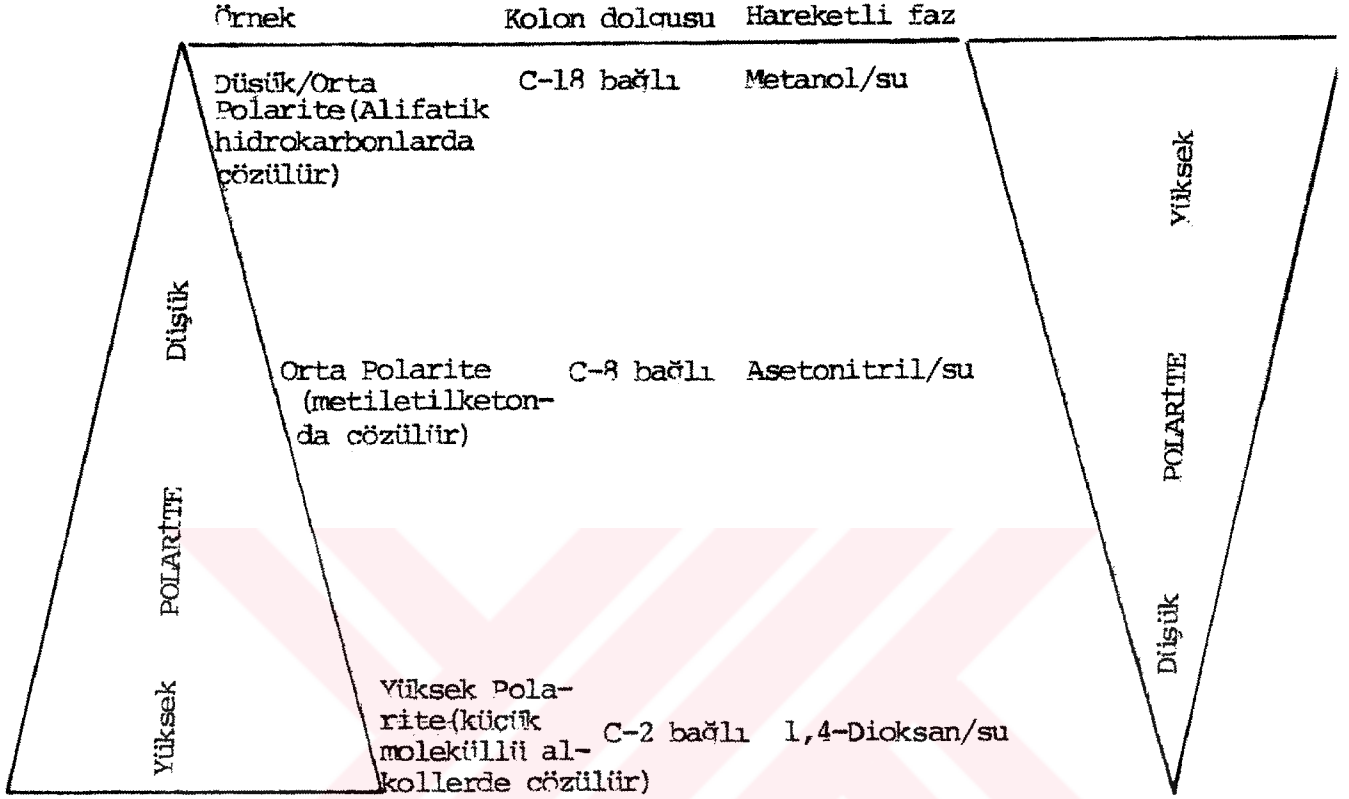
-Asetat-magnezyum silikat-sellüloz filtreleri örnek olarak verilebilir.

1.8. Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisinde kullanılan hareketli fazın sabit fazdan daha polar olması halinde kromatografik yönteme "Ters-Faz Kromatografisi" (Reversed-Phase, RP) adı verilir. Aynı şekilde polar hareketli faz kullanılırsa yüksek basınç sıvı kromatografisi, Ters-Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi olarak adlandırılır.

Pratikte ters-faz kromatografisinde genellikle C_{18} ya da C_8 fonksiyonel gruplarına sahip silika dolgu maddesi olarak kullanılır. Hareketli faz olarak su ve polar organik çözücülerin karışımları kullanılır (Şekil 1) (Willard, 1981).

Ters-faz kromatografisi (RPC), 1950'de Howard ve Martin tarafından ilk kez uygulanmıştır (Colin, 1977).



Şekil 1. Ters-faz kromatografisinde hareketli faz çözücülerini ve kolon dolgu maddeleri

Adsorban olarak kullanılan silika, alumina gibi dolgu maddeleri bazı hidrokarbonlarla reaksiyona sokularak ters faz kromatografisinde kullanılan kolon maddeleri hazırlanır. Bu tür dolgu maddelerinin kullanılması halinde "normal" kromatografinin aksine aseton, asetonitril, etanol, metanol, su gibi kuvvetli polar çözücüler kullanılır. Son yıllarda yüksek basınç sıvı kromatografisi daha yaygın biçimde kullanılır.

makta ve çoğu hallerde normal faz kromatografisine tercih edilmektedir. Bunun başlıca nedenleri şunlardır:

-Çözücü seçimi kolaydır.

-İçinde az kirlilik bulunduğu ve kolay temizlenebildiği için uzun ömürlü kolonlar hazırlanabilir.

-Polar çözücüler pek çok sayıda numuneyi kolayca çözebilir.

Ters-faz kromatografisi, 1969'a kadar yalnızca sıvı-sıvı kromatografisinde(LLC) başarılabilmıştır. Bu yüzden uygun adsorbanlara ihtiyaç duyulmuştur. Sıvı sabit faz polimer veya üçlü sistemlerin düşük polariteli fazlarından meydana gelen yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Araştırmacıların sıvı-sıvı kromatografi(LLC) deki çalışmalarına bir örnek verilirse; Locke 1968'de squalane-asetonitril sistemini kullanmıştır. Sabit faz olarak squalane ve hareketli faz olarak asetonitril kullanmıştır.(Parris,1978).

Halasz ve Sebastian'ın(1969) kimyasal bağlı(bonded phase) sabit fazları kullanmasından sonra ters-faz kromatografi(RPC) çok büyük bir gelişme göstermiştir(Colin, 1977).

1971 de Schmit ve arkadaşları hidrofobik kimyasal bağlı sabit faz kullanmışlardır. Bu sabit faz olarak kullanılan dolgu Permafaz ODS olarak bilinir(Colin,1977).

Silika parçacıklarının yüzeyine apolar veya polar grupların her ikisini de bağlamak mümkündür. Bağlı fazlar ters-faz kromatografide(RPC) kullanılabildiği gibi "normal" kromatografide de kullanılabılır. Bu nedenle Pryde bağlı faz kullanılmasının sıvı fazda büyük gelişme sağladığını ifade etmiştir(Colin,1977). Ancak bağlı fazlar bütün ayırım problemlerini çözememektedir. Bununla birlikte son zamanlarda yeni bağlı fazların yapılması kullanım alanında büyük gelişmeler sağlamıştır.

Son yıllarda ters-faz kromatografisi (RPC) önemli gelişme göstermiştir. Major, 1974'lü yıllarda yapılan kromatografik ayırımların %20 kadarının ters-faz kromatografi ile başarıldığını ifade etmiştir(Colin,1977). Daha sonraki yıllarda (HPLC)'yle bu ayırımların %70'e çıkması beklenmektedir.

Ters-faz kromatografisindeki bu kadar büyük gelişmeye karşın ters-faz kromatografik mekanizma hakkında henüz çok şey bilinmemektedir. Sıvı kromatografisinin iki temel parametresi, çözücü ve kolon maddesi, ters-faz içinde öncelikle düşünülməsi gerekli konulardır.

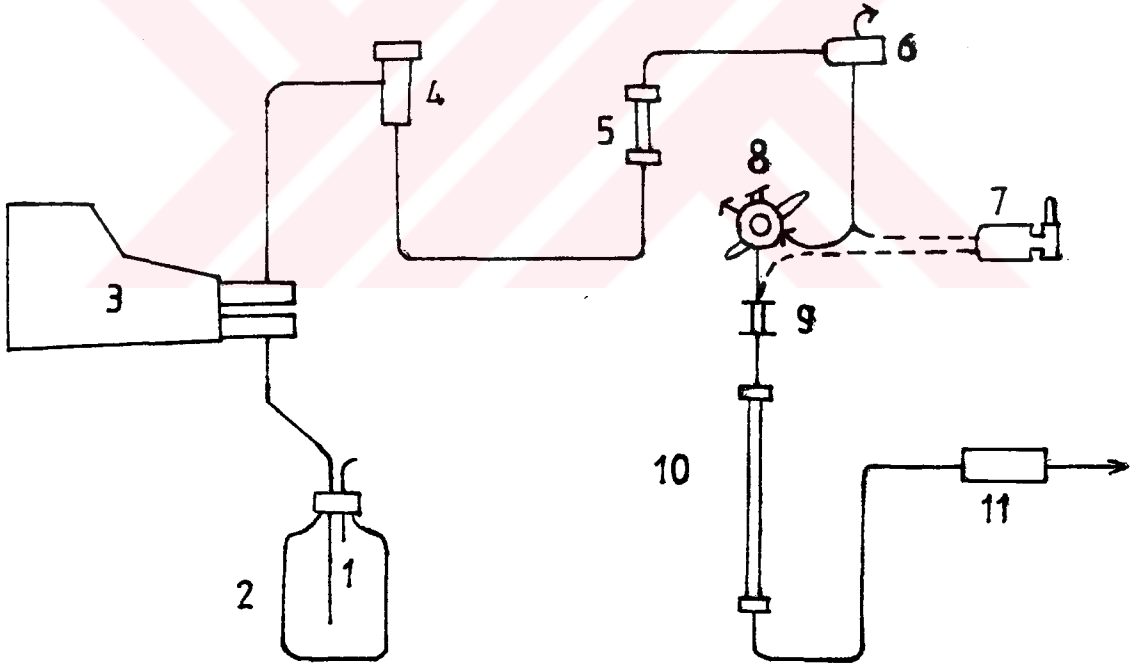
Çok yaygın biçimde su ile beraber bir organik çözücü, hareketli faz olarak kullanılır. Organik çözücünün karışımındaki konsantrasyonu, numunenin kolonda alıkonma süresini tayin etmektedir. Su ile beraber kullanılan organik çözücülerden metanol ve asetonitril bir çok analizin gerçekleştirilmesinde yeterli olmaktadır. Zayıf polar maddelerin analizinde susuz çözücülerin kullanıldığı da son zamanlarda görülmektedir. Parris suda çözünmeyen bazı polar olmayan maddelerin ayırımında susuz çözücü kullanmanın daha başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir (Özcinler, 1980).

Ters-faz dolgu maddesi olarak daha önce belirtildiği gibi silika ile uzun zincirli hidrokarbonların birleşmesiyle hazırlanmış maddeler kullanılmaktadır. Hidrokarbonun zincir uzunluğu 1 den 22 karbona kadar değişmektedir. Laboratuvarlarda hazırlanan kolon maddelerinin dışında ticari firmalardan temin edilenlerin yüzey alanlarından, tane çaplarından başka çoğu kez kimyasal yapılarının bilinmemesi araştırmacıları kromatografik ayırma mekanizmasının açıklanmasında güç durumda bırakmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar kullanacakları kolon maddelerini kendileri hazırlama yoluna gitmektedirler.

1.8.1. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi Cihazı

Şekil 2' de bir HPLC sisteminin şeması gösterilmiştir. HPLC cihazı ana bölümler olarak bir veya birkaç çözücü rezervuarı (gradiyent elusyon için), pompa, akış ve basınç kontrol sistemleri, puls gidericiler, enjeksiyon vanası, ön kolon, analitik kolon, detektör ve sinyal kaydediciden meydana gelir.

Çözücü rezervuarından yüksek basınç pompası ile alınan hareketli faz, sürekli akışı sağlayan puls gidericilerden geçtikten sonra enjeksiyon bölgesine gelir ve buraya enjekte edilen numuneyi kolona sürükler. Kolonu terkeden bileşenler detektöre ulaşır ve burada meydana gelen sinyaller bir yazıcıda veya integratörde kaydedilir. Bir HPLC cihazındaki ana bölümler aşağıda kısaca anlatılmıştır (Özcimder, 1988).



Şekil 2. Yüksek basınç sıvı kromatografi cihazının şeması (Varian 5500) 1: Çözücü rezervuarı, 2: Çözücü rezervuar filtresi (10 mikron), 3: Yüksek basınç pompası, 4: Akış kontrol aygıtı, 5: Puls giderici, 6: Çıkış (sistemi temizleme) vanası, 7: Rheodyne enjeksiyon vanası, 8: Valco enjeksiyon vanası, 9: Ön kolon, 10: Analitik kolon, 11: Detektör

-Çözücü Haznesi

Paslanmaz çelik, teflon veya camdan yapılmış 1-2 litre-lik kaplar çözücü rezervuarı olarak kullanılır. Gerektiği hallerde sıvının ısıtılabilmesi için ısıtma düzeneği bulunur. Çözücüden önceden ultrasonik karıştırıcıda tutularak çözünmüş oksijenin alınması gerekir. Kolonda gaz birikmemesi, akış hızının değişmemesi için oksijenin alınması çok önemlidir. Pompaya kadar sıvı, teflon tüplerden gelir. Tüp uçlarında 5-10 mikronluk filtreler pompaya katı taneciklerin ulaşmasını önler.

-Pompa

Kromatografik sistem basınç altında çalışmaktadır. Uygulanan basınç akış hızına, kolon boyuna, tanecik büyüklüğüne ve sıvının akışkanlığına bağlı olarak 3000 atmosfere kadar çıkmaktadır. Pompa 0.1 ml/dak duyarlılıkta (son zamanlarda 0.01 ml/dak istenmektedir) akış hızını kontrol edebilir ve korroziona dayanabilir özellikte olmalıdır.

-Kolona Numune Verme

Sistem basınç altında olduğu için kolona numune verilmesi gaz kromatografisinden farklıdır. Genellikle ya doğrudan kolona vermek ya da bir vana kullanmak suretiyle enjeksiyon yapılır. "On-column" enjeksiyon sistemlerinde, gaz kromatografisinde olduğu gibi bir enjektör kullanılarak septumdan madde doğrudan yüksek basınç altındaki kolona verilir. Enjektörün sık sık kolon dolgu maddesi ile tıkanması başlıca sakıncasıdır.

Son yıllarda 300 atmosfere kadar dayanabilen numune vanaları kullanılmaktadır. Vana sisteminde "sıvı" akışı ke-sintiye uğratılmadan numune belli kapasitedeki (10-50 µl) "loop"'a verilir. Sonra vana kolu döndürülmek suretiyle sıvının "loop" tan geçişi sağlanıp, numune kolona sürüklenir.

-Kolon ve Kolon Doldurma

Gaz kromatografisinin aksine, uzun kolonlar çok az kullanılır. Genellikle 25-50 cm uzunluğunda, 2-5 mm çapında paslanmaz çelikten veya camdan yapılmış kolonlar

kullanılır. Camdan yapılan kolonlar ile, diğer tür kolonlara göre daha küçük tepsi yüksekliği ve dolayısıyla daha yüksek verim elde edilebilmektedir.

Yüksek basınç sıvı kromatografisi kolonlarının doldurulması teknik ve dikkat gerektirmektedir. Şöyleki: Hazır, doldurulmuş kolonları satınalma ihtimalinin bulunmasına karşın, henüz yüksek basınç sıvı kromatografisi ve "Ters-Faz" sıvı kromatografilerinde araştırmacılar çok değişik dolgu maddeleri denedikleri için kolonlar araştırmacılar tarafından kendi laboratuvarlarında doldurulmaktadır. Laboratuvarlarda doldurulan bu tür kolonların çoğu kere verdiği yanlış sonuçlara doldurma esnasındaki hatalar neden olmaktadır.

Kolon doldurmak için "kuru"ve "yaş" yöntemlerden yararlanılır. "Kuru" doldurma yöntemi kolon maddesinin ağırlığı nedeniyle kolon akması ilkesine dayanır. Bu yöntem çok zaman alıcıdır ve ancak tanecik çapı büyük maddelere uygulanabilir.

"Yaş" doldurma yönteminde dolgu maddesi önce bir sıvı içinde homojen süspansiyon haline getirilir. Sonra süspansiyon halindeki madde hiç zaman kaybetmeden yüksek basınç altında(200-300 at) kolona doldurulur. Özel dikkat isteyen bir yöntemdir. Aksi halde, doldurulan kolonlarla çok büyük alıkonma süreleri (büyük k'), düşük ayırıcılık gibi istenmeyen sonuçlar elde edilir.

-Detektörler

Yüksek basınç sıvı kromatografisinde numune bir sıvı faz içinde kolonu terketmektedir. Bu numunenin tayini için kullanılabilecek detektörün seçimi GLC'deki kadar kolay değildir. Gaz-sıvı kromatografisinde taşıyıcı gaz ile numunenin özellikleri arasında belirgin farklar bulunmaktadır. Halbuki yüksek basınç sıvı kromatografisinde numune ve çözücü özellikleri genellikle birbirine çok yakındır. Bu nedenle ya çözücü detektöre gelmeden numuneden ayrılabilmelidir (alevde iyonlaşma detektöründe olduğu gibi) ya da numuneyi kendi özellik farkından(UV absorpsiyonu) veya çözücü numune karışımının toplam özellik değişmesinden yararlanarak(kırılma indeksi detektörü) belirlemek gerekmektedir.

En yaygın olarak UV detektörü kullanılmaktadır. Sıcaklık ve akış hızındaki değişmelere karşı diğer detektörlere göre daha az duyarlıdır. Nanogram düzeyinde madde tayini yapılabilir. UV absorpsiyonu için 254 veya 280 nm dalga boyundaki ışınlar kullanılır. Sık kullanılan çözücülerin "cut-off" ları bu değerlerin altındadır. Tayini yapılan maddenin kromofor gruplar bulundurması halinde UV detektör kullanılabilir. Seçici detektör olarak düşünülebilir.

UV kadar duyar olmamakla beraber kırılma indeksi detektörü (RI) çok kullanılır. Kullanımındaki en büyük sakınca sıcaklık değişmelerine karşı çok duyar oluşudur, ancak universal bir detektördür. Tüm maddelerin, prensip olarak tayini yapılabilir.

Sık kullanılan bir başka detektör Alevde İyonlaşma Detektörüdür (moving wire flame ionization detectör). Yüksek basınç sıvı kromatografisinde kullanılan alevde iyonlaşma detektörünün gaz kromatografisinden en önemli farkı, çözücünün detektöre gelmeden buharlaştırılıp ayrılmasıdır. Bu detektör daha çok kaynama noktası yüksek maddelerin analizinde kullanılır. Yeteri kadar duyar olmayışı en büyük sakıncasıdır.

1.9. Tütünde Madde Tayini

Tütün ve dumanında 3000'den fazla kimyasal madde olduğu daha önce söylenmişti. Bu kadar çok maddenin analizi için gereken yöntemleri burada ayrıntılı olarak vermeye imkan yoktur. O nedenle madde tayininde kullanılan yöntemleri genel olarak verip bunlardan insan sağlığını önemli derecede etkileyenlerin analiz yöntemlerine değinelim.

Tütün ve dumanındaki maddeler öncelikle çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle alınır ve aşağıdaki yöntemlerden biri veya birkaçı kullanılarak tayin edilirler.

- İnce-Tabaka Kromatografisi
- Kağıt Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi
- Sıvı Kromatografisi
- IR Spektrometrisi
- Floresans Spektrometrisi
- Spektrofluorometri
- Kütle Spektrometrisi

Daha çok sigara biçiminde tüketilen tütünde tayinleri yapılan sağlığa zararlı maddeleri dört grupta toplamak mümkündür.

- Nikotin
- Kanserojen maddeler
- Tahriş edici maddeler
- Karbonmonoksit

Burada ilk ikisine değinilecektir.

-Nikotin

Çeşitli şekillerde tüketilmekte olan tütünde ortak olan nokta kana nikotin geçmesidir. Bu sigara içenlerde yaklaşık 7 saniye içinde gerçekleşirken diğerlerinde bu süre daha uzundur. Sigara içiminde baş etken olarak nikotinin düşünülmesinin nedeni içicinin dumanı direkt ciğerlere göndermesidir. Nikotin kronik kalp ve damar hastalıklarına sebep olmakta ve merkez sinir sistemi üzerine etki etmektedir. Araştırmacılar nikotini çeşitli yöntemlerle tayin etmişlerdir.

Araştırmacı bir grupsellüloz asetat filtresindeki nikotini yüksek basınç sıvı kromatografisi ile tayin etmişlerdir (Green, 1985). Bunun için sigara izmaritlerini asetonitrilde çözmüşler ve filtre çözeltisine 0.08 M dietilaminfosfat tamponu ilave etmişlerdir. Daha sonra filtre süspansiyonunu süzgeç kağıdından ve disposibl filtreden süzmüşlerdir. Bu çözeltiden 15 µl HPLC'ye enjekte etmişlerdir. Önce hareketli faz olarak %80,0.08 M dietilamin-fosfat tamponu ve %20 asetonitril karışımı kullanmışlardır. Daha sonra da %70,0.01 M dimetilamin-fosfat tamponu ve %30 asetonitril kullanmışlardır. Analiz süresi 12 dakika olarak verilmektedir.

Andersen (Andersen, 1983) tütün yaprağında element, nikotin, nikotinik asit ve N-nitrosonornikotin analizi yapmıştır. 1 kg tütün örneğini %3-4'ü nem olacak şekilde nemlendirip desikatöre koymuştur. 20 hafta bekledikten sonra portakal-kırmızı renkli olan kondensattan 3-4 tane-sini küçük şişeye almış ve 96 saat P_2O_5 altında kurutmuştur. 75 mg kurutulmuş örneği analizlerinde kullanmıştır.

Elementel analizler için karbon, hidrojen, azot, oksijen, klor ve kükürt 1 mg/ml lik sulu çözeltilerinin absorbanlarını 190-400 nm de spektrofotometrede ölçmüştür.

Toplam uçucu azotlulardan azot değeri için kondensattan standart sülfamik asit ile titre ettikten sonra pH:12 de su buharı destilasyonu ile azot, hidroklorik asit bulunan bir kap içine almıştır.

N-Nitrosonornikotini gaz kromatografi ve HPLC ile tayin etmiştir. HPLC'yle yapılan analizde iki tür hareketli faz ve kolon dolgu maddesi kullanmıştır.

-Kanserojen Maddeler

Sigara katranında bulunan başlıca kanserojen maddeler polisiklik aromatik hidrokarbonlar(Snook, 1975;Severson,1979;Ono,1981), nitrosaminler(Andersen,1983;Özdemir,1987) ve β -naftilamindir.

Snook ve arkadaşları sigara dumanında bulunan PAH'lardan bir kısmının analizini yapmışlardır (Snook, 1975).

Bu amaçla 450 sigaranın dumanı yoğunlaştırıldıktan sonra nötralleştirilip, aktifleştirilmiş silika kolonda fraksiyonlara ayrılmıştır. İlk fraksiyon petrol eteri ile alındıktan sonra, benzen-petrol eteri karışımı ile ikinci fraksiyon alınmıştır. İkinci fraksiyondan çözücüler buharlaştırıldıktan sonra GC ile PAH analizi yapılmıştır.

Şimdi de dumandaki benz(a) piren'in tayin yöntemlerine değinelim.

1.9.1. Benz(a) Piren Tayini

Severson ve arkadaşları (Severson, 1979) 90 adet sigarayla sigara içme makinasına içirtip dumanlarını biriktirmişlerdir. Yoğunlaştırılmış duman silisik asitle doldurulmuş kolondan geçirilmiş ve petrol eteri hareketli faz olarak kullanılmış böylece PE fraksiyonu elde etmişlerdir. Sonra %25 benzen, %75 petrol eteri karışımı kolondan geçirilerek BPE fraksiyonu elde etmişlerdir. Daha sonra jel filtrasyon sistemi ile PAH ları ayırmışlardır. Gaz kromatografisi yöntemini kullanarak tayin yapmışlardır. Çeşitli sigaralarda tayin edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlardan benz(a) piren miktarı 1.6-2.3 µg/100 sigaradır.

Ono ve arkadaşları (Ono, 1981) da izmaritlere β-laktoglobulin ilave ederek tütün dumanındaki benz(a) piren'i tayin etmişlerdir.

%5 β-laktoglobulin olmak üzere suda çözmüşler ve 2-4 mg filtrelelere enjekte etmişlerdir. Çeşitli miktarlarda β-laktoglobulin verildikten sonra 50 adet sigara, sigara içme makinasında içirilmiş ve kondensata Davis ve arkadaşlarının yöntemi uygulamışlardır (Ono, 1981). Daha sonra 427 nm de floresans spektrofotometresini kullanarak kantitatif analiz yapmışlardır. β-laktoglobulin ilavesiy-

le benz(a) piren konsantrasyonu düşmektedir.

1.9.2. Araştırmanın Amacı

Görüldüğü gibi duman ve zifir içinde çok sayıda organik bileşik bulunmaktadır. Hepsinin analizini yapmaya imkan veren bir yöntemin varlığı kesinlikle düşünülemez. Bu nedenle çok içerikli bir çalışmanın başlangıcı olarak kanserojen bir madde olan benz(a) pirenin analizi alınmıştır. Yöntem, daha sonra diğer polisiklik aromatik hidrokarbonlara uygulanacak ve ardından da diğer maddelerin analizine geçilecektir.

Bu çalışma Özcimder ve Gümrükçüoğlu'nun sigara filtreleri üzerine yaptıkları araştırmanın bir devamı niteliğindedir (Özcimder, 1987). Adı geçen araştırmacılar yaptıkları çalışmada benz(a) piren'in filtre zifirinden geri alınabilirlik oranını ancak % 30.75 olarak bulmuşlar ve bu nedenle yöntemlerini gerçek örnekler üzerinde denememişlerdir. Araştırmamız geri alınabilirliği artırmak ve geliştirilen yöntemi gerçek örnekler üzerinde denemeyi amaçlamaktadır.

2. DENEYSEL ÇALIŞMA

2.1. Materyal

Çalışmalar sırasında kullanılan;

-Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan benz(a) piren standardı Community Bureau of Reference Materials (Bruksel) den temin edilmiştir.

-n-Heksan, Merck (Almanya) firmasından alınmış olup kromatografik saflıktadır.

-Asetonitril ve diklorometan Merck (Almanya) firmasından alınmış olup analitik saflıktadır.

-Ters-faz dolgu maddesi olarak LiChrosorb RPC 18 (Merck) kullanılmıştır. Tanecik çapı 5×10^{-3} mm, yüzey alanı $200 \text{ m}^2/\text{g}$ dır.

-Sigara filtreleri Fakültemiz elemanlarının içtik-

leri sigara filtreleri toplanarak hazırlanmıştır.

2.2. Cihaz

Varian, 5500 model Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi kullanılmıştır. Daha önceki bölümde yüksek basınç sıvı kromatografisinin bölümlerine kısaca değinilmişti. Bu bölümde deneylerde kullanılan cihazın önemli bölümleri anlatılacaktır.

- Çözücü rezervuarı: Camdan yapılmış 1 litrelik kaplardır. Bu kapların içinde çözücünün pompaya kadar gitmesini sağlayacak teflon tüpler vardır. Tüplerin uçlarında ise 10 mikronluk filtreler bulunmaktadır.

- Pompa: 500 atmosfere kadar basabilen mekanik pompadır. 0.1-10 ml/dak sıvı pompalama kapasiteli ve tek pistonludur.

- Enjeksiyon bölmesi: 6-Port Valco vanalı enjeksiyon bölmesinde numuneler enjekte edilmiştir. 5-10 mikrolitrelik enjektörler kullanılmış olup, enjeksiyon hacmi 10 mikrolitredir.

- Kolon: Ters-faz kolon dolgu maddesi olarak 5 mikrometre tanecik çaplı, $200 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanlı LiChrosorb RPC 18, 4.6 mm iç çapında 2.5 cm uzunluğundaki paslanmaz çelik 250 atmosfer basınç altında doldurulmuş kolon kullanılmıştır.

- Detektör: 190-700 nm aralığında UV-200 Varian detektör sistemi kullanılmıştır.

- Yazıcı: Packard, 642 model 10 mV/tam sapma duyarlıktaki yazıcı kullanılmıştır.

2.3. Yöntem

Benz(a) piren tayini üç basamakta tamamlanmıştır.

- Ekstraksiyon

- Konsantrasyon

- Kromatografik ayırım, kalitatif, kantitatif değerlendirmeleri üzerinde geri alınabilirlik çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, diklorometan içinde hazırlanmış (6.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) standart 50 μl enjekte edildi ve aşağıdaki yöntem-

lerle geri alınabilirlik yüzdesi araştırıldı.

Çalışmada izmarit kelimesi filtre ile eş anlamda kullanılmıştır.

2.3.1. Geri Alınabilirlik

a) Sokslet cihazı ile diklorometan ekstraksiyonu

Standart eklenmiş sigara izmaritleri süzgeç kağıdına sarılarak sokslet cihazına konuldu. Sokslet cihazının balonuna da 300 ml diklorometan konularak 3 saat ekstraksiyon yapıldı. Diklorometan döner vakum buharlaştırıcı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 10 ml diklorometan ve 5 ml diklorometan ilave edilerek bir tüpe alındı. Azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Sonra 0.5 ml diklorometan konuldu. Ancak HPLC'ye enjeksiyonu yapılamadı.

b) n-Heksan ile katı-sıvı ekstraksiyonu

3 saat sokslet cihazındaki ekstraksiyondan sonra döner vakum buharlaştırıcı ile diklorometan tamamen buharlaştırıldı. Ekstrakt 10 ml n-heksan ile 5 dakika karıştırılarak katı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. İkinci ekstraksiyon 5 ml n-heksan ile 1 dakika karıştırılarak yapıldı. Ekstraktlar toplandı ve azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 0.5 ml n-heksan ekstrakta konuldu ve 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

c) izmaritlerin ard arda n-heksan, metanol ve diklorometan ile ekstraksiyonları

3 saat sokslet cihazındaki ekstraksiyondan sonra diklorometan döner vakum buharlaştırıcı ile buharlaştırıldı. 15 ml n-heksan konularak 5 dakika karıştırılıp ilk ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra 10, 5, 5 ml n-heksan konularak üç kez ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyonlar sırasında 5 er dakika karıştırıldı. Ekstraktlar bir tüpte toplandı ve gooch krozedden süzüldü. n-Heksan azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Tüpe 0.5 ml n-heksan konuldu ve 5 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

İkinci ekstraksiyon metanol ile yapıldı. Önce 10 ml metanol balona konuldu ve 5 dakika karıştırıldı, sonra 5 er ml metanol 5 er dakika karıştırılarak 3 kez ekstraksiyon yapıldı. Ekstraktlar biraraya toplandı. Gooch krozedden süzüldü.

Üçüncü ekstraksiyon DCM ile yapıldı. Önce 10 ml sonra 3 kez 5 er ml ilave edilip 5 er dakika karıştırılarak ekstraksiyonlar yapıldı. Ekstrakt gooch krozeden süzüldü. Süzüntü azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 0.5 ml diklorometan konulup 5 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

d) Asetonitril ekstraksiyonu

Standart eklenmiş, kağıdı çıkartılmış sigara izmaritleri 100 ml asetonitrilde çözüldü. Çözelti santrifüjlendi ve filtre artıkları atıldı. Üstteki berrak çözelti döner vakum buharlaştırıcıda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 0.5 ml asetonitril konularak 5 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

e) Asetonitrilde çözünmeden sonra n-heksan, sikloheksan, diklorometan ekstraksiyonu

Kağıtları çıkartılarak standart eklenmiş sigara izmaritleri 100 ml asetonitrilde çözüldü. 50 ml n-heksan ile 5 dakika kuvvetlice karıştırıldı. n-Heksan fazı alındı ve buharlaştırıldı. Balon 10 ml n-heksan ile yıkanarak tüpe alındı ve azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Ekstrakta 200 µl n-heksan konuldu, 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı. Daha sonra 10 ml n-heksan ile yine 5 dakika karıştırılarak ikinci ekstraksiyon yapıldı. n-Heksan buharlaştırıldıktan sonra 100 µl n-heksan konuldu ve 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

20 ml sikloheksan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Sikloheksan fazı alınarak kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve 100 µl sikloheksan konuldu. 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

Asetonitril döner vakum buharlaştırıcıda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Ekstrakta 8 ml n-heksan konularak 1 dakika karıştırıp katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstrakt kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 200 µl n-heksan konuldu ve 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

İkinci katı-sıvı ekstraksiyonu diklorometan ile yapıldı. 9 ml diklorometan konup 1 dakika karıştırıldı ve kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Ekstrakta 500 µl DCM ko-

nuldu, 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

f) Asetonitrilde çözünmeden sonra n-heksan ile katı-sıvı ekstraksiyonu

İzmaritler 100 ml asetonitrilde çözüldükten sonra döner vakum buharlaştırıcıda buharlaştırıldı. Daha sonra 10 ml n-heksan ile katı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon sırasında 5 dakika kuvvetlice karıştırıldı. Alınan n-heksan fazı azot gazı ile buharlaştırıldı ve 200 µl n-heksan konuldu. Bundan 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

İkinci ekstraksiyon yine n-heksan ile 10 ml konularak yapıldı. Kuvvetlice 10 dakika karıştırıldı ve sonra kuruluğa kadar buharlaştırılıp 200 µl n-heksan konularak 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

Üçüncü ekstraksiyonda 5 ml n-heksan kullanıldı. Arasıra karıştırıldı ve kuruluğa kadar buharlaştırılıp 100 µl n-heksan konuldu. 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

g) Asetonitrilde çözünmeden sonra farklı pH larda (2,7,12) n-heksan ekstraksiyonu

Sigara izmaritleri asetonitrilde çözüldükten sonra hidroklorik asit ile pH:2 yapıldı. pH'ı 2 olan çözeltiye 10 ml n-heksan konup 5 dakika karıştırılıp 20 dakika bekletildi. Heksan fazı alındı, kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Asetonitril çözeltisinin pH'ı hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ile 7 yapıldı. 10 ml n-heksan konup, 5 dakika karıştırıldı. Heksan fazı alınıp kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Daha sonra asetonitril çözeltisinin pH'ı sodyum hidroksit ile 12 yapıldı. 10 ml n-heksan ile 5 dakika karıştırılıp heksan fazı alındı ve kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Bütün ekstraktlara 200 er µl n-heksan konuldu. 10 ar µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

h) Asetonitrilde çözünmeden sonra pH:1-2den-heksan ekstraksiyonları

Standart eklenmiş ve kağıtları çıkartılmış sigara izmaritleri 30 ml asetonitrilde çözüldü. Çözeltinin pH'ı hidroklorik asit ile 1-2 yapıldı. İlk ekstraksiyon 10 ml

n-heksan ile 15 dakika kuvvetlice çalkalanarak yapıldı. Heksan fazı alındı. Daha sonra yapılan 3 ekstraksiyon için 10 ar ml n-heksan kullanıldı ve pH kontrol edildi. Bu ekstraksiyonlar 5 er dakika kuvvetlice karıştırılarak yapıldı. Ekstraktlar kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Ekstraktlardan ilk üçüne 200 er µl, sonuncusuna 10 µl n-heksan konuldu. 10 µl lık enjeksiyonlar yapıldı.

Bu yöntemlerin her birisinin uygulaması sırasında önce standarttan daha sonra da numunelerden olmak üzere en az üçer kez yüksek basınç sıvı kromatografisine enjekte edildiler.

2.3.2. Sigara İzmaritlerinde Benz(a) Piren Tavini

Önce 10 adet sigara izmariti daha sonra da 30 adet sigara izmariti 30 ml ve 90 ml asetonitril konularak çözüldü. Hidroklorik asit ile pH: 1-2 ye ayarlandı. 10 adet izmarit çözeltilisi 10 ml n-heksan ile 15 dakika, daha sonra da üç kez 5 er ml n-heksan ile 5 er dakika karıştırılarak ekstraksiyonlar yapıldı. Ekstraktlar birleştirildi, kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve 200 µl n-heksan konuldu. 30 adet izmarit bulunan çözeltiliye 30 ml n-heksan konup 15 dakika kuvvetlice karıştırıldı. Daha sonra 3 kez 30 ar ml n-heksan konularak 5 er dakika karıştırıldı ve pH kontrolü yapıldı. Ekstraktlar birleştirildi ve kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Ekstrakta 200 µl n-heksan konuldu. Her iki ekstraktan da 10 µl lik enjeksiyonlar yapıldı.

Farklı sigaralardan 50 şer adet izmarit alınarak 100 er ml asetonitrilde çözüldü. HCl ile pH: 1-2 yapıldı. 30 ar ml n-heksan konularak 15 dakika karıştırılıp heksan fazları alındı. Sonra 3 er kez 30 ar ml n-heksan konulup 5 er dakika karıştırılıp ekstraksiyonlar yapıldı. Ekstraktlar birleştirilip, döner vakum buharlaştırıcıda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Balonlar 10 ar ml n-heksan ile yıkanarak heksan fazları alındı. Azot gazı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve 200 er µl n-heksan konuldu. 3 µl lik ve 4 µl lik enjeksiyonlar yapıldı.

2.4. Kromatografik Şartlar

Hareketli Faz : %84 asetonitril-su
 Akış hızı : 2 ml/dak, 160 at.
 Detektör : 254 nm, 0.01-0.001 abs. duyarlıkta
 Yazıcı : Duyarlık 10 mV/tam sapma, kağıt hızı
 0.5 cm/dak.

2.5. Kalitatif-Kantitatif Değerlendirme

Kolona standart benz(a) piren çözeltisinden enjekte edilerek kalitatif ve kantitatif değerlendirme yapıldı.

-Kalitatif Değerlendirme;

Bağıl alıkonma sürelerinden yararlanılarak gerçekleştirildi. Standartın ve numunedeki benz(a) pirenin alıkonma süresi 8 dakikadır.

-Kantitatif Değerlendirme;

Standartın ve numunedeki benz(a) pirenin pik boyları karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

$$\frac{h_x}{h_s} = \frac{C_x}{C_s} \quad (2)$$

h_x : Numunedeki benz(a) pirenin pik boyu

h_s : Standartın pik boyu

C_x : Numunedeki benz(a) pirenin konsantrasyonu

C_s : Standartın konsantrasyonu

3. BULGULAR, TARTIŞMA

Giriş bölümünde değinildiği gibi tütünün yanmasından oluşan duman ve izmaritte kalan zifir çok karmaşık bir yapıdadır ve çok sayıda organik ve anorganik bileşik içermektedir. Böyle bir matriks içinden bir veya iki maddeyi seçimli olarak tayin etmenin güçlüğü açıktır. Bu noktadan hareketle geri alınabilirlik çalışmalarına özel bir önem verildi ve yukarıda belirtildiği gibi çeşitli çözücüler çeşitli şartlarda denendi. Birçok polisiklik aromatik hidrokarbon için en iyi çözücü diklorometan olmasına rağmen sokset ile uzun süreli yapılan ekstraksiyonlarda ekstraksiyon

verimi %35 i geçmemiştir.

a) Diklorometan ile soksletten ekstraksiyon yapıldığında ekstraktın çok koyu olması nedeniyle kolonu ve enjektörü tıkama ihtimali göz önünde tutularak, kolona enjeksiyon yapmaktan kaçınılmıştır.

b) Sokslet cihazındaki ekstraksiyondan sonra n-heksan ile yapılan katı-sıvı ekstraksiyonunda da verim % 30 dolayında kaldı.

c) İzmaritlerin ard arda n-heksan, metanol ve diklorometan ile yapılan ekstraksiyonda n-heksan ekstraksiyonunda verim %35 dolaylarında kaldı. Metanol ekstraktı da pratik problemler getireceğinden enjekte edilmedi. Diklorometan ekstraksiyon verimi de çok az oldu. Buraya kadar özetlenen ekstraksiyon yöntemlerinde verimin düşük olmasına en büyük neden olarak sellüloz asetat filtresi gösterilebilir. Nitekim filtrenin asetonitril ile çözülmesi sonucu verim artmıştır.

d) Filtrenin asetonitrilde çözülmesi ekstraksiyon verimini artırabilir fakat direkt asetonitrilin enjeksiyonu kolonda pratik problemler meydana getirmektedir. Bu nedenle asetonitril çözeltisinden BaP'nin uygun organik çözücü ile alınması gerekmektedir. Seçilecek çözücünün aşağıdaki şartları sağlaması gerekmektedir.

- Asetonitril ile karışmamalı
- Benz(a) pireni çözmeli
- Seçici olmalı

Yukarıdaki üç şartı da sağlayabilecek çözücü bulmak hayli güçtür.

e) Asetonitrilde çözünmeden sonra n-heksan, sikloheksan ve diklorometan ile yapılan ekstraksiyonlarda n-heksan verimi %40 dolaylarında, sikloheksanda pik gözlenemedi ve diklorometan ekstraksiyonunda verim çok düşük kaldı.

f) n-heksan ile katı-sıvı ekstraksiyonunda verimde pek fazla gelişme sağlanamadı. Verim % 35 dolayında kaldı.

g) pH:2 de yapılan n-heksan ekstraksiyonunda verim %45-50, pH:7 de %10 civarında kaldı. pH:12 de de birçok problemler ortaya çıktı. Bu nedenlerle pH:1-2 aralığında

ekstraksiyonların yapılmasına karar verildi. Küçük pH değerlerinde tam bir çökme sağlanamadı. Tam bir çökme sağlanması ve berrak bir çözeltinin elde edilmesi doğrudan asetonitril çözeltisinin enjekte edilmesine imkan sağlayabilirdi. Laboratuvarında yüksek devirli (10 000 g) santrifüj cihazının olmaması da berrak çözelti alma şansımızı engelledi. Böyle bir ayırımın sağlanabilmesi kuşkusuz kromatografik ayırimda büyük kolaylık sağlayabilirdi.

h) pH:1-2 de yapılan ekstraksiyonlarda ekstraksiyon verimi %50 yi geçmiştir. Tablo 4'de,yapılan dört ekstraksiyon işlemi sonrasında geri alınabilirlik (recovery) değerleri gösterilmiştir. Geri alınabilirlik yüzdesinin daha yüksek olmamasına neden sigara izmaritlerinin birbirlerinden çok farklı oluşu gösterilebilir. Çünkü sigara içimi sırasında oluşan yanma ürünleri ve dolayısıyla duman ve ziftir kompozisyonu giriş bölümünde geniş biçimde değinilen faktörlere bağlıdır:

- Tütünün türü ve hazırlanışı
- Sigara üretimi sırasındaki proses şartları
- İçim şartları; içim süresi, havalandırma, ağızda tutma vb. Çok daha sıhhatli sonuçlar elde edilebilmesi için standart sigara içme makinesi ile hazırlanmış izmaritlerin kullanılması ileriki çalışmalarda düşünülmektedir.

Tablo 5'de çeşitli sigaralarda, Tablo 6'da 10, 30, 50 Samsun sigarası izmaritinden yapılan ekstraksiyon sonrasında bulunan benz(a) piren miktarları verilmiştir. Tablolardaki değerler geri alınabilirlik düzeltilmesi yapıldıktan sonra verilmiştir. Şekil 3'de bir standart enjeksiyonu sonrasında elde edilen kromatogram, Şekil 4'de ise bir ekstrakt enjeksiyonu sonrasında elde edilen kromatogram gösterilmektedir. Yukarıda verilen kromatografik şartlarda benz(a) pirenin alıkorma süresi "sekiz" dakikadır. Ancak pik şekli istenilen düzgünlükte değildir. Bunun nedeni kullanılmakta olan ters-faz kolonunun eski oluşudur. Üç farklı tür sigara izmaritinde benz(a) piren miktarları sırası ile 0.076, 0.039, 0.081 µg bulunmuştur.

Çalışmalar diğer kanserojen ve toksik maddelerin tayini için yöntem geliştirilmesi yönünde devam ettirilecektir.

Tablo 4. Sigara izmaritlerinde bulunan benz(a) piren için geri alınabilirlik (recovery) değerleri.*

Ekstraksiyon	Bulunan Madde Miktarı $\mu\text{g}/\text{izmarit}$	Geri Alınabilirlik %
I	1.960	29.04
II	0.980	14.52
III	0.398	5.89
IV	0.099	1.47
TOPLAM	3.437	50.92

*İki deney ortalamasıdır.

Tablo 5. Çeşitli sigara izmaritlerinde bulunan benz(a) piren miktarları.

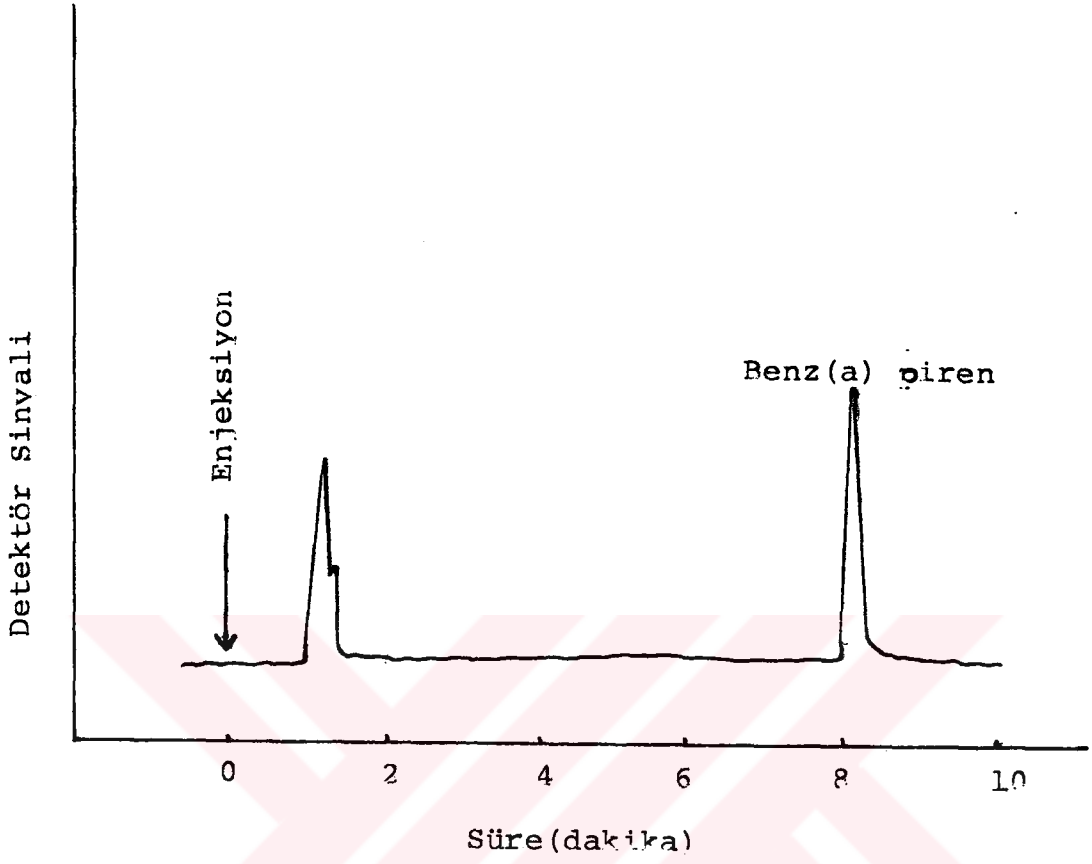
Sigaralar	Bulunan Madde Miktarı $\mu\text{g}/\text{izmarit}$ *
I	0.076
II	0.039
III	0.081
Ortalama	0.065

*Bu değerler düzeltilmiş değerlerdir.

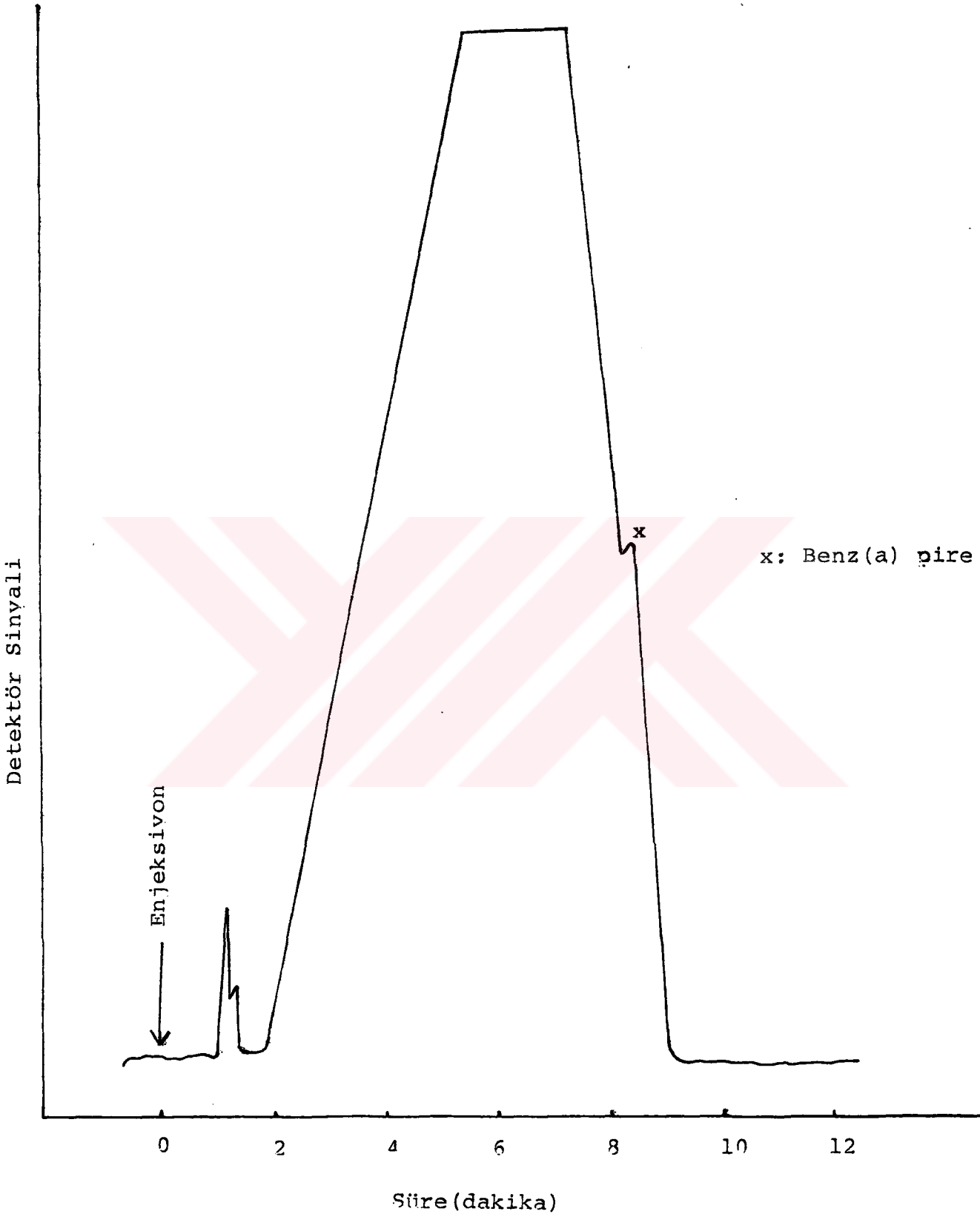
Tablo 6. Samsun sigara izmaritlerinde bulunan benz(a)piren miktarları

Samsun sigarası izmaritleri (adet)	Bulunan Madde Miktarı $\mu\text{g}/\text{izmarit}$ *
10	gözlenemedi
30	gözlenemedi
50	0.076

*Bu değerler düzeltilmiş değerlerdir.



Şekil 3. Bir standart enjeksiyonu sonrasında elde edilen kromatogram



Şekil 4. Bir ekstrakt enjeksiyonu sonrasında elde edilen kromatogram

KAYNAKLAR

- Aksu, S., Tütün Kimya ve Teknolojisi, Tekel Enstitüleri Yayınları, İstanbul (1967).
- Andersen, R.A., Partial Characterization of Condensate Derived from Volatiles-Sublimate of Homogenized Leaf-Cured Burley Tobacco during Storage, J. Agric. Food Chem., 31 930-933(1983).
- Colin, H. and Guiochon., Introduction to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatograph, J. Chromatogr., 141 289-312 (1977).
- Green, C.R., Conrad F.W. Jr., Bridle K.A. and Borgerding, M.F., A Liquid Chromatography Procedure for Analysis of Nicotine on Cellulose Acetate Filters Beitrage Zur Tabakforschung International, 13, 11-16(1985).
- Ono, J., Ogasa K., Maeda K. and Noguchi K., Preferential Retention of Benzo(a) pyrene in Tobacco Smoke by β -Lactoglobulin in the Cigarette Filter Structure, J.Agric. Food Chem., 29 173-177(1981).
- Özçimder, M., "Balık Yağı Asiti Metil Esterlerinin Gümüş ve Ters-Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografileri ile Fraksiyonlara Ayırmanın Toplam Yağ Asit Analizindeki Yararı" Doçentlik Tezi, Ankara(1980).
- Özçimder, M., Gümrükçüoğlu, H., Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ve Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların HPLC Kolonunda Alıkonma Mekanizmalarının İncelenmesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları No: 34, Samsun, (1988).
- Özçimder, M., Gümrükçüoğlu, H., Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Tütün Zifirinde, Benz(a) piren Tayini, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Dergisi, 1, 70-75, Samsun, (1987).

- Özdemir, M., Yaşar, Y., Studies on Analytical and Health Aspects of Cigarette Smoke. Nitrogen Oxide, Nicotine and N-Nitrosamine Contents, Doğa, Türk Mühendislik ve Çevre Bilimleri Dergisi, 11, 273-278(1987).
- Parris, N.A., Non-Aqueous Reversed-Phase Liquid Chromatography a Neglected Approach to the Analysis of Low Polarity Samples, J. Chromatogr., 157, 161-170(1978).
- Severson, R.F., Arrendale R.F., Chaplin, J.F. and Williamson R.E., Use of Pale-Yellow Tobacco to Reduce Smoke Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, 27, 896-900 (1979).
- Snook, M.E., Chamberlain W.J., Severson R.F. and Chortyk O.T., Chromatographic Concentration of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons of Tobacco Smoke, Anal.Chem., 47, 1155-1157(1975).
- Willard, H., Merrit, Dean ve Settle, Instrumental Methods of Analysis, D.Van Nostrand Company, New York (1981).
- Yıldırım, R., Bilim ve Teknik, 244, 3-10(1988).

ÖZGEÇMİŞ

1961 Çarşamba doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Ankara'da, lise öğrenimimi Niğde Kız Öğretmen Lisesi'nde tamamladım. 1983 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldum. 1984-1985'te özel sektörde çalıştım. 1985 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi oldum. Halen aynı Üniversitede görevime devam etmekteyim.



T. C.
Yükseköğretim Bakanlığı
Dokümantasyon Müdürlüğü