

**ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLERİN
İYON ÇİFTİ EKSTRAKSİYONU VE GC-MS METODUYLA
BELİRLENMESİ**

Şevket ATA

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Bilim Uzmanlığı Tezi

Olarak Hazırlanmıştır

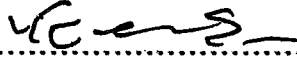
ZONGULDAK

Haziran 2004

KABUL:

Şevket ATA tarafından hazırlanan “ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLERİN İYON-ÇİFTİ EKSTRAKSİYONU VE GC-MS METODUYLA BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Kimya Anabilim Dalında Bilim Uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

....../....../2004

Başkan : 
Prof.Dr. Yunus ERDOĞAN

Üye : 
Yrd.Doç.Dr. Burak ÇOBAN

Üye : 
Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKYÜZ
(Tez Danışmanı)

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

22.12.7/2004


Prof. Dr. Etem KİŞİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

ÖZET

Bilim Uzmanlığı Tezi

ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLERİN İYON ÇİFTİ EKSTRAKSİYONU VE GC-MS METODUYLA BELİRLENMESİ

Şevket ATA

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ

Haziran 2004, 93 sayfa

Bu çalışmada çevre örnekleri ve biyolojik sıvılardaki alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesi için önerilen bir analitik metot sunulmaktadır. Metot iyon çifti ekstraksiyonu, ilgili maddelerin türetilmesi ve GC-FID/GC-MS analizlerini içermektedir. Bu çalışmanın amacı çeşitli alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesi için atık su, deniz suyu, sediment ve insan idrarı gibi değişik örneklerle uygulanabilecek analitik teknikler geliştirmektir. Önerilen metodun hızlı, spesifik, hassas ve kantitatif olması amaçlanmıştır. İlgili bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan çeşitli metotlar yeniden incelenmiş ve türetme/GC-MS seçiminin gerekçesi verilmiştir.

ÖZET (devam ediyor)

Alifatik ve aromatik aminler, iyon çifti reaktifi olarak BEHPA kullanılarak sulu çözeltilerinden izole edilmiş ve kromatografik analizleri için IBCF ile türetilmiştir. Sediment örneklerindeki alifatik ve aromatik aminlerin katı-sıvı ekstraksiyonu, asidik metanol kullanılarak sokslet cihazı ile yapılmıştır ve aminlerin izolasyonu için bis(2)-etilhekzilfosfat (BEHPA) ile iyon çifti ekstraksiyonu uygulanmış olup devamında izobutylkloroformat (IBCF) ile türetme yapılmıştır. Alifatik ve aromatik aminlerin izobutiloksikarbonil türevleri GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Bileşiklerin yapılarının aydınlatılması, kütle spektrumlarının yorumlanması ve standart spektrumlarla mevcut kütüphane verileri karşılaştırılarak yapılmıştır. Elde edilen verim % 1,1-4,7 arasındaki standart sapmalar ile % 85- 99 arasında değişmektedir ve en düşük algılama limiti 10^{-8} ppm'dir.

Sonuç olarak, bu araştırmada tanımlanan metodun belirtilen değişik örneklerdeki çeşitli alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesi için uygun olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : İyon çifti ekstraksiyonu, Alifatik ve Aromatik aminler,
GC- FID ve GC-MS, Çevre, İdrar.

Bilim Kodu: 405.03.01

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ION-PAIR EXTRACTION AND GC-MS DETERMINATION OF ALIPHATIC AND AROMATIC AMINES IN THE ENVIRONMENTAL SAMPLES

Şevket ATA

**Zonguldak Karaelmas University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Thesis Advisor : Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ

June 2004, 93 pages

ABSTRACT

This work presents a proposed analytical method for determination of aliphatic and aromatic amines in environmental samples and biological fluids. The method includes ion-pair extraction, derivatisation of compounds of interest and their GC-FID and GC/MS analysis. The aim of this work was to develop analytical techniques that could be applied to a variety of samples including wastewater, sea water, sediment and human urine to determine various aliphatic and aromatic amines. The method proposed, was intended to be rapid, specific, sensitive and quantitative. The various methods for determination of the compounds of interest were reviewed and the reasons for choosing derivatisation / GC-MS were given.

ABSTRACT (continued)

Aliphatic and aromatic amines were isolated from aqueous samples using bis-2-ethylhexylphosphate (BEHPA) as ion-pair reagent and derivatised with isobutyl chloroformate (isoBCF) for their chromatographic analysis. Solid-liquid extraction of aliphatic and aromatic amines in sediment samples were performed in soxhlet apparatus with acidic MeOH and ion-pair extraction using BEHP were carried out for the isolation of amines followed by derivatisation with IBCF. Aliphatic and aromatic amines were then analysed with GC-FID and GC-MS as their isobutyloxycarbonyl (isoBOC) derivatives. Structural identification of the compounds were carried out by interpretation of the mass spectra and possible match with standard spectra and existing library data. The obtained recoveries ranged from 85-99 % with relative standard deviations (RSDs) between 1,1-4,7 % and the detection limit was lower than 10^{-8} ppm.

As a result, the method described in this research was shown to be suitable for the determination of various aliphatic and aromatic amines in a variety of samples mentioned.

Key Words: Ion-pair extraction, aliphatic and aromatic amines, GC-FID and GC- MS, Environment, Urine.

Science Code: 405.03.01

TEŞEKKÜR

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

Deneysel kısımlarda ve tezin yazım aşamasında karşılaştığım problemlerde sürekli yardım aldığım **Arş. Grv. Hasan ÇABUK**'a, **Arş. Grv. Ersin ORHAN**'a ve her zaman yardımları ve manevi destekleri ile yanımda olan **Arş. Grv.** arkadaşlarım başta olmak üzere tüm **ZKÜ Fen Edebiyat Fakültesi** öğretim elamanlarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime sonsuz duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
 BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	 1
1.1 ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLER	2
1.1.1 Alifatik Aminler	2
1.1.2 Aromatik Aminler	2
1.1.3 N-Nitrozo Bileşikleri (Nitrozaminler ve Nitrozamitler).....	4
1.1.4 Biyoaktif Aminler	4
1.2 AMİNLERİN OLUŞUMU	6
1.3 AMİNLERİN ÇEVRE VE İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ	10
1.4 AMİNLERİN TOKSİKLİĞİ	12
1.5 AMİNLERİN BELİRLENMESİ	17
1.6 AMİNLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN TÜRETME REAKSİYONLARI.....	19
1.6.1 Açılleme.....	19
1.6.2 Sililleme.....	21
1.6.3 Dinitrofenilleme	21
1.6.4 Permetilleme	22
1.6.5 Karbamat Oluşumu.....	23
1.6.6 Sülfoamit Oluşumu.....	24
1.6.7 Fosfoamit Oluşumu	25

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

1.7 ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLERİN BELİRLENMESİYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26
1.8 AMİNLERİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN BAZI ÖNEMLİ İZOLASYON TEKNİKLERİ.....	31
1.8.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon.....	31
1.8.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyon.....	33
1.8.3 Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	33
1.8.4 Katı-Faz Mikro Ekstraksiyonu (SPME).....	34
1.8.5 İyon Değiştirme Kromatografisi.....	34
BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
2.1 KULLANILAN ÇİHAZLAR	35
2.1.1 Gaz Kromatografisi	35
2.1.2 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi	35
2.1.3 pH Metre.....	36
2.1.4 Ultrasonik Banyo	36
2.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	36
2.3 DENEYSEL İŞLEMLER.....	37
2.3.1 Aminlerin Sulu Çözeltilerden İzolasyonu ve Analizi.....	37
2.3.2 Standart Aminlerin Gaz Kromatografisinde Alıkonma Zamanlarının Tespit Edilmesi.....	38
2.3.3 Standart Amin Karışımının Türetilmesi	39
2.3.4 Standart Aminlerin Ekstraksiyon İçin pH Grafiklerinin Çizilmesi.....	39
2.3.5 Standart Aminlerin Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi.....	40
2.3.6 Geliştirilen Metodun Algılama Limitinin Belirlenmesi	40
2.3.7 Dere Suyu Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi.....	40
2.3.8 Deniz Suyu Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi	41
2.3.9 İdrar Numunelerindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi	42
2.3.10 Acılık Deresi Dip Çamuru Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi.....	44

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	46
3.1 DENEYSEL SONUÇLAR	46
3.1.1 Standart Aminlerin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi	46
3.1.2 Standart Aminlerin Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi.....	54
3.1.3 İyon-Çifti Ekstraksiyonu İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	55
3.1.4 Deniz Suyu Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi.	58
3.1.5 Dere Suyu (Acılık Bölgesi) Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	62
3.1.6 Dip Çamuru Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi	65
3.1.7 İdrar Numunelerinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi	69
3.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR.....	80
BİBLİYOGRAFYA.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Sayfa
1.1 Mordant Orange 1 azo boyar maddesinin anaerobik ortamda bozunması	7
1.2 Arjininin dekarboksilasyona uğrayarak çeşitli poliaminlerin oluşumu	10
1.3 Aromatik amin ve aromatik nitro bileşiklerinin basitleştirilmiş metabolik yolu	15
1.4 Primer ve sekonder aminlerin açillenmesi	20
1.5 Primer ve sekonder aminlerin dinitrolanması	22
1.6 Primer, sekonder ve tersiyer aminden karbamat oluşumu	23
1.7 Hinsberg metodu ile primer, sekonder ve tersiyer aminlerin ayrılması ve aydınlatılması	25
1.8 o-Ftaldialdehit ve dietiltiofosforil klorür ile primer ve sekonder aminlerin seçici olarak türetilmesi	26
2.1 Standart amin karışımının BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonundan sonra kuru fazda türetme ile GC-FID ve GC-MS'de belirlenmesi	37
2.2 Anilin, propilaminin ve morfolinin IBCF ile reaksiyonu	38
2.3 Deniz suyu, dere suyu ve idrar örneklerindeki alifatik ve aromatik aminlerin iyon çifti ekstraksiyonu ve GC-MS analizlerine ait akım şeması	43
2.4 Dip çamuru örneğindeki amin bileşiklerinin iyon çifti ekstraksiyonu ve GC-FID / GC-MS analizlerine ait akım şeması	45
3.1 Anilin ve anilin-IBCF türevinin çözümlenmiş IR spektrumları	47
3.2 Standart amin karışımının GC-FID kromatogramı	49
3.3 Standart amin karışımının IBCF türevlerinin GC-MS kromatogramı	49
3.4 Standart amin karışımının IBCF türevlerinin GC-MS kromatogramı	50
3.5 Morfolin izobütoksikarbonil (izo(BOC)) türevinin kütle spektrumu	51
3.6 Anilinin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu	51
3.7 Benimidazol-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu	51
3.8 p-Toluidin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu	52
3.9 4-Bromanilin- izo(BOC) türevinin kütle spektrumu	52
3.10 Piperazin- izo(BOC) türevinin kütle spektrumu	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

3.11	1,2-Fenilendiamin-iso(BOC) türevinin kütle spektrumu	53
3.12	Standart aminlerin kalibrasyon eğrileri.....	54
3.13	Standart aminlerin kalibrasyon eğrileri.....	54
3.14	Standart aminlerin pH'a karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik	56
3.15	Standart aminlerin pH'a karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik	55
3.16	Standart aminlerin pH:8 ve pH:9'da iyon-çifti ekstraksiyonu ile % geri kazanımlarının belirlenmesi.....	58
3.17	Deniz suyu numunesinin GC kromatogramı (2004 Ocak- Nisan)	59
3.18	Deniz suyu numunesinin GC-MS kromatogramı (2004 Ocak-Nisan).....	60
3.19	Deniz suyu numunesinin GC kromatogramı (2003 Mayıs-Ağustos)	60
3.20	Acılık dere suyu örneğinin GC-MS kromatogramı (2004 Ocak-Nisan).....	63
3.21	Acılık dere suyu örneğinin GC kromatogramı (2004 Ocak-Nisan).....	63
3.22	Acılık Deresi dip çamuru örneğinin önerilen türetme metodu ile alınan GC kromatogramı	65
3.23	Geri ekstraksiyondan sonra türetilerek analizi yapılan dip çamuru örneğinin GC kromatogramı	66
3.24	Acılık Deresi dip çamuru örneğinin geri ekstraksiyon ile türetilen kısmın GC-MS kromatogramı.....	66
3.25	İdrar numunesinin (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekten alınan numune) ikinci kısım analizinin GC kromatogramı	70
3.26	İdrar numunesinin (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekten alınan numune) GC-MS kromatogramı.....	71
3.27	İdrarB numunesinin hidroliz edilmeden alınan kısmın GC kromatogramı.....	72
3.28	İdrarB numunesinin GC-MS kromatogramı	72
3.29	İdrarB numunesinin hidroliz edilerek alınan kısmın GC kromatogramı	73
3.30	İdrarC numunesinin GC-MS kromatogramı	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Bazı aminlerin pK_b değerleri	2
3.1 Standart aminlerin GC-FID’de alıkonma zamanlarının belirlenmesi.....	48
3.2 Bazı standart aminlerin IBCF türevlerinin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri	53
3.3 Aminlerin kalibrasyon grafiklerine ait denklemler ve r^2 değerleri	55
3.4 Aminlerin pH=8 ve pH=9 değerlerindeki % geri kazanımları	57
3.5 Deniz suyu numunesinde belirlenen aminlerin yaz ve kış aylarındaki konsantrasyonu.....	61
3.6 Acılık dere suyu numunesinde belirlenen aminlerin hesaplanan konsantrasyonları (2004, Ocak-Nisan)	64
3.7 Acılık deresi dip çamuru numunesinde belirlenen aminler ve hesaplanan konsantrasyonları	67
3.8 İdrar numunesinde (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekte alınan numune) belirlenen aminler ve konsantrasyonları	71
3.9 İdrarA ve idrarB numunelerinde belirlenen aminlerin konsantrasyonları	73
3.10 Saç boyası kullanan ve sigara içen bir bayandan alınan hidroliz edilerek analizi yapılan idrar numunesinde belirlenen aminlerin konsantrasyonları	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	:	dakika
eV	:	elektronvolt
M	:	molarite
M ⁺	:	molekül iyon piki
mg	:	miligram
mm	:	milimetre
mL	:	mililitre
mm ²	:	milimetre kare
m/z	:	mütlevük (m/e)
ng	:	nanogram
nmol	:	nanomol
pH	:	aktif hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
pK _b	:	bazlık sabitinin eksi logaritması
ppb	:	parts per billion (µg/kg, ng/g, µg/L)
ppm	:	parts per milion (mg/kg, µg/g, mg/L)
r ²	:	korelasyon katsayısı
rt	:	alikonma zamanı (Retention time)
ss	:	standart sapma
x	:	madde konsantrasyonu
µA	:	mikroamper
µg	:	mikrogram

KISALTMALAR

BEHPA	:	bis-2-etilhekzilfosfat
BSA	:	N,O-bis (trimethylsilyl)acetamide
BSC	:	benzen sülfonil klorür
CLD	:	kimyasal ışın dedetörü
DNBS	:	2,4–dinitrobenzen sülfonikası
DNFB	:	2,4–dinitroflorobenzen
FID	:	alev iyonlaşma dedetörü
GC	:	gaz kromatografisi
GC-MS	:	gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
HAs	:	heterosiklik aromatik aminler
HPLC	:	yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IBCF	:	izobutylkloroformat
izo(BOC)	:	izobütoksikarbonil
MBTFA	:	<i>N</i> -metilbis(trifloroasetamid)
MSTFA	:	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsililtrifloroasetamid)
MTBSTFA	:	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(tert-butyl dimethylsilyl)trifluoroacetamide
NPD	:	azot-fosfor ışık dedetörü
PFA	:	pentafloroasetik anhidrit
PFD	:	fosfor alev dedektörü
SIM	:	seçici iyon monitörü
SPE	:	katı-faz ekstraksiyonu
SPME	:	katı-faz mikro ekstraksiyonu
TFA	:	trifloroasetik anhidrit
TMS	:	<i>N</i> -trimetilsilil
UV	:	ultraviyole spektrofotometresi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLER

Aminler azot atomuna bağlı alkil ya da aril grubunun sayısına göre; primer, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılırlar. Aminler orta polarlıkta bileşiklerdir. Kaynama noktaları benzer molekül ağırlıklı alkanlardan yüksek, alkollerden düşüktür. Primer ve sekonder aminlerin molekülleri, birbiriyle ve suyla güçlü hidrojen bağları oluşturabilirler. Tersiyer aminlerin molekülleri birbiriyle hidrojen bağları yapamaz ve bu nedenle tersiyer aminler, primer ve sekonder aminlerden daha düşük sıcaklıkta kaynarlar.

Uçucu aminler çok keskin ve genellikle çok kötü bir kokuya sahiptirler. Aril aminler, alkil aminler gibi kötü kokulu değildirler fakat anilin gibi aril aminler zehirlidir ve cilde temas ettiklerinde tehlike oluştururlar.

Aminler sulu çözeltide zayıf bazdırlar ve tersinir bir asit-baz tepkimesiyle sudan bir proton kopartırlar. Azot atomu üzerindeki alkil grubu gibi elektron verici bir grup, kation üzerindeki pozitif yükün dağılmasına neden olur ve bazlık kuvvetini artırır. Bu nedenle bazlık NH_3 , CH_3NH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$ sırasına göre artmaktadır. Bununla birlikte tersiyer bir aminin su molekülleri tarafından tam olarak sarılamaması sebebiyle bazlığı primer ve sekonder aminlerden düşüktür. Çünkü tersiyer aminin su molekülleri ile hidrojen bağı yapabilecek hidrojeni yoktur. Primer ve sekonder aminlerin ise iki ve bir hidrojenleri olup su ile bağ oluşturma etkileri daha fazladır.

Çizelge 1.1 Bazı aminlerin pK_b değerleri (Solomons and Fryhle, 2000).

Aminin Yapısı	pK _b	Aminin Yapısı	pK _b
<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ NH ₂	13	(CH ₃ CH ₂ CH ₂) ₂ NH	3,02
CH ₃ NH ₂	3,34	C ₆ H ₅ NHCH ₃	9,3
(CH ₃) ₂ NH	3,27	(C ₆ H ₅) ₂ NH	13,2
(CH ₃) ₃ N	4,19	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ NH ₂	10
C ₆ H ₅ NH ₂	9,42	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ NH ₂	8,92
C ₅ H ₁₁ N	2,88	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂	3,33

Aminler; hem bitkisel hem de hayvansal kökenli doğal bileşiklerin bir çoğunda olduğu gibi, proteinlerde ve nükleik asitlerde de bulunurlar. Protein ve nükleik asit yapısında bulunan aminlerin bir çoğu fizyolojik etki göstermektedir. Örneğin, insan vücudunun sempatik sinir sisteminin (savaşmak yada kaçmak) iki doğal uyarısı, norepinefrin ve adrenalin'dir (Solomons and Fryhle, 2000). Hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan azot içerikli materyallerin mikrobiyal bakteriler tarafından parçalanmasıyla aminler oluşmaktadır (Da Ponte et al., 1986; Bouchereau et al., 2000). Bununla birlikte yapılan son araştırmalarda soluduğumuz havada ve atmosfer dışında da anilin, toluidinler gibi aromatik aminlere rastlanılmış olup insan idrarında ve kanında bu tür aminlerin olduğu tespit edilmiştir (Weiss and Angerer, 2002).

1.1.1 Alifatik Aminler

Düşük molekül ağırlıklı alifatik primer, sekonder ve tersiyer aminler, boya, plastik, tarım ilacı, yüzey aktif madde ve polimer sanayinde hammadde olarak kullanılmaları ve aynı zamanda bu sanayilerin yan ürünü olarak oluşmalarından dolayı çevrede büyük ölçüde bulunmaktadır ve en önemli özellikleri çok kötü kokulara sahip olmaları aynı zamanda yüksek toksik özellikleridir (Liu et al., 2001; Zhao et al., 2002).

Metilamin, dimetilamin, etilamin, dietilamin, propilamin ve *n*-bütilamin gibi düşük molekül ağırlıklı alifatik aminler hem hammadde olmaları hem de ara ürün olarak

oluşmaları nedeniyle kimya ve ilaç sanayi için büyük bir öneme sahiptirler (Lloret et al., 2004). İnsan vücudunda doğal olarak bulunan 1,6–hekzametilendiamin gibi alifatik aminlerin metabolik formlarının hücre gelişiminde rol oynadığı yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir (Laha and Luthy, 1990). Alifatik poliaminler tümör belirleyici olarak hazırlanırlar ve kanserin teşhisinde ve önlenmesinde kullanılırlar. Organ nakillerinde alıcı kişinin dokularının organa uyumunun belirlenmesi için organda oluşan poliaminler temel alınmaktadır (Poels and Nagels, 2001). Aminlerin hem kendileri insan sağlığı ve evre için tehlike oluşturmakta hem de nitrit ve nitratlarla reaksiyona girerek oluşturdukları kanserojen dimetilnitrozamin, nitrozanilin gibi *N*-nitrozo bileşikleri daha büyük bir sorun teşkil etmektedir (Cardenes et al., 2002).

1.1.2 Aromatik Aminler

Kalorisiz tatlandırıcılarda, içeceklerde ve çeşitli gıda ürünlerinde, kağıt, deri, kozmetik, ilaç, oyuncak, plastik, matbaa baskıları, tekstil gibi bir çok sanayide anilin, feniletilamin, metilanilin gibi aromatik aminler ve aromatik amin kökenli azo boyları kullanılmaktadır (Saurina and Hernndez-Cassou, 1999).

Aromatik aminlerin bir çoğu insan sağlığı açısından zararlı bileşikler olup, içme sularının klorlanmasıyla oluşan kloroanilinler veya nitrit ve nitratlar ile nitrozolama reaksiyonu sonucu oluşan aromatik nitrozaminler, Amerika evre Koruma Birliği (EPA) tarafından öncelikli kirleticiler sınıflandırmasına girmektedir (Laha and Luthy, 1990).

Proteince zengin bir çok besinin içinde bulunan heterosiklik aromatik aminler, çok düşük seviyelerde bile zararlı etki göstermektedir (Toribio et al., 2000). Aromatik nitro bileşiklerinin metabolik bozunma ürünü olarak oluşan bazı aromatik aminler, insan vücudunda bir çok enzimatik aktiviteyi inhibe etmektedir (Rinde and Trol, 1975; Seiler, 1977). Aromatik aminler ile hazırlanan genellikle imidazol kökenli karamel renklendiricileri gibi bazı gıda boyları ve azo boylarının kanserojen etkileri saptandıktan sonra bu tür boyların bir çok ülkede kullanımları yasaklanmıştır (Wu and Huang , 1998).

1.1.3 N-Nitrozo Bileşikleri (Nitrozaminler ve Nitrozamitler)

Bu bileşikler amit, amin, guanidin, üre gibi azotlu maddelerin azot oksitlerle (NO_3^- , NO_2^-) yaptıkları bileşiklerdir. Nitrozaminler ve nitrozamitler diye iki ana gruba ayrılırlar; nitrozaminler sekonder-amin; nitrozamitler ise üre, amit, guanidin, karbamat, karboksamit gibi maddelerin türevidirler. İki gruptaki maddeler de kanserojendir.

Nitrozaminlerin 10'dan fazla üyesi vardır; bunların başlıcaları dibutilnitrozamin, dimetilnitrozamin, dietilnitrozamin, nitrozopirolidin, nitrozosarkosin ve nitrozopiperidin'dir. Bu tip bileşikler kanserin oluşumuna neden olacak başlangıç maddeleri halinde bulunurlar; vücutta, sırasıyla, diazoalkan, diazonyum tuzu ve karbonyum iyonuna dönüşürler (Tricker and Preussmann, 1992; Cardenes et al.,'den, 2002).

Primer ve sekonder aminlerin nitrit ve nitratlarla reaksiyonu sonucu oluşan nitrozaminler, yüksek toksik özelliklerinden dolayı insanlarda çeşitli sağlık problemlerine neden olmaktadır. Gıda maddelerinin saklanması, korunması ve pişirilmesinde uygulanan bazı yanlış işlemler sonucunda kanserojen bir çok nitrozamin bileşiği oluşmaktadır. Oluşan bu bileşikler gıdaların tat ve renklerinde değişikliğe yol açarak gıda zehirlenmelerinin başlıca nedenleri arasında yer alırlar (Reche et al., 2002).

Bazı besin maddelerinin doğal yapısında bulunan, aynı zamanda kırmızı et gibi gıdaların rengini koruması için kullanılan nitrit ve nitratlar, bağırsaklarda bulunan bakteriler tarafından serbest forma geçerler ve insan vücudunda doğal olarak bulunan aminler ile reaksiyona girerek nitrozaminleri oluştururlar (Tricker and Preussmann, 1991; Cardenes et al.,'den, 2002).

1.1.4 Biyoaktif Aminler

Biyoaktif aminler doğada yaygın olarak bulunan biyoaktif bileşiklerin bir grubu olup, aminoasitlere benzer yapılardan türeyen ve aminoasitlerin bir çok enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan organik bileşiklerdir. Bitki, hayvan ve canlı organizmaların yaşamsal bir çok işlevinde kullanılan biyoaktif aminler ayrıca besin maddelerinde katkı maddesi olarak

da bulunmaktadır. Biyoaktif bileşiklerin bir çoğu fizyoaktif etkinliğe sahiptir (Standara et al., 2000). Bununla birlikte histamin gibi biyoaktif aminlerin antidepresif olarak kullanılan bir çok ilacın etkinliğini azalttığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu sözkonusu aminlerin bulunduğu içkilerde alkolün etkisiyle monooksidaz enziminin aktivitesi azalarak biyojenik diaminlerin (putresin, kadaverin vb.) toksik etkisi daha da artmaktadır (Vidal-Carou et al., 2003).

Hayvanlarda fizyolojik sistemleri ve hareketsel davranışları düzenleyen dopamin, serotonin, noradrenalin ve oktopamin gibi biyoaktif aminler, merkezi sinir sistemi için önemli bileşiklerdir. Hamam böceği, cırcır böceği gibi omurgasızların hareket yeteneğinin gelişimi, iletişim, ve karıncalar arasındaki etkileşimler bu aminlerin metabolizmadaki işlevleri sonucu olmaktadır (Shafi et al., 1989). Bal arılarının bal yapmak için çiçeklere konması ve bal yapmayı öğrenmesi, insanların uyku, ruh durumu, duygu, heyecan ve hislerini düzenleyen merkezi sinir sisteminde bir çok biyoaktif amin görev almaktadır (Auger et al., 2000).

Biyojenik aminler günümüzde bir çok gıdada varolabilmektedir. Özellikle balık ve balık ürünleri, et ve fermente edilmiş gıdalarda yoğun olarak bulunurlar (Kirschbaum et al., 2000). Gıdaların üretim aşamalarında ucuz renklendirici kullanımı, ısıt işlemler ve haşerelerden korumak için bazı maddelerin kullanılması gibi bilinçsizce yapılan birçok işlemde, özellikle bazı gıdaların yanlış paketlenmesi ile serbest aminoasitler bozunmaktadır. Bunun yanında doğal olarak da gıdalarda bu bozunma olayı gerçekleşmektedir (Shalaby et al., 1996; Karpas et al., 2002).

Dekarboksilasyon enzimleri içeren bakterilerce kirletilen gıdalarda, serbest aminoasitler dekarboksilasyona uğrayarak biyojenik aminleri oluşturmaktadır. Oluşan bu aminler kimyasal indikatör gibi besinin kalitesini belirlemektedir. Örneğin histidinin dekarboksilasyonu sonucu ürün olarak histamin oluşmaktadır. (Kimura et al., 1992). Histamin balıklarda birikme özelliği gösteren yüksek kanserojen aminlerdendir ve bu tür balık ürünleri ile beslenen insanlarda kanser oluşum riski artmaktadır (Kimura et al., 1992; Tsikas et al., 1993). Gultamin, arginin ve agmatin gibi serbest aminoasitlerin bozunması sonucu putresin oluşur. Lizinin bozunması sonucu ise kadaverin oluşmaktadır (Shakila et al., 2001).

1.2 AMİNLERİN OLUŞUMU

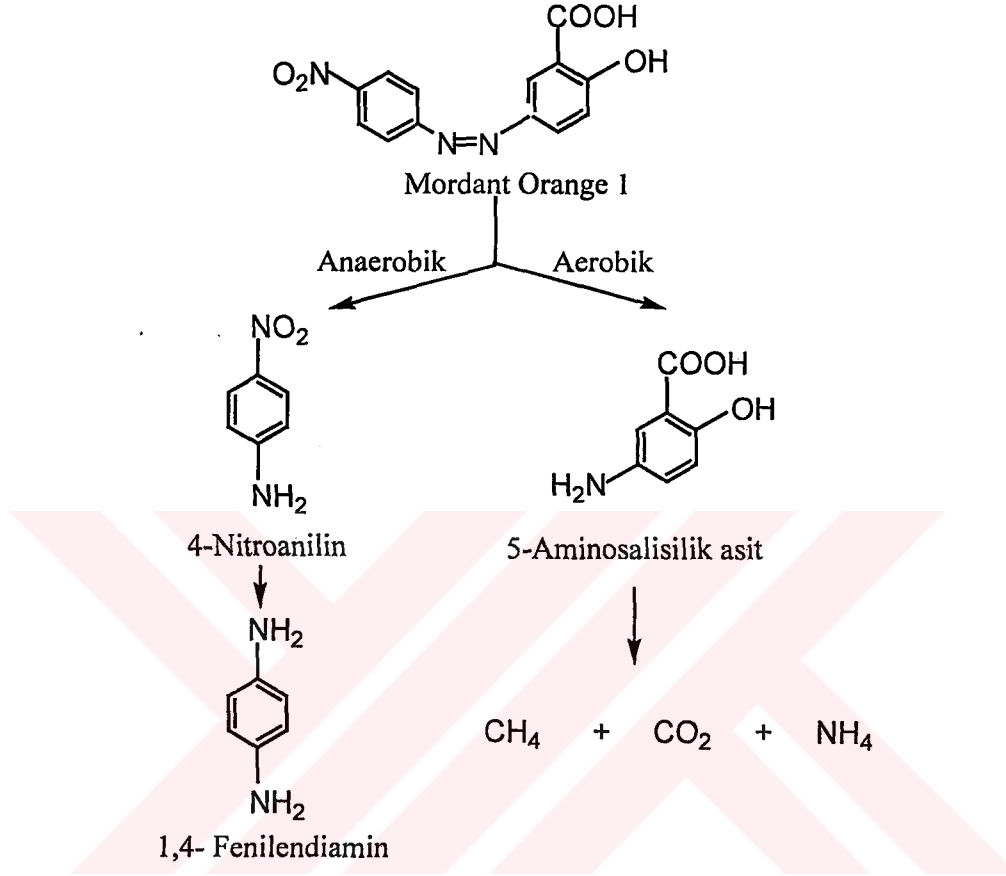
Çevrede bulunan alifatik ve aromatik aminler hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaların metabolik ara ürünleri olarak doğal biçimde oluşurlar (Terashi et al., 1990). Aynı zamanda doğada bulunan azot içerikli yapıların mikroorganizmalar tarafından fermentasyona uğratılması, karbonil bileşiklerinin aminasyonu ve aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu aminler oluşmaktadır (Sacher et al., 1997; Zhao et al., 2002; Bouchereau et al., 2000).

Alifatik ve aromatik aminler, çeşitli sanayilerde büyük ölçüde hem hammadde ve ara ürün olarak kullanılmaktadırlar hem de ara ürün olarak oluşmaktadırlar (Poels and Nagels, 2001). Boya, kozmetik, tıbbi ürünler ve kimyasal maddelerin yapımında çok sıkça kullanılan bu maddeler çevreye değişik yollarla karışmaktadırlar. Genellikle bu tür endüstrilerin atık sularında bulunan aminler çevreye bilinçsizce deşarj edilmektedir (Palmiotto et al., 2001).

Kimya ve ilaç sanayinde ara ürün olarak kullanılan ve aynı zamanda ürün olarak oluşan düşük molekül ağırlıklı alifatik aminlere bu tür sanayilerin yakınlarındaki nehir ve göl sularında yapılan bir çok araştırmada rastlanmıştır (Szaefer et al., 2003). Kullanıldıkları endüstrilerde zararlı olmayan bazı amin bileşikleri, çevreye karıştıklarında anaerobik veya aerobik bakteriyel bozunmalara uğrayarak veya çevredeki bazı maddelerle reaksiyona girerek zararlı bileşikler oluşturmalar (Castillo and Barcelo, 2001). Tekstil sanayi ve boya sanayinde kullanılan amin yapılı azo boyar maddelerin anaerobik bakteriyel bozunma ürünleri olan 2-naftilamin, nitroanilin *o*-toluidin, 1,2-fenilendiamin ve anilin gibi kanserojen yapılar çevre ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Garrigos et al., 2002). Aynı şekilde organik bileşiklerin sentezinde kullanılan ve bu endüstrilerin atık suları ile çevreye karışan boya hammaddeleri, bakteriler tarafından anaerobik bozunma sonucunda toprakta ve dip çamurlarında kanser yapıcı aromatik aminleri oluşturmaktadır. Bu tür yapıların bozunması için genellikle bazı özel koşullar gerekmektedir.

Pagga and Brown (1986) ve Shaul et al. (1991) yaptıkları çalışmalarda aerobik ortamda azo boyar maddelerin biyolojik bozunma ile zararsız birkaç bileşiğe dönüştüklerini tespit etmişler ve bununla beraber bu bileşiklerin anaerobik ortamda daha zararlı bileşikleri oluşturduklarını belirtmişlerdir (Donlon et al., 1997; Eskişson et al., 2002). Şekil 1.1'de

tekstil ve deri sanayinde çok sık kullanılan “Mordant Orange I” azo boyar maddesinin muhtemel anaerobik ve aerobik bozunma reaksiyonları ve bu reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler verilmiştir.



Şekil 1.1 Mordant Orange I azo boyar maddesinin anaerobik ve aerobik ortamda bozunması (Donlon et al., 1997).

Başlangıçta zararlı böceklerle karşı kullanılan böcek öldürücü bazı tarım ilaçları sulara ve toprağa karışarak aerobik ve anaerobik bozunma sonucu anilin, aminofenol, aminotoluen ve dietilamin gibi zararlı bileşikler oluşmakta ve bu bileşiklerin konsantrasyonları bitkilere, çevredeki diğer canlılara ve özellikle insan sağlığına tehdit oluşturacak düzeylere ulaşmaktadır (Schmidt et al., 1997; Lloret et al., 2002; Brown and Laboureur, 1983).

Plastik, fenilüre ve fenilkarbamat pestisitleri, ilaç, cephane hammadde, epoksi ve poliüretan polimerlerin hammadde olarak kullanılan nitroaromatik bileşikler biyotik ve abiyotik bozunmaya uğrayarak aromatik aminleri oluşturmaktadırlar (Schmidt et al., 1997).

Biyoaktif aminler doğada ve insan vücudunda çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. İnsan vücudunda bulunan aminler, beyin dokuları içerisinde yer alarak sinir sistemin çalışmasında görev almakta ve bazı enzimatik reaksiyonların son ürünü olarak vücutta oluşmaktadırlar (Smith, 1997; Jacinth et al., 2002).

Yiyeceklerin hazırlanması için uygulanan çeşitli ısı uygulamaları (pişirme, kızartma, kavurma gibi) ve korunması için bilinçsizce yapılan bazı işlemler (dumanlanma ile saklanma, salamura, fermentasyon gibi) besinle alınan kanser yapıcı bazı maddelerin kaynağını oluşturur (Toribio et al., 2000; Kirschbaum et al., 2000; Skog et al., 1998).

Heterosiklik aromatik aminler (HAS), yüksek proteinli yiyeceklerin odun kömüründe ya da ızgarada pişirilmesi ve yanması sonucunda oluşurlar. Örneğin; putresin ve kadaverin aşırı ısıtıldıklarında pirolidin ve piperidine dönüşmektedir. Bu bileşikler özellikle kaslı et dokularına sahip kümes hayvanları veya balık etlerinin yüksek ısılarda (300 °C'nin üstünde) pişirilmesiyle oluşmaktadır. Kas dokularının bileşenleri olan kreatin ve kreatidin yüksek ısıda kolaylıkla HAS'i oluşturmaktadır (Yamamoto et al., 1982).

Bu tür yiyeceklerden fazla miktarda tüketen insanlardan alınan idrar örnekleri üzerinde yapılan araştırmalarda vücut içinde değişik dönüşümler geçiren heterosiklik aromatik ve alifatik aminlerin kanser riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu dönüşümler bağırsaklarda bulunan bazı bakteriler tarafından yapılmakta ve direkt olarak enzimlerle reaksiyona giren aminler vücut içinde DNA'nın yapısını dahi bozacak zararlara yol açmaktadır (Saurina et al., 2001).

Hayvanlarda ve insanlarda yapılan bazı araştırmalarda birçok kimya sanayinde kullanılan fakat son ürün olmayan birçok aminonitrotoluen, niroanilin gibi aromatik nitro bileşiği ve bunların metabolitleri şaşırtıcı bir şekilde kişilerin idrar ve kan örneklerinde tespit edilmiştir. Özellikle anilin ve toluidinler insanlara cilt yoluyla kolaylıkla nüfus etmektedir. Ayrıca sigara içen ve çeşitli kozmetik ürünlerini kullanan kişilerde bu tür bileşiklerin konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu yapılan bir çok araştırmada tespit edilmiştir. Sigara tütününde bulunan bir çok amin bileşiği kanser yapma riski yüksek olan anilin ve türevlerini oluşturmaktadır. Özellikle sigara dumanında bulunan aromatik aminler çevreye yayılmakta hem içiciyi hem de sigara dumanı olan ortamda bulunan pasif içicileri etkilemektedir (Schmidt et al., 1997; Forehand et al., 2000).

Suların dezenfeksiyonu için yapılan klorlama işlemi sonucu ortamda bulunan aminlerin klor ile reaksiyona girmesiyle insan sağığına tehdit oluşturan ve ortamdaki aminlerden daha zararlı olan kloro-amin bileşikleri şekillenmektedir. Aminlerin klorlanmasıyla amin bileşiklerinin polaritesi artmakta ve böylelikle suda daha iyi çözünen kloro-amin bileşikleri oluşmaktadır (Gennaro et al., 2002; Kawata et al., 2001).

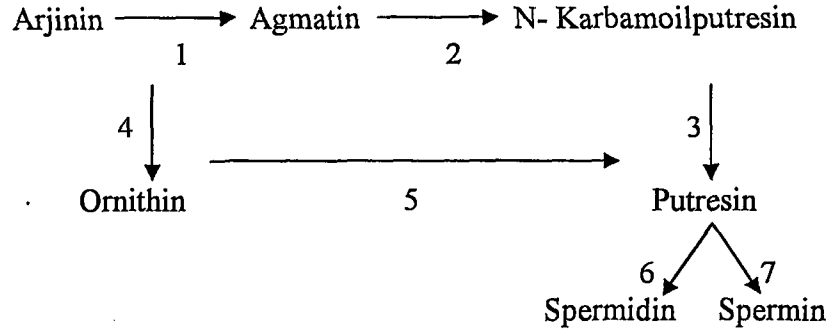
Çevrede doğal veya antropojenik kaynaklar sonucu oluşan ve birçok zararları bulunan primer ve sekonder aminler, çeşitli reaksiyonlar sonucu daha zararlı birçok yapının oluşumuna da neden olmaktadır. Bitki ve insan atıklarının karıştığı nehir, deniz ve içme sularında sözkonusu maddelerin mikrobiyal bozunma ürünleri olan kanserojen heterosiklik aminlere yapılan birçok araştırmada rastlanılmaktadır (Ono et al., 2000).

Nitrozaminlerin çevredeki kaynaklarını nitrat veya nitrit içeren gıdalar (özellikle ıspanak, şeker pancarı, turpgiller gibi sebzeler), su, nitratlı etler (sucuk, pastırma gibi), alkollü içecekler (mayalı içecekler gibi), kozmetikler, kauçuk üretimi ve mesleki hatalar oluşturur (Muller et al., 1997; Bae et al., 2002). Kaynak sularında, zararlı bitki öldürücülerin bakteriyel bozunmaları ile toprakta ve çeşitli sanayilerin dumanları ile hava ortamında bulunan, aynı zamanda plastik, ilaç ve boya gibi birçok sanayide kullanılan veya ara ürün olarak oluşan sekonder aminlerin, nitrit veya nitrat gibi çeşitli nitrozolama reaktifleri ile reaksiyonu sonucu mutajen ve kanserojen *N*-nitrozaminler oluşmaktadır (Hotchkiss, 1989; Takatsuki and Kikuchi, 1990; Gennaro et al., 2002).

Özellikle balık ve balık ürünleri, et ve fermente edilmiş gıdalarda yoğun olarak bulunan biyojenik aminler, aminoasitlere benzer yapılardan türeyen ve aminoasitlerin bir çok enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan organik bileşiklerdir (Busto et al., 1996; Draisci et al., 1998).

Dekarboksilasyon enzimleri içeren bakterilerce kirletilen gıdalarda, serbest aminoasitler dekarboksilasyona uğrayarak biyojenik aminleri oluşturmaktadır (Karpas et al., 2002). Örneğin histidinin dekarboksilasyonu sonucu histamin ürün olarak oluşmaktadır. G glutamin, arjinin ve agmatin serbest aminoasitlerinin bozunması sonucu putresin oluşur.

Lizinin bozunması sonucu ise kadaverin oluşmaktadır (Slocum et al., Pineda et al.,'den, 2001). Şekil 1.2’de serbest aminoasitlerin bozunması sonucu oluşan ürünler şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.2 Arjininin dekarboksilasyona uğrayarak poliaminlerin oluşumu; Dekarboksilasyon enzimleri: 1. Arjinin dekarboksilaz, 2. Agmatin iminohidrolaz, 3. N- karbamoil putresin amidohidrolaz, 4. Arjinaz, 5. Ornithin dekarboksilaz, 6. Spermidin aminopropiltransferaz, 7. Spermin aminopropiltransferaz (Slocum et al. (2000), Pineda et al.'den, 2001).

Gıdaların üretim aşamalarında uygulanan bazı yanlış işlemler, özellikle bazı gıdaların yanlış paketlenmesi ile serbest aminoasitler bozunmaktadır. Bunun yanında doğal olarak da gıdalarda bu olay gerçekleşmektedir (Bang et al., 2002; Brede et al., 2003). Sirke ve soya sosu gibi fermente gıdalarda ve şekerli yiyeceklerde protein ve amino asitler ısı işlemlerde bozunarak heterosiklik aromatik aminleri oluşturur (Berner, 1996; Decker et al., 1997). Triptofan ve glikozun bozunması sonucunda oluşan β -karbolin, bu tür bir oluşuma örnek olarak verilebilir.

1.3 AMİNLERİN ÇEVRE VE İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ

Çevre kelimesi sosyal içeriği de olan oldukça geniş bir anlam taşımakla birlikte kimyasal çevre tanımında; soluduğumuz havayı, etrafındaki suları, besin ve hammaddelerin kaynağı olan üzerinde yaşadığımız toprağı göz önüne almak gerekir. Birbirine ayrılmaz bir şekilde bağlı olan ve biri diğerine sürekli tesir eden toprak, hava ve su yaşadığımız çevreyi meydana getirirler.

Çevre kirliliği; dünyamızda yaşayan canlıların sağlıklarını olumsuz yönde etkileyen çevresel etmenlerin kirlilik olarak sayılabilecek bir düzeye ulaşması olarak tanımlanabilir. Bir çok zararlı maddenin çevrede doğal olarak sınır düzeyde bulunması mümkündür. Örneğin göl sularında doğal olarak bulunan anilinın sınır konsantrasyonu 0,1-1 ppm'dir. Kirleticilerin etkinlik kazanmaları; bulundukları ortamın göstergesi olarak kabul edilebilir. Kirleticinin etkinlik kazanması o ortamda yaşayan canlılara zarar vermeye başladığı konsantrasyon seviyesidir. Onun için buna kesin bir sınır koymaya imkan yoktur. Bu göstergelere bağlı olarak bir yörede tehlike yaratan kir miktarı başka bir yörede aynı ölçüde tehlike yaratmayabilir. Dolayısıyla kirler bazı zararlı etkilere sahip olmadıkça kirlilik olarak sınıflandırılmazlar.

Birçok endüstri atık suları deniz ve göl sularına bilinçsizce akıtılmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi, bu tür ortamlarda doğal olarak bulunan bazı amin bileşikleri bu atık suların karışmasıyla yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır.

Çevre ve canlı hayatı, bu hayatın kurduğu beslenme zinciri her ekosistemde farklılıklar gösterir. Beslenme zincirinin halkaları zarara uğrarsa en dirençsizinden başlamak üzere o ekosistemin tüm canlıları bundan olumsuz yönde etkilenir.

Evsel ve endüstriyel atıkların arıtmaksızın su ortamlarına boşaltılmaları, tarımda verimi arttırmak için kullanılan doğal ve yapay maddelerin su ortamına taşınmaları gibi sebeplerle gerçekleşen su kirliliği, sularda yaşayan çeşitli canlı varlıkları da etkileyerek doğal dengenin bozulmasına yol açabilmektedir (Türkiye Çevre Vakfı, 1995).

İnsan sağlığı ile birebir bağlantılı olan aminler vücut içersinde belirli oranlarda bulunurlar. Örneğin histamin vücudun tüm dokularında proteinlere bağlanmış olarak bulunur. Vücutta histaminin serbest kalması veya dışarıdan vücuda girmesi halinde alerjik tepkimeler, nefes darlığı ve soğuk algınlığı oluşur.

Balıklardaki toksik histamin miktarı 100mg/100g olarak verilmektedir ve ortalama 70 Kg'lık bir insanda histaminin üst sınırı 5-6 mg iken; 8-40 mg hafif zehirlenme, 70-1000 mg orta, 1500-4000 mg ağır zehirlenmeyi işaret ettiği belirtilmektedir. (Ünlütürk ve Ünlütürk, 1981). Ancak histamin miktarına karşı vücut direnci bireylere göre değişiklik gösterir (Flick et al., 2001).

Çevremizi etkileyen kirleticilerin büyük bir kısmı çeşitli endüstriler tarafından oluşturulmaktadır. Bununla birlikte çevrede doğal olarak bulunan maddelerin endüstriyel kullanımları sırasındaki değişimler ve bu endüstrilerin atıklarının sürekli olarak çevreye karışması sonucunda zararlı yapıların konsantrasyonlarının artması çevre kirliliğinin başlıca nedenlerindendir. Tarlalarda zararlı böceklerle ve yabancı otlarla mücadele için bilinçsizce kullanılan bir çok amin içerikli zirai ilaç, aşırı kullanımlarından dolayı ortamda birikmekte ve bozunma ürünleri olan kanserojen aminler insan sağlığını etkilemektedir (Singh et al., 2003).

Yine içme sularının klorlanmasında klor miktarının aşırı kullanılmasıyla suların dip çamurlarında bulunan aminler klor ile kloroaminleri oluşturmakta ve bu bileşikler suda daha kolay çözünür hale gelerek insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Paleologos et al., 2003).

1.4 AMİNLERİN TOKSİKLİĞİ

Alifatik ve aromatik aminler ilaç boya, kozmetik, pestisit, kimyasal madde üretim sanayilerinde hammadde ve ara ürün olarak kullanılmaları ve patlayıcı madde, polimer ve plastik endüstrilerinde yan ürün olarak oluşmaları ve bununla beraber bu sanayilerin atık sularının çevreye deşarj edilmesinden dolayı çevreye geniş ölçüde dağılmışlardır (Zhao et al., 2002; Yang et al., 1993). Çevre örneklerinde yapılan birçok araştırmada en belirgin özelliklerinden birisi kötü kokuları olan bitki, hayvan atıklarının bakteriyel bozunma ürünleri, protein ve aminoasitlerin biyotik veya abiyotik bozunma ürünleri olan aminlere rastlanılmaktadır (Da Ponte et al., 1986).

Yiyeceklerin çeşitli bakteriler tarafından aerobik ve anaerobik bozunmaya uğramaları sonucunda kötü kokulu alifatik primer ve sekonder aminler oluşmaktadır (Sahasrabuddhey et al., 1999;). Aminler gıda teknolojisinde önemli rol oynarlar. Muz, balık, şarap gibi bazı sebze ve gıdalarda aminlerin konsantrasyonu kalite kriterleridir. Yiyeceklerin bozunması ile oluşan biyoaktif aminler, vücutta çeşitli enzimatik reaksiyonları inhibe ederek veya kana karıştığında hemoglobine bağlanarak zehirlenmelere, kansere hatta ölümlere sebep olacak kadar toksik etkiye sahiptirler (Stratton et al., 1991; Moradian et al., 2000). Çeşitli

mikroorganizmaların karıştığı deniz ürünlerinin bir çoğunda, aminoasitlerin bozunarak oluşturduğu histamin, putresin, kadaverin gibi daiminler toksik etkisi çok yüksek maddelerdir. Bir insanda 5-40 mg histamin bulunması durumunda hafif zehirlenmeler olmaktadır ve 70 mg seviyelerinde şiddetli zehirlenmeler gerçekleşmektedir (Flick et al., 2001).

Boya, yüzey aktif madde, tarım ilacı ve bir çok endüstride hammadde olarak kullanılan tripropilamin gibi alifatik tersiyer aminler 10^{-4} ppm gibi çok düşük konsantrasyonda bile çevre sağlık standartlarının çok üzerinde toksik etkiye sahip olduklarından dolayı ve aynı zamanda balık ve kabuklu deniz hayvanlarında hızlı bir şekilde birikmeleri sebebiyle Japonya gibi bir çok ülkede kullanımları yasaklanmıştır (Tadashi et al., 1993).

Kimya ve ilaç sanayinin önemli hammaddeleri ve ara ürünleri olan metilamin, dimetilamin, etilamin, *n*-propilamin gibi düşük molekül ağırlıklı alifatik aminlerden Batı Avrupa'da yılda 100 bin ton üretilmektedir (Sacher et al., 1997).

Alifatik, aromatik, primer ve sekonder aminlerin endüstride üretimlerinin yanında azot içerikli materyallerin aerobik ve anaerobik bozunma ürünleri de çevrede büyük ölçüde mevcuttur (Bouchereau et al., 2000). Bununla beraber anaerobik bozunma ile oluşan amin bileşikleri aerobik bozunma ile oluşan aminlere göre çok daha fazla zararlı etkiye sahiptir (Donlon et al., 1997; Bae et al., 2002). Metil oranj, metil kırmızısı gibi bir çok azo boyar maddenin aerobik bozunma ürünleri karbondioksit ve su olmakla beraber anaerobik bozunma ürünleride toksik özelliği yüksek fenilendiamin gibi poliaminlerdir.

Anilin ve aromatik aminler gibi yapısal türevleri kanser yapıcı ve toksik özelliklere sahip olduklarından dolayı çok düşük konsantrasyonlarda bile tehlike oluşturmaktadır (Dalane and Skarping, 1985). Çeşitli fenil üre ve fenil karbamat pestisitlerin ara ürünleri ve anaerobik bozunma ürünleri olan *p*-kloroanilin, 3,4- dikloroanilin gibi klorlanmış aromatik aminler, boya hammadde olarak kullanılan 2-naftilamin, 4-kloro-*o*-toluidin ve 4-aminobifenil gibi bazı aromatik aminler çok düşük konsantrasyonlarda bile kanserojen ve mutojenik etki göstermektedir (Vitali et al., 1994).

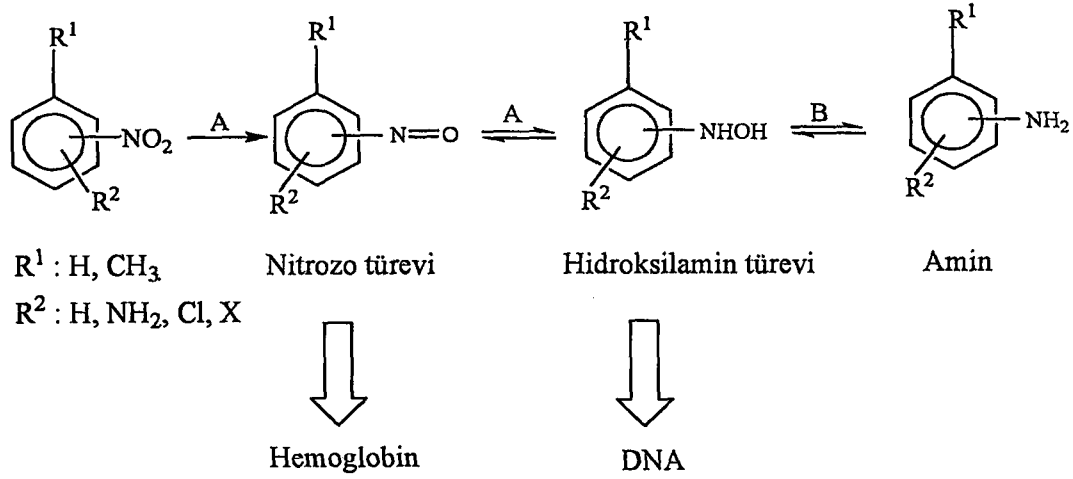
Tekstil, plastik ve kimyasal madde üretiminde kullanılan primer aromatik aminler biyoaktif bileşikler olup insanlar için kanserojen etkileri olduğu ve özellikle tümör oluşumuna yol açtıkları bilinmektedir (Schmidt et al., 1998).

Aynı zamanda sigara tütünlerinde ve dumanında da bulunan toluidin, benzilamin, gibi aromatik aminleri ile sikloheksilamin gibi halkalı aminlerin insanlarda idrar kesesi kanserine yol açtığı yapılan bir çok klinik araştırmada tespit edilmiştir (Grimmer et al., 2000). Sigara dumanının kanserojen *N*-nitrozodimetilamin içerdiği bilinmektedir. Günde bir paket sigara içen kişi yaklaşık 0,8µg *N*-nitrozodimetilamin solumaktadır ve sigara içilen yerlerde bulunanlar için bu daha da fazladır (Ruhl et al., 1980; Song and Ashley, 1999).

Kanserojen madde sınıflandırmasında yer alan aromatik ve alifatik mono-, di- ve poliaminler hayvan, bitki ve mikroorganizmaların metabolik ara ürünleri olmalarından dolayı çevrede doğal biçimde oluşmaktadırlar. Bu tür aminlerin solunum yoluyla veya ağızdan direkt alınması sonucunda bazı solunum yolu hastalıkları ortaya çıkmaktadır (Weiss and Angerer, 2002; Angerer et al., 1994; Neumann et al., 1995).

Anilin, *p*-toluidin ve trinitrotoluen (TNT) üzerinde yapılan araştırmalarda hayvanlarda kanser oluşumunu hızlandırdıkları ve kanserli hücrelerin artmasına neden oldukları belirlenmiştir. Bu tür bileşiklerin cilt tarafından direkt temasta kolaylıkla absorplandığı araştırmalarla tespit edilmiştir (Schmidt et al., 1998).

Aromatik aminler ve aromatik nitro bileşiklerinin metabolik döngüleri birbiriyle oldukça yakın ilişkilidir (Neumann et al., 1984). Aromatik aminler hücrelerde kanserin başlamasına öncülük etmektedirler. Şekil 1.3'de gösterildiği gibi aromatik nitro bileşikleri insan vücudunda nitro dönüştürücü enzimler tarafından çeşitli dönüşümler geçirerek aromatik nitrozo bileşiklerini oluşturur ki bu gruplar hemoglobindeki sisteinin SH grubuna bağlanarak kanser oluşturmaktadır. Aromatik nitrozo bileşiklerinin diğer bir türü de aromatik hidroksilamindir. Bu bileşik direkt olarak azot iyonları yoluyla 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 gereken miktardan çok daha fazla olduğu 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).

Çeşitli gıda ürünlerinde, kağıt, deri, kozmetik, ilaç, oyuncak, plastik, matbaa baskıları, tekstil gibi bir çok sanayide azo boyaları kullanılmaktadır ve bu maddeler genellikle aromatik aminlerin diazolanmasıyla hazırlanır. Yapılan bazı çalışmalarda karaciğerdeki azo redüktazları veya bağırsaklardaki anaerobik bakteriler, azo boyalarını kanserojen aminlere dönüştürerek bu boyaların potansiyel toksikliğini artırdığı tespit edilmiştir (Zhu et al., 2002; Danlon et al., 1997).

Primer ve sekonder aminlerin hem kendileri hem de nitrit ve nitratlarla oluşturdukları kanserojen nitrozaminler çevre ve insan sağlığı için zararlıdır (Pfundstein et al., 1991). *N*-nitrozaminlerin, insan besinlerinde doğal olarak bulunan nitrit ve nitrat gibi nitrozlama reaktifleri ile reaksiyonu sonucu oluştuğu bilinmekte olup, aynı zamanda bu tür bileşiklerin direkt olarak dokular tarafından absorplanmaya eğilimli oldukları, kanserojen ve alerjik etkilere sahip olduklarından şüphelenilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda deney hayvanlarında oluşan tümörlere kanser yapıcı nitrozaminlerin yol açtığı tespit edilmiştir (Kataoka et al., 1996).

Nitrozaminlerin 10'dan fazla üyesi vardır; bunların başlıcaları dibutilnitrozamin, dimetilnitrozamin, dietilnitrozamin, nitrozopirolidin, nitrozosarkosin ve nitrozopiperidin'dir. Bu maddeler vücutta, kanser yapmaya meyilli halde bulunurlar; sırasıyla, diazoalkan, diazonyum tuzu ve karbonyum iyonuna dönüşürler. Kanserogen etkiye sahip olan esas da son maddedir; elektrofilik özellikteki bu iyon, DNA, RNA ve amino asitlerdeki nükleofilik gruplarla birleşerek onları alkiler. Örneğin DNA'da guanin,

N7- ve O6- üzerinden alkilenir; bu etkileşme, bileşiğin mutajenik ve kanserojen etkilerinden sorumludur (Cardenes et al., 2002).

N-nitrozo bileşikleri hem vücutta şekillenirler, hem de çevreden kaynaklanırlar. Gıdalarla alınan nitrat, mide-bağırsak kanalında amonyağa kadar (bu sıra; nitrit, hidroksilamin, amonyak şeklindedir) indirgenir. Özellikle midede asitli ortamda (pH=2-4 en uygun ortamdır) nitrattan oluşan nitrit, sekonder aminler ve *N*-amitlerle tepkimeye girerek nitrozaminler ve nitrozamitleri oluşturur (El-Bayoumy et al., 1986; Palmiotto et al., 2001).

Çok sayıda ilaç sodyum nitritle birlikte verildiklerinde, nitrozamin şekillenmesine ve karaciğerde tümör sıklığının artmasına yol açar. Aminoprin, fenasetin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, karbaril, propoksur, atrazin, fenuron, simazin, thiram, ziram bu şekilde etkiyen ilaçlardan bazılarıdır.

Bebeklerin süt şişelerinde veya şişelerin meme başlarındaki plastiklerde *N*- nitrozaminlerin oluşumu tespit edilmiş ve bu aminlerin bebeklerin tükürük salgılarıyla birlikte vücuda girdiği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Billedeau et al., 1996; Gray and Stachiw, 1987).

Bir çok yiyecekte, özellikle sodyum nitrit katılarak korunan pişirilmiş etlerde, çok güçlü kanserojen *N*-nitrozaminler bulunmaktadır. Etlere ve et ürünlerine *Clostridium botulinum* (botulinus zehirini üreten bakteri) üremesini ve kırmızı etin kahverengiye dönüşmesini önlemek için çoğu kez sodyum nitrit katılır (Fiddler and Pensabene, 1996). Örneğin botulinus zehirinden ileri gelen gıda zehirlenmesi çoğu kez öldürücüdür. Sodyum nitrit, asit ya da ısı etkisinde, ette her zaman var olan aminlerle *N*-nitrozaminleri oluşturur. Örneğin, pişmiş domuz pastırmasının *N*-nitrozodimetilamin ve *N*-nitrozopirolidin içerdiği tespit edilmiştir (Toribio et al.,2002).

Nitritler ve bakteriler tarafından nitritlere dönüştürülebilir nitratlar birçok gıdada doğal olarak da bulunabilirler. Yiyeceklerdeki nitritler aminlerle, midedeki asitin etkisiyle de tepkimeye girerek nitrozaminler oluşturabilirler. 1976'da dünyada kızarmış ette izin verilen nitrit miktarı 200 ppm'den 50-150 ppm seviyesine düşürülmüştür (Hlavica et al., 1997).

1.5 AMİNLERİN BELİRLENMESİ

Boya, kimyasal madde, plastik ürünler gibi bir çok sanayinin atık suları ve tarım ilaçlarının karıştığı deniz ve nehir suları ile bu sanayilerin atık sularında ve dip çamurlarında bulunan aminlerin, çok düşük konsantrasyonda (ppm, ppb) belirlenmesi ve aydınlatılması için bir çok metot kullanılmaktadır. Bu metotlar kullanılmadan veya ölçüm yapılmadan önce aminlerin ortamdan konsantre edilerek belirlenecek limitleri arttırılabilmektedir (Avery and Junk, 1985). Bu işlemler için, akım destilasyonu, vakum destilasyonu, absorbe edici kolonlardan geçirme, Sep-Pak kartuşları ve zar difüzyon teknikleri kullanılmaktadır. Son yıllarda ise; azot-fosfor ısı dedetörü (NPD), kimyasal ışın dedetörü (CLD), gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi teknikler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu metotlar kullanılarak nanogramın (ng) altındaki seviyelerde madde tayini yapılması mümkündür (Kataoka, 1996; Yang et al., 1993). Tekstil sanayinde kullanılan azo boyaların bozunma ürünleri olan çevre örneklerindeki aromatik aminlerin HPLC ile analizleri yapılmakta ve HPLC-UV ile yapıları aydınlatılmaktadır (Pinheiroa et al., 2004). Benzer bir çalışma yapan Eskilsson et al., (2002), deri sanayinde kullanılan asit kırmızısı, asit siyahı gibi azo boyar maddelerin bozunma ürünleri olan 4-kloroanilin, *o*-toluidin gibi aromatik aminleri çevre örneklerinden ekstrakte ederek HPLC ile belirlemeyi başarmıştır.

Bununla birlikte aminlerin çevre örneklerinde belirlenmesinde bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Düşük molekül ağırlıktaki aminler, sudaki çözünürlüklerinin yüksek olması ve yüksek uçuculuğa sahip olmalarından dolayı bu tür aminlerin analizleri oldukça zordur. Ayrıca sözkonusu bileşiklerin sudan izole edilmeleri ve polaritelerinden dolayı kromatogramlarının alınması da çok zordur. Kolonlara absorbe olmaları veya uçuculuğu az olan yüksek molekül ağırlıklı aminlerin kolonları tıkaması, aynı zamanda kromatogramlarda verdikleri piklerin belirsiz ve çok küçük olması analizlerini güçleştirmektedir (Terashi et al., 1990).

Yüksek ayırma gücüne ve duyarlılığa sahip olması, analiz süresinin kısa ve maliyetinin düşük olmasından dolayı aminlerin analizlerinde gaz kromatografisi (GC) sıklıkla tercih edilmektedir. Aynı zamanda aminlerin sabit bir fazdan kolaylıkla serbest forma geçerek ayrılabilme özelliklerinden dolayı, analiz edilecek örnekler direkt enjeksiyonlarla, head-space tekniğiyle veya analizlerden önce bir organik çözücü ile ekstrakte edilmeden, alkali

bir ortam oluşturularak analizleri yapılabilir. İnsan idrarında bulunan kısa zincirli alifatik aminlerin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada head-space gaz kromatografisi ile metilamin, dimetilamin bazı uçucu aminler nanogram (ng) seviyede tespit edilmişlerdir (Zhang et al., 1992).

Seçicilik, düşük konsantrasyonda analiz gibi GC özelliklerini arttırmak ve amino gruplarının polaritesini azaltmak için türetme metotları kullanılmaktadır. Türetme reaksiyonları değişik amin tipleri (pirimer, sekonder, tersiyer) için seçici olup bu aminlerin aydınlatılmasında başarı sağlamaktadır. Atık su örneklerindeki aminlerin GC analizleri ile aydınlatılmasında alev iyonlaşma dedektörü (FID), elektron yakalama dedektörü (ECD), seçici iyon monitörü (SIM) ve alev fotometrik dedektör (FFD) kullanılarak araştırmalar yapılmaktadır (Terashi et al., 1990; Tsukioka et al., 1993).

Aminlerin GC analizlerinde polaritelerinin azaltılarak kolonlara uyum sağlamaları ve büyük molekül ağırlıklı aminlerin uçuculuklarının artırılması için bazı özel ekstra işlemler uygulanmaktadır. Hiç bir şekilde türetme işlemleri uygulanmadan çok duyarlı ve belirgin kromatografik analiz yapılması mümkün değildir (Sahasrabuddhey et al., 1999).

Aminlerin türetilmesiyle sadece polaritelerinin azaltılması değil aynı zamanda uçuculukları çok fazla olan, bu sebepten dolayı çevre analizleri çok güç yapılan veya hiç yapılamayan düşük molekül ağırlık aminlerin uçuculukları azaltılmakta ve seçicilik, duyarlılık ve ayrılma gibi özellikleri de artırılmaktadır (Terashi et al., 1990).

Metilamin, dimetilamin, etilamin gibi termal olarak kararsız bazı aminler ise gaz kromatografisinde ısı bozunmaya uğramaktadır. Türetme reaksiyonlarının uygulanmasıyla daha kararlı bileşiklerin oluşması ve kromatografik performansın artırılması sağlanmaktadır. Ayrıca hümkik asit, fenol gibi polar bileşikler, kolonların iç yüzeylerine tutunma eğiliminde olduklarından istenmeyen piklerin çıkmasına neden olmaktadır. Bu tür etkilerin ortadan kaldırılması amacıyla gaz kromatografisi ile analiz öncesinde türetme reaksiyonları uygulanmaktadır (Knapp, 1979).

1.6 AMİNLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN TÜRETME REAKSİYONLARI

1.6.1 Açılma

Primer ve sekonder aminlerin türetilmesi için kullanılan reaksiyonların en popülerlerinden biri açılma işlemidir. Asit anhidritler, açıl klorürler, açilimidazoller ve açilamidler açılma reaktifleri olarak kullanılırlar. Bu reaktifler uygun şartlar altında kolaylıkla amino grupları ile reaksiyon vermektedir. Aynı zamanda bir çoğu fenol, hidroksil ve tiol grupları ile de reaksiyon vermektedir. Çevre örneklerinin analizinde aminlerin çok düşük konsantrasyonlarda olmaları ve özellikle fenolik ve karboksilik asit gruplu bileşiklerin fazla olması sebebiyle açılma reaktifleri ile istenilen verime ulaşamamaktadır (Kataoka et al., 1996).

Brede et al., (2003) sulu gıdalarda oluşan kanserojen anilin, 4,4-mettilendianilin gibi aromatik aminleri trifloroasetik anhidrit (TFA) ile açilleyerek GC-MS ile 0,1-0,4 µg/l seviyesinde belirlemeyi başarmıştır. Weiss and Angerer (2002) yaptıkları çalışmada insan idrarında bulunan aromatik nitro bileşiklerinin metabolitleri olan aromatik aminleri pentafloroasetik anhidrit (PFA) kullanarak türetmişler ve 0,05µg/l seviyesinde GC-MS ile analizler yapmışlardır.

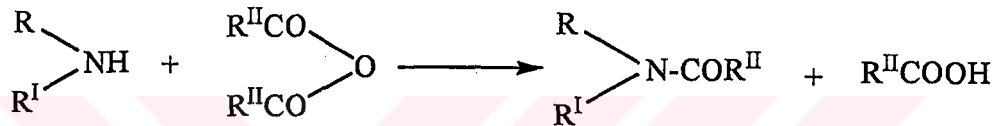
Aminlerin asit anhidritlerle ve açıl klorürlerle reaksiyonlarında gereğinden fazla kullanılan reaktifin aşırısının ve oluşan asit ürününün ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çünkü bu bileşikler GC kolonuna zarar vermektedir. Bu sebepten dolayı mükemmel çözücüler yanında oluşan asit ürününü ortamdan almak ve reaksiyonun ilerlemesini devam ettirmek için piridin, trimetilamin, trietilamin gibi bazlar kullanılır. Kauçuk ürünlerindeki *N*-nitrozaminlerin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada asetik anhidrit ile türevlendirilen dimetilnitrozamin, dietilnitrozamin gibi birçok nitrozamin GC ile belirlenmişlerdir Garrigos et al., (2002).

Bazı ilaçların türetilmesinde kullanılan açilimidazollerle imidazol türevleri hazırlanırken oluşan imidazol ürünü ve reaktifin aşırısı uzaklaştırılarak analiz yapılmalıdır. Amino, hidroksil ve karboksil gruplarının türetilmesinde türetme reaktifi olarak kullanılan *N*-Metilbis(trifloroasetamid) (MBTFA) çok uçucudur ve reaksiyon sonucu oluşan *N*-

metiltrifloroasetamid ürünü kolonun zarar görmesine neden olur. Aynı zamanda MBTFA, hidroksiamino bileşiklerinin trimetil silillemesinden sonra azot grubunu açillemek içinde kullanılır. Açılme reaksiyonları ile elektron yakalama özelliği olan bileşikler türetilebilir. ECD'de anilinin kloro ve floro türevleri yapılan bir çok araştırmada karşılaştırılmıştır. ECD halojenlenmiş türevlere daha duyarlı olup bu duyarlılık $F < Cl < Br < I$ halojenlenmiş türevlerde sırasıyla artmaktadır (Schmidt et al., 1997).

şekil 1.4'de primer ve sekonder aminlerin açilme reaktifleri ile reaksiyonları ve oluşan ürünler verilmiştir.

Asit anhidrit ile;



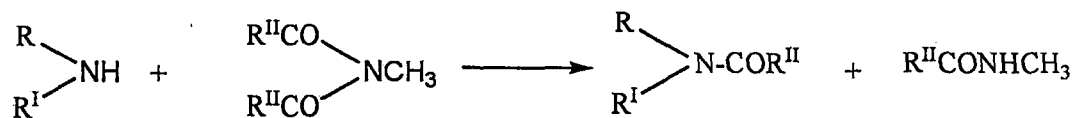
Açıl klorür ile;



Açilimidazol ile;



Açilamid ile;



şekil 1.4 Primer ve sekonder aminlerin açillenmesi (Kataoka, 1996).

R : alkil veya aril R^I : Hidrojen, alkil veya aril.

1.6.2 Sililleme

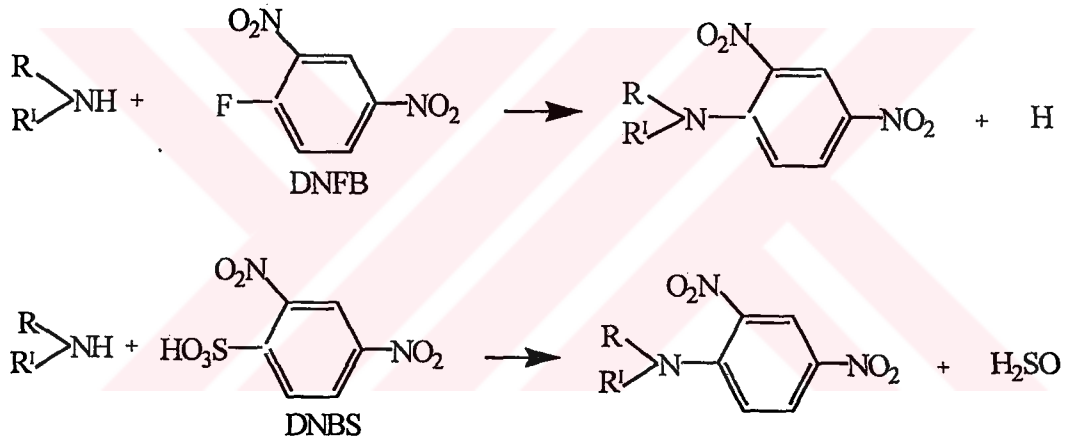
Silil reaktiflerinin amin grupları ile reaksiyona girme eğilimleri çok yüksek değildir ve silil türevlerinin oluşması oldukça zordur. Aminlerin silil türevlerinin oluşabilmesi için kuvvetli bir reaktif ve iyi bir kataliz seçilmelidir. N,O-Bis (trimethylsilyl)acetamide (BSA), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) ve pentaflorofenildimetilsilil (flofenmesil) başlıca sililleme reaktifleridir (Kataoka et al., 1996).

Bu reaktifler sadece amino grupları ile değil aynı zamanda hidroksil ve karboksil grupları ile susuz reaksiyon koşullarında da reaksiyon vermektedir. Reaksiyon eğilim sırası; alkol, fenol, karboksilik asit, amin sıralamasında olmaktadır. Primer aminler sekonder aminlere göre daha iyi reaksiyon vermektedir (Skarping et al., 1989). Amino gruplarının türetilmesinden emin olmak için genellikle trimetilklorosilan eklenerek reaksiyonun tamamlandığı belirlenir. Reaktiflerin nemde kararsız olmaları analizleri güçleştirmektedir. Kullanılan *N*-trimetilsilil (TMS) reaktifinin primer amin ile reaksiyonu sonucu mono ve di-TMS türevleri oluşmaktadır. Fasulye ve kuruyemiş tohumlarındaki proteinsiz ve protein amino asitlerinin belirlenmesi için Oh et al. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada tohumlardaki amino asitlerin amin grupları isobutilkloroformat ile türetilmiş ve sözkonusu aminoasitlerin karboksil grupları da MTBSTFA ile türevlendirilerek GC ile analizleri yapılmıştır. Benzer bir çalışma da Kim et al. (1992) tarafından protein amino asitlerinin sulu çözeltilerde türetilmesi için yapılmıştır. Silil reaktifi olarak MTBSTFA kullanılmış ve oluşan türevler GC-MS ile aydınlatılmıştır. Spyridaki et al. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada idrardaki efedrin, N-metil-N-(trimetilsililtrifloroasetamid (MSTFA) ile türetilerek GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Sililleme reaksiyonlarına örnek bir çalışma da Shafi et al. (1989) tarafından yapılmıştır. Amerikan hamam böceklerinin beyinlerindeki alıcı reseptörlerde bulunan oktamin, dopamin gibi biyojenik aminlerin belirlenmesinde hidroksil gruplarının türetilmesi için TMS kullanılmıştır.

1.6.3 Dinitrofenilleme

Dinitrofenilleme reaksiyonu sulu ortamda primer ve sekonder aminlerin türetilmesinde kullanılmaktadır. 2,4-Dinitroflorobenzen (DNFB) ve 2,4-Dinitrobenzen sülfonik asit

(DNBS) reaktifleri bu reaksiyonda kullanılmaktadır (Kataoka et al., 1996). DNFB ile olan reaksiyon prosedürü her ne kadar basit olsa da, kullanılan reaktif deride tahriş ve kabarmalara yol açar. DNBS suda çözünür ve DNFB türevleri de organik çözücülerde çözünmektedir. Türetme işleminden sonra türevler kolaylıkla çözücü ekstraksiyonu ile ayrılabilen ve reaktifin aşırı ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. DNBS ile yapılan türetme reaksiyonunun en avantajlı yönü reaktifin amino grupları ile diğer gruplardan (hidroksil, tiol, imidazol) daha iyi reaksiyon vermesidir. Bununla beraber, bu reaksiyonların çok yavaş olması ve büyük miktarlarda kuvvetli alkali ortamlara ihtiyaç duyulması bir dezavantaj oluşturmaktadır. Sacher et al., 1997, atık ve yüzey sularındaki düşük molekül ağırlıklı alifatik aminler 2,4-Dinitroflorobenzen (DNFB) ile türetilerek GC-MS'de 1µg/l -100 µg/l seviyesinde belirlenmiştir. Bu tür bir türetme reaksiyonu Şekil 1.5'de gösterilmektedir.



Şekil 1.5 Primer ve sekonder aminlerin dinitrolanması (Kataoka, 1996).
R : Alkil veya aril, R' : Hidrojen, alkil veya aril.

1.6.4 Permetilleme

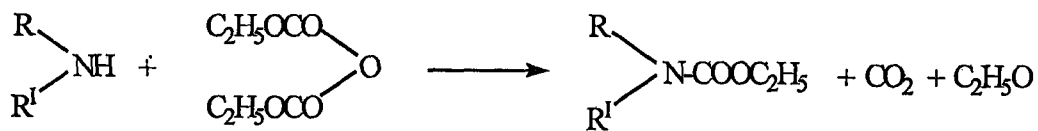
Bu yöntemde primer ve sekonder aminler sulu çözelti içerisinde formaldehit-sodyum borohidrit kullanılarak tersiyer aminlere dönüştürülmektedir. Bu yöntem poliaminlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Permetillemede polar -NH- gruplarının yerine alkil gruplar takılarak tersiyer amin oluşturulmaktadır.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

1.6.5 Karbamat Oluşumu

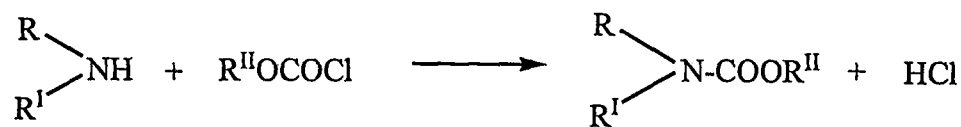
Primer, sekonder ve tersiyer aminlerin belirlenmesinde kullanılan karbamat reaksiyonları genellikle Schotten-Baumann tipi prosedürlere göre yapılmaktadır. Dietil prokarbonat ve alkil kloroformatlar bu reaksiyonlarda çok sık olarak kullanılırlar. Aminlerin türetilmesinde kullanılan alkil kloroformatlar ayrıca peptit sentezinde ve çevre örneklerinde karboksilik asitlerin de belirlenmesinde kullanılabilir. Wittmann et al. (2000)'de su örneklerindeki asetik asidi belirlemek için yaptığı çalışmada *n*-hekzil kloroformat kullanarak asetik asit gibi düşük molekül ağırlıklı asitleri belirlemeyi başarmıştır. Biyolojik sıvılardaki bazı biyoaktif aminlerin belirlenmesinde alkil kloroformatlar kullanılmaktadır. Aymard et al. (2000) insan plazmasındaki efedrin ve norefedrin 9-florenilmetil kloroformat kullanarak 2 ng/mL konsantrasyonda belirlemeyi başarmıştır. Benzer bir çalışmayı Buratti et al. (2002)'de yapmıştır ve idrar metabolitlerindeki hekzafloroizopropanolü 9-florenilmetil kloroformat ile türeterek belirlemiştir.

Bu reaktiflerle, aminlerin alkali sulu ortamdaki reaksiyonunun yüksek verimlilikte olması, reaksiyonun hızlı gerçekleşmesi ve aynı zamanda karbamat türevlerinin kararlı yapılar oluşturması ve oluşan türevlerin GC-MS'de kolaylıkla aydınlatılabilmesi nedeniyle aminlerin türetilmesinde en yaygın kullanılan türetme reaksiyonudur (Husek 1991, 1991a, Gimeno-Adelantado et al.'den 2002). Şekil 1.6'de dietilprokarbonat ve alkil kloroformatların sekonder ve tersiyer aminler ile reaksiyonları ve oluşan ürünler verilmiştir.

Dietilprokarbonat ile;

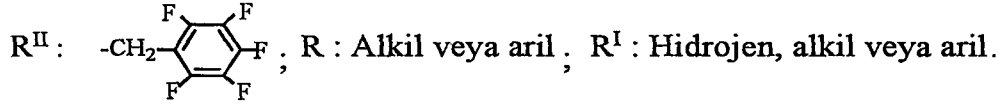
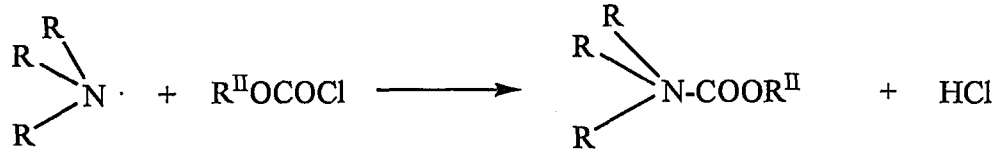


Alkil Kloroformat ile;



R^{II} : C_2H_5 , $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CF_3

Şekil 1.6 Primer, sekonder ve tersiyer aminden karbamat oluşumu (Kataoka, 1996).



Şekil 1.6 (devam ediyor)

Alkil kloroformatlar kullanarak aminlerin türetilmesi sıkça kullanılan yöntemlerdendir. Etilkloroformat ve izobutilkloroformat (IBCF) kullanılarak çevre örneklerinde ve biyolojik sıvılardaki çok düşük konsantrasyona sahip aminler belirlenebilmektedir. Özellikle bu bileşiklerin algılama limitleri diğer türetme reaksiyonlarına göre çok yüksektir. Aynı zamanda türetme reaksiyonu için kullanılan reaktifin miktarı çok düşüktür (Chinchilla et al., 2002).

Skarping et al. (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, idrar örneklerindeki alifatik aminler izobutil ve etil kloroformatlar ile türetilerek GC ile belirlenmiştir. Çalışmada idrar içersinde belirlenen piperazin için minimum etki konsantrasyonu 2 pg/μl olarak verilmektedir.

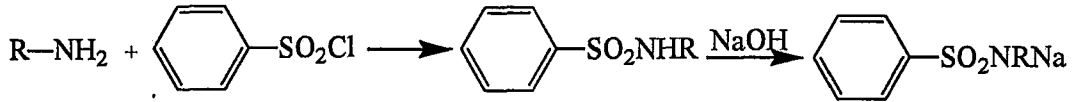
1.6.6 Sülfoamid Oluşumu

Hinsberg (1890), tarafından belirtilen sülfonil klorür ile aminlerin reaksiyonu farklı amin tiplerinin belirlenmesinde ve aydınlatılmasında kullanılmıştır (Kataoka, 1996). Bu reaksiyonlar oda sıcaklığında ve alkali ortamda gerçekleşmektedir. Şekil 1.7’de reaksiyonları verilen primer aminlerin sülfoamid türevleri alkali çözeltide çözünürken sekonder aminlerin türevleri alkali çözeltide çözünmemektedir. Tersiyer aminler ise sülfonil klorürler ile reaksiyon vermezler. Benzensülfonil klorür (BSC) ve *p*-toluensülfonil klorür düşük molekül ağırlıklı primer ve sekonder aminlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Paleologos et al. (2003), çeşitli gıda örneklerindeki spermin, feniletilamin gibi biyojenik aminleri BSC ile türeterek 0,01mg/l konsantrasyonda HPLC ile belirlemiştir. Knepper et al. (1999) içme sularındaki organik bileşiklerin bozunma

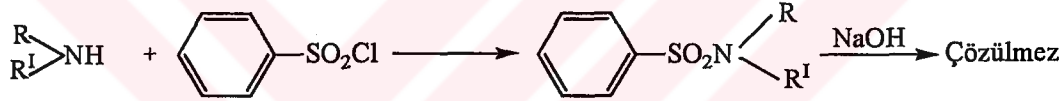
ürünleri olan alifatik aminlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada, BSC ile çok düşük konsantrasyondaki alifatik aminleri türeterek belirlemeyi başarmışlardır.

Bu tür metodlarla birlikte trifloroasetik anhidrit (TFA) kullanılarak primer aminlerin BSC türevleri N-TFA-N-BS türevlerine dönüştürülebilir. Bu metot primer aminler için seçici ve duyarlı bir metottur. Bununla birlikte sekonder aminlerin BS türevleri TFA ile reaksiyon vermediğinden bu aminler için kullanılmamaktadır (Kataoka et al., 1993). Şekil 1.7’de aminlerin sülfonamit reaksiyonları gösterilmiştir.

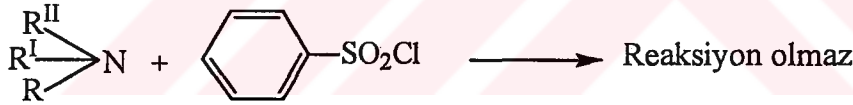
Primer amin



Sekonder amin



Tersiyer amin



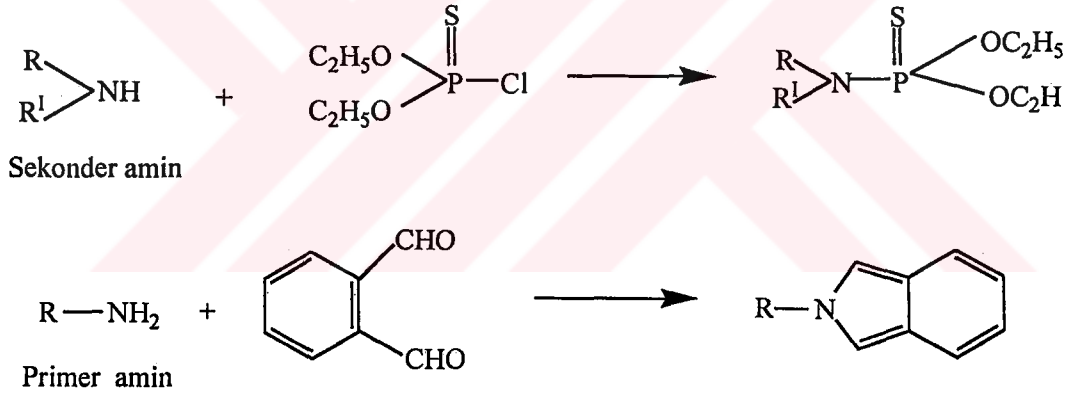
Şekil 1.7 Hinsberg metodu ile primer, sekonder ve tersiyer aminlerin ayrılması ve aydınlatılması (Kataoka, 1996). R, R^I, R^{II} : Alkil veya aril

1.6.7 Fosfoamit Oluşumu

Primer alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesinde kullanılan fosfoamit oluşum metodu ile aminler; dimetiltiyofosfinik klorür ile *N*-dimetiltiyofosfinik amitleri oluşturmaktadır. Primer ve sekonder aminlerin belirlenmesinde kullanılan o-ftaldialdehit ile primer aminler reaksiyon vermezler, bununla birlikte sekonder aminler de dietiltiofosforil klorür ile reaksiyon vermemektedir. Bu özellikler kullanılarak primer ve sekonder aminler birbirinden ayrılmaktadır (Kataoka et al., 1995a, 1996b). Bu metodun kullanımı için çok uzun bir prosedür gerekme ve kuru ortama gereksinim duyulmaktadır. Aynı zamanda bu reaksiyonlar ile *N*-nitrozoaminler hidrobromik asit ile dinitrozlanarak sekonder aminlere

çevrilip dimetiltiyofosfinik klorür ile fosfoamid türevlerine dönüştürülürler. Vidal-Carou et al. (2003) bira örneklerinden kadaverin, putresin gibi biyojenik aminlerin belirlenmesi için türetme işleminde *o*-fitalaldehit kullanmış ve 0,06mg/l seviyesinde HPLC ile bu tür biyojenik aminleri belirlemeyi başarmıştır. Benzer bir çalışmada Kutlan et al., (2003) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada amino asitler ve aminler *o*-fitalaldehit ile türetilerek HPLC ile analizleri yapılmıştır. Brezilya peynirlerinde oluşan spermin, putresin, histamin, spermidin gibi biyojenik aminlerin belirlenmesi için Vale ve Gloria (1998) tarafından yapılan çalışmada, *o*-fitalaldehid ile türetme işlemi kullanılarak 10mg/100g seviyesinde analizler yapılabilmektedir.

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. Şekil 1.8'de fosfoamid oluşum reaksiyonları ve kullanılan reaktifler verilmektedir.



Şekil 1.8 *o*-Ftaldialdehit ve dietiltiyofosforil klorür ile primer ve sekonder aminlerin seçici olarak türetilmesi (Kataoka, 1996).
R ve R¹ : alkil veya aril

1.7 ALİFATİK VE AROMATİK AMİNLERİN BELİRLENMESİYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesiyle ilgili literatürde geçen bazı önemli çalışmalar aşağıdaki gibi paragraflar halinde özetlenmiştir.

Terashi et al. (1990) yaptıkları çalışmada, nehir, deniz suyu ve bunların dip çamurlarında propilamin, izopropilamin, metilamin ve butilamin gibi 8 tane primer ve sekonder amin belirlemiştir. Çalışılan örnekler alkali ortamda distillenerek benzensülfonil klorür ile benzen sülfolama uygulanarak amin bileşikleri GC-MS-seçici iyon dedektörü (GC-MS-SIM) ile aydınlatılmıştır. Bu metot ile su örneklerindeki aminler 0,02-2 ppm arasında ve dip çamuru örneklerinde de 0,5-50 ppm konsantrasyon seviyesinde tayin edilmiştir.

Ne Urath et al. (1977), bataklık ve nehir suları üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda 40 tane primer ve sekonder amini GC-FID ile tespit etmeyi başarmışlardır. Bataklık örneklerinde çok sayıda C₁-C₃ alifatik amin belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile 15 ppb konsantrasyon seviyesindeki aminlerin tayin edilebileceği belirtilmiştir.

Kago et al. (1980) yaptıkları çalışmada, çeşitli endüstrilerin atık sularının ve bazı endüstriyel atıkların karıştığı nehir suyu örneklerinde alifatik ve aromatik aminlerin belirlenebilmesi için bir metot geliştirmiştir. Çalışmada, su örneklerindeki aminler dinitrofenil reaktifi ile türevlendirilmiş ve bu bileşiklerin yapıları GC-MS ile aydınlatılmıştır. Bu yöntemle 1-3 ppb konsantrasyonları arasında metilamin, dimetilamin ve *n*-propilamin gibi 11 tane alifatik primer ve sekonder amin belirlenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Avery ve Junk (1985) nehir suları ve petrol atıklı sular üzerinde yaptıkları çalışmada, GC-MS kullanarak metilamin, izopropilamin, sikloheksilamin gibi 7 tane amin tespit etmişlerdir. Pentaflorobenzaldehit ile Schiff bazı oluşturma reaksiyonuna dayanan bir proses kullanarak 10 ppb konsantrasyonunda aminleri belirlemeyi başarmışlardır.

Kataoka et al. (1996), sigara dumanında bulunan sekonder aminler için seçici bir metot geliştirmişlerdir. Bu metot aminlerin *N*-dietiltiofosforil ile türetilerek gaz kromatografisi-alev iyonlaşma dedektörü (GC-FID) ile belirlenmesi esasına dayanır. Geliştirilen bu metot ile sigara dumanında bulunan dimetilamin, pirolidin, piperidin ve morfolin 0,05 ve 0,2 pmol konsantrasyon aralığında tayin edilmiş olup aynı zamanda bu çalışma ile sigara tütününde ve içimden sonra oluşan dumanda bulunan aminlerin yapıları arasındaki farklar karşılaştırılmıştır.

Kataoka et al. (1996), plastik ürünleri, içme suları, besin, tütün ve tütün mamullerinde bulunan uçucu *N*-nitrozaminlerin GC ile belirlenmeleri için seçici ve hassas bir metot üzerinde ayrıca çalışmalar yapmıştır. Bu metotta *N*-nitrozaminler hidrojen bromür (HBr) ile denitrozlandıktan sonra sekonder aminlere dönüştürülüp dietilklorofosfat ile türetilerek GC ile ölçümler yapılmıştır. *N*-nitrozaminlerin 0,05-1 nmol konsantrasyonlarında kantitatif analizleri yapılmıştır ve bu metot kullanılarak benzer örneklerden *N*-nitrozaminler ve sekonder aminlerin belirlenebileceği önerilmektedir.

Chang et al. (2003) tarafından bazı kanserojen aminlerin belirlenmesi için geliştirilen metotla, göl ve nehir sularından katı-faz mikro ekstraksiyonu (SPME) ile izole edilen aromatik aminler HPLC ile belirlenmiştir. Bu çalışmada su örneklerinde 6 tane kanserojen aromatik amin tespit edilmiştir. Sıcaklık, pH, organik çözücü, fiber kaplama gibi bir çok parametre optimize edilerek metot çevre örnekleri üzerinde uygulanmış ve metodun en düşük algılama sınırı 5-500ng/ml olarak belirtilmiştir.

Schmidt et al. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni bir türetme metodu uygulanarak asetik asit ortamında aromatik aminler bromlanarak polar aromatik aminlerin analizlerinde karşılaşılan bazı yaygın problemlerin üstesinden gelinmiştir. Bromlama metodu çok basit işlemlerden oluşup, bromlama türevleri kolaylıkla pentan ile ekstrakte edilmekte ve GC ile aydınlatılabilmektedir. Bu çalışmada patlayıcı madde üreten fabrikaların atık sularından alınan su örneklerinde amino- ve aminonitrotoluenler belirlenmiştir. Nitroaromatik patlayıcıların yan ürünleri olan amino- ve aminonitrotoluenler, su örneklerinden izole edilerek bromlama ile türetilmişlerdir ve oluşturulan türevlerin ultraviyole spektroskopisinde (UV) sözkonusu bu maddelerin absorbans özelliklerinden yararlanılarak absorbans bantları incelenmiş ve GC-MS ile amin türevlerinin yapıları aydınlatılmıştır.

Müller et al. (1977), çeşitli kimya endüstrilerinin ara ürünleri veya yan ürünleri olarak oluşan ve atık sular ile çevreye karışan aromatik aminlerin belirlenebilmesi için su örneklerinden polar aromatik aminlerin ekstraksiyonu ve sonrada yapılarının GC-MS ile aydınlatılmasını içeren bir metot geliştirmiştir. Bu çalışmada katı-faz ekstraksiyonu kullanılarak su örneklerinden izole edilen *p*-kloroanilin, 3,5-dikloroanilin, 3,4-dikloroanilin sırasıyla 0,05µg/l ve 0,23µg/l konsantrasyonlarında GC-MS ile belirlenmiştir.

Zhang et al. (1992), insan vücudunda ciddi problemlere yol açan bazı uçucu metilamin, dimetilamin, etilamin, izopropilamin gibi toksik alifatik aminlerin insan idrarındaki kantitatif analizlerine ve direkt enjeksiyonla belirlenmesine imkan tanıyan bir türetme metodu önermişlerdir.

Hušek et al. (1992) tarafından yapılan çalışmada, biyolojik sıvılardaki biyojenik aminlerin ve amino alkollerin belirlemesi için bir alternatif bir GC-MS metodu sunulmaktadır ki temel olarak metil kloroformat veya etil kloroformat kullanılarak yağ asitlerinin karboksilik gruplarını, amino asitlerin ve hidroksiasitlerin esterleştirilerek belirlenmesi % 95 verimle sağlandığı belirtilmektedir.

Casal et al. (2002) tarafından çekilmiş kahve örneklerinde 4-(5-)-metilimidazolün belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, metanol ile 1 saat ekstrakte edilen kahve örneklerinde bulunan metilimidazol bis-2-etilhekzilfosfat (BEHPA) ile iyon çifti reaksiyonu ile kloroform fazına alınıp 0.1M HCl ile geri ekstraksiyon ile sulu fazda etilkloroformat veya izobutilkloroformat ile türetilerek GC-FID ile analizleri yapılmış ve oluşturulan 4-(5)- metilimidazol türevlerinin yapıları GC-MS ile aydınlatılmıştır. Bu çalışmada türetme reaksiyonlarının verimi %96-%99'dur ve kahve örneklerindeki metilimidazol 0,307-1,241 mg/kg arasında belirlenmiştir.

İyon çifti ekstraksiyonu ile ilgili benzer bir çalışma da Fernandes ve Ferreira (2000) tarafından yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada; Portekiz şarabı ve meyveli içeceklerde oluşan biyojenik aminlerin BEHPA ile iyon çifti reaksiyonu yapılarak türetme öncesinde organik faza konsantre edilmeleri sağlanmıştır. Daha sonra geri ekstraksiyon yapılarak sulu faza alınan aminler su kısmı uçurularak kuru fazda heptafloro asetikanhidrit ile türetilmiştir. Bu metot ile şarap ve meyve sularında belirlenen putresin, 1,3-diaminopropan, kadaverin gibi biyojenik aminlerin 5-10 µg/l düzeyde belirlenebileceği önerilmektedir.

Yamamoto et al. (1982) yaptıkları çalışmada, insan idrarı örneklerinde monoasetilputresin, monoasetilkadaverin ve N-asetilspermidinin belirlenebilmesi için bir gaz kromatografisi metodu geliştirmişlerdir. Bu metotta aminler silika jel kolon kromatografisi ile idrar örneklerinden izole edilerek sulu ortamda etilkloroformat ile etiloksikarbonil türevlerine dönüştürülerek yapıları GC-FID ile belirlenmiştir ve oluşan türevler GC-MS ile

aydınlatılmıştır. Bu metot ile birçok gönüllü hasta idrarlarında nanomol seviyede monoasetilpoliaminlerin tespit edilmesinin mümkün olduğu ileri sürülmektedir.

Skog et al. (1998) yiyecekler üzerinde yaptıkları çalışmada, bir çok yiyeceğin yanlış ısıtma işlemleri sonucunda kanserojen ve mutajen heterosiklik aminlerin oluşumuna neden olduğunu belirlemişler ve bu tür aminleri yiyecek örneklerinden katı-faz ekstraksiyonu ile izole ederek yapılarını GC-MS ile aydınlatmışlardır. Bu çalışmada polar olmayan kanserojen heterosiklik aminlerin, gıda örneklerinde 0,03-0,2ng/g seviyede tespit edilebileceği önerilmektedir.

Oh et al. (1994) amino asitlerin gaz kromatografik analizleri için geliştirdikleri metotda, iki aşamalı bir prosedür uygulamışlardır. Birinci aşamada sulu fazda pH=11 de IBCF reaktifi ile amino asitlerin amin grubu türetilip daha sonra katı-faz ekstraksiyonu yapılarak türevler sulu çözeltilerden kolona yüklenmiştir. Kolondan dietileter gibi çeşitli çözücülerle alınan N(O,S)-isoBOC amino asit türevleri ikinci aşamada da silil reaktifi ile karboksil grubu türetilmiştir. Bu metot ile sulu çözeltilerden serbest amino asitlerin kolaylıkla ve spesifik olarak ekstrakte edilebileceği gösterilmektedir.

Skarping et al. (1986), atmosfer ve insan idrarında piperazinin belirlenmesi için geliştirdiği metotda insan idrarından ekstrakte ettiği piperazini etil kloroformat ve izobutilkloroformat ile türetmiş ve türevler gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Reaktiflerin piperazin ile reaksiyon verebileceği en düşük konsantrasyon 20 pg/μl olarak ölçülmüş ve IBCF için reaksiyonun verimi % 95 olarak belirtilmiştir.

Benzer reaksiyonlar içeren Skarping et al. (1989) tarafından yapılan başka bir çalışmada, idrar gibi biyolojik sıvılardaki aminler etilkloroformat kullanılarak türetilmiş ve gaz kromatografisi ile tayin edilmiştir. İlk olarak izobutilkloroformat ile di-*n*-butilamin türetilmiştir. Bu aşamadan sonra aynı koşullarda idrar numunesi etilkloroformat ile türetilerek standart türev olarak da IBCF türevi kullanılmış ve idrar örneğindeki 1,6-hekzametilendiamin tespit edilmiştir. Bu yöntemin minimum algılama konsantrasyonu 10μg/l verilmektedir.

1.8 AMİNLERİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN BAZI ÖNEMLİ İZOLASYON TEKNİKLERİ

Çevre örneklerinde ve biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonlarda (ppm, ppb) bulunan ve uçuculukları bir hayli yüksek olan amin bileşiklerinin belirlenmesi oldukça zordur. Deniz suyu gibi tuz oranı yüksek örneklerde ise aminlerin yüksek çözünürlüğe sahip olmaları analizlerini güçleştirmektedir (Kataoka, 1996). Günümüzde aminlerin çevre örnekleri ve biyolojik sıvılardan analizlerini kolaylaştırmak ve kullanılan cihazların etki konsantrasyonlarını arttırmak için bir çok izolasyon tekniği geliştirilmiştir. Özellikle GC ve HPLC ile belirlenmelerinde ön aşama olarak kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı-sıvı ekstraksiyon, katı-faz ekstraksiyonu (SPE) ve katı-faz mikro ekstraksiyonu (SPME) yöntemleri bazı önemli izolasyon yöntemleridir (Ma and Ladas, 1976; Terashi et al., 1990). Bu izolasyon yöntemlerinin kullanılması ile örneklerde çok düşük konsantrasyonda bulunan amin bileşikleri belirlenebilecek konsantrasyonlara yükseltilmekte ve bununla birlikte çevre örnekleri gibi organik bir çok maddenin çözünmüş halde bulunduğu numunelerde bulunan bu çok istenmeyen bileşiklerden kurtulmuş olunmaktadır. Aşağıdaki paragraflarda aminlerin analizlerinde kullanılan bazı önemli izolasyon teknikleri kısaca özetlenmektedir.

1.8.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi sıvı örneklerin içinden istenilen maddenin uygun bir organik çözücü kullanılarak izole edilmesi için uzun yıllardır kullanılan önemli bir analiz metodudur. Kataoka et al. (1996) *N*-nitrozamin ve sekonder amin içeren sıvı örnekten uygun organik çözücü kullanarak sekonder aminleri ekstrakte etmişlerdir. Çevre örneklerinde ve biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonda bulunan aminlerin izole edilebilmeleri oldukça güçtür. Bu sebepten dolayı bu tür maddelerin sulu çözeltilerden izole edilebilmesi için sıvı-sıvı, katı-sıvı, katı-faz ekstraksiyonu gibi yardımcı bazı ekstraksiyon işlemleri gerekmektedir.

İnsan idrarındaki aromatik nitro bileşiklerinin metabolitleri olan kanserojen bazı aromatik aminlerin belirlenmesi için Weiss ve Angerer (2002) tarafından yapılan bir çalışmada;

idrar örnekleri direkt pH ayarlaması yapılarak hekzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak ortamdan izole edilmiştir.

İyon çifti ekstraksiyonunu ilk olarak Persson ve Schill (1993) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu metot ile sulu çözeltide iyonlaşabilen bileşikler, organik faz içerisinde (kloroform, diklorometan gibi) uygun karşı yüklü bir iyonla ekstrakte edilebilirler. Ekstraksiyonun verimlilik derecesi kullanılan reaktifler ve uygun çözücülerle artırılabilir. Basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu prosedüründe kompleks yapıların içersinden istenilen maddeler iyon çifti oluşturularak ekstrakte edilebilir ve bu işlem kromatografik analizler öncesinde büyük bir avantaj sağlamaktadır.

BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonunu ilk olarak Thomsen ve Willumsen belirtmişlerdir. Çevre örneklerinden primer ve sekonder aminlerin ekstraksiyonu için uzun yıllardan beri BEHPA reaktifi kullanılmaktadır.

BEHPA ile yapılan iyon çifti ekstraksiyonu ile çevrede çok düşük konsantrasyonda bulunan amin bileşikleri bir organik faza izole edilerek hem konsantrasyonları artırılmış olmakta hem de sözkonusu maddeler için ileriki safhalarda yapılacak türetme reaksiyonlarına imkan sağlanmış olmaktadır (Fernandes and Ferreira, 1997). Aynı zamanda BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonu ile seçici ekstraksiyon yapılabilmekte ve 10^{-5} ppb konsantrasyonunda madde tayini mümkün olmaktadır (Thomsen and Willumsen, 1981).

İnsan vücudunda çok düşük konsantrasyonda varolan histaminin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada heptan içerisinde hazırlanmış BEHPA ile iyon çifti oluşturularak idrar numunesinde 0.48ng/mL konsantrasyonunda tespitler yapılmış olup aynı zamanda BEHPA için 25 mM dan daha küçük konsantrasyonların tespit edildiği belirtilmekte ve pH ayarlanmasında kullanılan tampon çözeltinin molaritesinin ekstraksiyonun verimine etki ettiği öne sürülmektedir (Tsikas et al., 1993). Benzer bir çalışmada; BEHPA reaktifi kullanarak çekilmiş kahve örneklerindeki 4-(5)-metilimidazol kloroform ile iyon çifti ekstraksiyonu yapılmış ve 5µg/kg seviyelerinde madde tayini yapılabileceği belirtilmiştir (Casal et al., 2002).

1.8.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyon

Yüksek molekül ağırlıklı, suda az çözünen ve polar grup içermeyen organik maddeler dip çamurları, taşlar ve suda yaşayan canlı organizmalar üzerinde birirmektedir. Bu türden katı maddelerin üzerinde biriken organik maddelerin izolasyonları genellikle sokslet cihazında katı-sıvı ekstraksiyonu ile yapılmaktadır. Sokslet cihazı içinde organik çözücünün bulunduğu balon, gövde ve geri soğutucudan oluşan silindirik bir çember şeklindedir. Katı numune kartuş içine konularak gövdenin içine yerleştirilir. Balonda kaynayan çözücü soğutucuda yoğunlaşarak katı numunenin üzerine damlar ve sonra sifon yaparak balonun içine akar. İşlem bu şekilde istenildiği zaman süresince devam etmektedir. Bu işlem ile dip çamuru örneklerinden kolaylıkla aminlerin izole edilmesi mümkün olmaktadır. Bununla beraber diğer yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de kullanılacak çözücünün seçimi oldukça önemlidir. Dip çamuru örneklerindeki amin bileşiklerinin, özellikle uçucu aminlerin belirlenmesi için asidik metanol sıklıkla kullanılmaktadır.

1.8.3 Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonda çok fazla çözücünün ve zamanın harcanması, ayrıca bu yöntemde suda yüksek çözünürlüğe sahip polar maddelerin analizlerinin düşük verimle yapılmasından dolayı daha pratik, ekonomik, seçici ve hassas teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda, sıvı-sıvı ekstraksiyona alternatif olarak geliştirilen katı-faz ekstraksiyonu tekniğine büyük ilgi vardır. Bu teknikte herhangi bir sıvı numunesi, içinde 100-500mg absorban madde bulunan tek kullanımlık kolondan geçirilir. Daha sonra absorban üzerine tutunan madde uygun bir organik çözücü ile geri kazanılarak istenilen analizler yapılır. Gıda örneklerinden heterosiklik aminlerin izole edilebilmesi için Gross ve Grüter (1992), tarafından değişik bir katı-faz ekstraksiyonu geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken önemli noktalar; analizi yapılacak maddenin bazı fizikokimyasal özelliklerine göre uygun absorbanın ve çözücünün belirlenmesidir. En çok kullanılan absorbentler alkil bağlı silikalar, apolar kopolimerler ve karbon esaslı absorbentlerdir. Ternes ve çalışma arkadaşları farmasotik bileşiklerin analizleri için polimer bazlı oktadesilsilika kullanmışlardır (Öllers et al., 2001). Polar bileşikler C_{18} olarak adlandırılan oktadesil silikalar ve grafit gibi karbon esaslı

absorbentler, apolar bileşikler için ise polistiren-divinil benzen kopolimeri en çok kullanılan absorbentlerdir (Pichon, 2000).

1.8.4 Katı-Faz Mikro Ekstraksiyonu (SPME)

Katı-faz mikro ekstraksiyonu ilk kez Pawliszyn ve çalışma arkadaşları tarafından önerilmiştir ve geliştirilmiştir (Belardi and Pawliszyn, 1989; Eisert et al., 1996). En temel izolasyon metotlarından olan sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sokslet ekstraksiyonu, uygulaması zaman alıcı ve çok miktarda organik çözücü gerektirmesinden dolayı, daha basit ve ekonomik bir yöntem olan katı-faz mikro ekstraksiyon tekniği geliştirilmiştir. Katı-faz mikro ekstraksiyon yöntemi iki adımda uygulanır (Fromberg et al., 1996; Eisert and Levsen, 1996). İlk adımda iğne ucuna sarılmış bir polimerik zarın sulu çözeltiye daldırılmasıyla analiz edilecek maddenin adsorpsiyonu ve ikinci aşamada da maddenin polimerik zarıdan ayrılarak GC'ye enjekte edilmesi şeklindedir. Polar olmayan bileşikler için üstün bir seçicilik gösteren polidimetil siloksan zarları bu amaçla kullanılan zarlardır. Müller et al. (1997), çevre örneklerindeki aromatik aminlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada katı-faz mikro ekstraksiyonu tekniği kullanarak çok düşük konsantrasyonda bulunan anilin ve kloroanilinleri tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma da Chang et al. (2003) tarafından yapılmıştır. Su örneklerindeki kanserojen aromatik aminleri tayin etmek için katı-faz mikro ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır.

1.8.5 İyon-Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi yöntemi sabit faz olarak kullanılan bir katı ile çözeltinin etkileşimi sayesinde, katı ile çözelti arasındaki iyonların değişimini temel almaktadır. Sentetik iyon değiştirici reçineler ilk olarak 1935 yılında üretilmiş ve laboratuvarlarda özellikle endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmıştır. Serbest amino asitlerin sulu ortamdan izole edilmeleri için uzun yılladır iyon değiştirme kromatografisi kullanılmaktadır (Kim et al., 1996). Gıda örneklerindeki biyojenik aminlerin belirlenmesinde kullanılan iyon değiştirme kromatografisi duyarlı ve kesin sonuç veren bir yöntem olarak bilinmektedir (Ababouch et al., 1986). Standara et al. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada peynirde bulunan histamin, putresin gibi biyojenik aminler iyon değiştirme kromatografisi kullanılarak düşük konsantrasyonlarda belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde yapılan deneysel çalışmalar sırasıyla verilmiştir ve ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve özellikleri belirtilmiştir.

2.1 KULLANILAN CİHAZLAR

2.1.1 Gaz Kromatografisi

UNICAM-610 marka GC-FID kullanılmıştır.

Kolon (sabit faz) : RSL 150, 30 metre, 0,25mm i.d., %100 dimetilpolisiloksan (apolar) kapiler kolon, 0,3 µm film kalınlığı

Sıcaklık programı : 70 °C (5 dak), 4 °C/dak, 300 °C (10dak)

Enjektör bloğu sıcaklığı (130 °C)

Dedektör bloğu sıcaklığı : 280 °C

Uygulanan enjeksiyon miktarı : 0,5-1 µL

2.1.2 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi (GC-MS)

FINNIGAN marka 800 seri GC-MS kullanılmıştır.

Kolon : 60 metre, DB5, apolar kolon

Sıcaklık programı: 70 °C (1dak), 4 °C/dak, 300 °C (10dak)

Enjektör bloğu sıcaklığı : 130 °C, iyon kaynağı sıcaklığı : 170 °C

Tarama aralığı ve oranı : 50-100 m/z ve 1 tarama/saniye

İyonlaşma voltajı ve akımı : 70 eV ve 350 µA

2.1.3 pH Metre

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

2.1.4 Ultrasonik Banyo

Türetme ve ekstraksiyon işlemlerinde *ELMA* marka zaman ayarlı ultrasonik banyo kullanılmıştır.

2.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

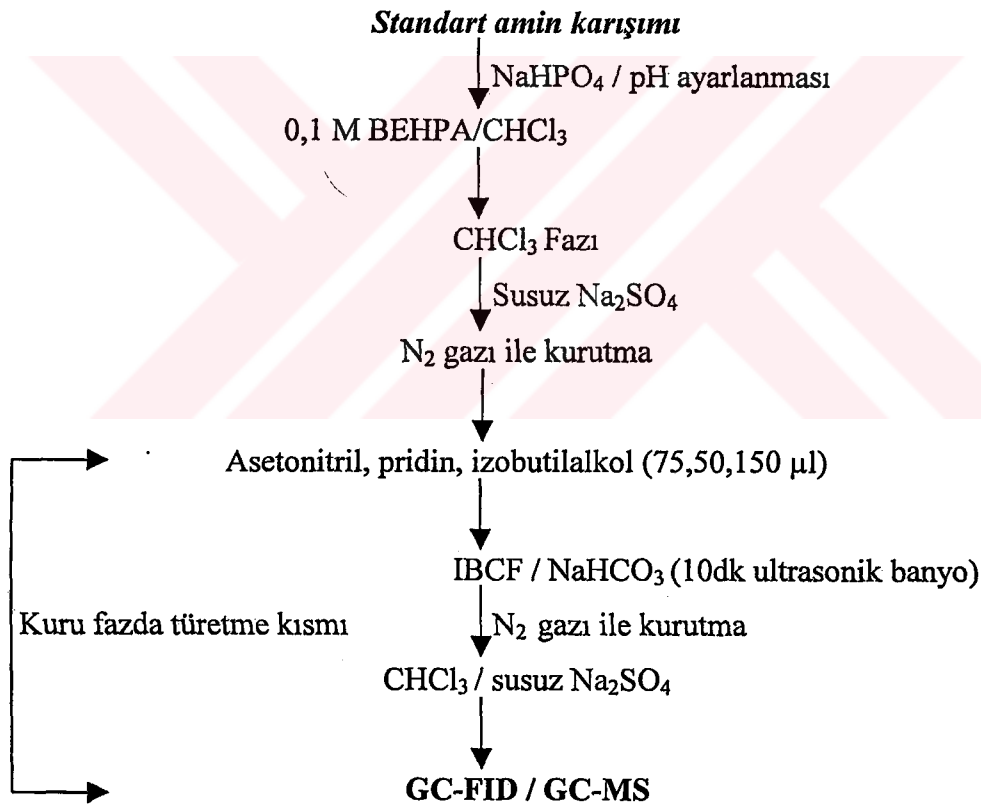
Zonguldak bölgesinden deniz suyu, nehir suyu ve dip çamuru örnekleri toplanarak analizleri yapıldı. İdrar örnekleri 30-35 yaşları arasında yaklaşık 10 yıldır saç boyası kullanan, 15 yıldır da sigara içen ve kızarmış gıdalar tüketen iki bayan ile hiç saç boyası kullanmamış ve sigara içmemiş bir bayandan ve prostat kanseri teşhisi konulan, yaklaşık 30 yıldır sigara içen, kızarmış et ürünlerini fazlaca tüketen bir erkekten alınıp buz dolabında (-20 °C) renkli cam şişelerde analiz zamanına kadar muhafaza edilmiştir. Genellikle idrar örnekleri analiz gününden bir gün önce ve sabah ilk idrar olarak alınmıştır. Su örnekleri renkli şişeler ile, özellikle deniz suyu numuneleri dibe yakın yerlerden alındı ve nehir suları da suyun durgun olduğu yerlerden toplanarak analiz zamanına kadar buzdolabında saklandı. İdrar örneklerindeki sözkonusu aminlerin birkaç saat içerisinde bozuncakları bilindiğinden; alınan örnekler bozunmanın engellenmesi için asitlendirilerek analiz zamanına kadar buzdolabında saklanmıştır.

Dip çamuru örnekleri ise Acılık Deresinin başlangıç ve orta bölümlerinden olmak üzere 2 farklı yerden alınmıştır. Bu örnekler doğrudangüneş ışınından uzak, oda sıcaklığında kurutularak öğütülüp toz haline getirildi. Analiz edilecekleri güne kadar renkli şişeler içerisinde buzdolabında saklandı.

2.3 DENEYSEL İŞLEMLER

2.3.1 Aminlerin Sulu Çözeltiden İzolasyonu ve Analizi

Bu çalışmada önerilen metodun uygulanabilirliğinin tespit edilmesi ve optimizasyonu için sözkonusu standart aminlerin sulu çözeltileri hazırlanarak ilgili aminler iyon çifti ekstraksiyonu tekniği ile organik faza alınıp IBCF ile GC-FID ve GC-MS analizleri için izobütoksikarbonil (izo(BOC)) türevlerine dönüştürülmüşlerdir. Bu şekilde her basamağı optimize edilen metot daha sonra alifatik ve aromatik aminlerin belirlenmesi için değişik çevre örnekleri ve biyolojik sıvılara uygulanmıştır. Metodun uygulanışı şematik olarak Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



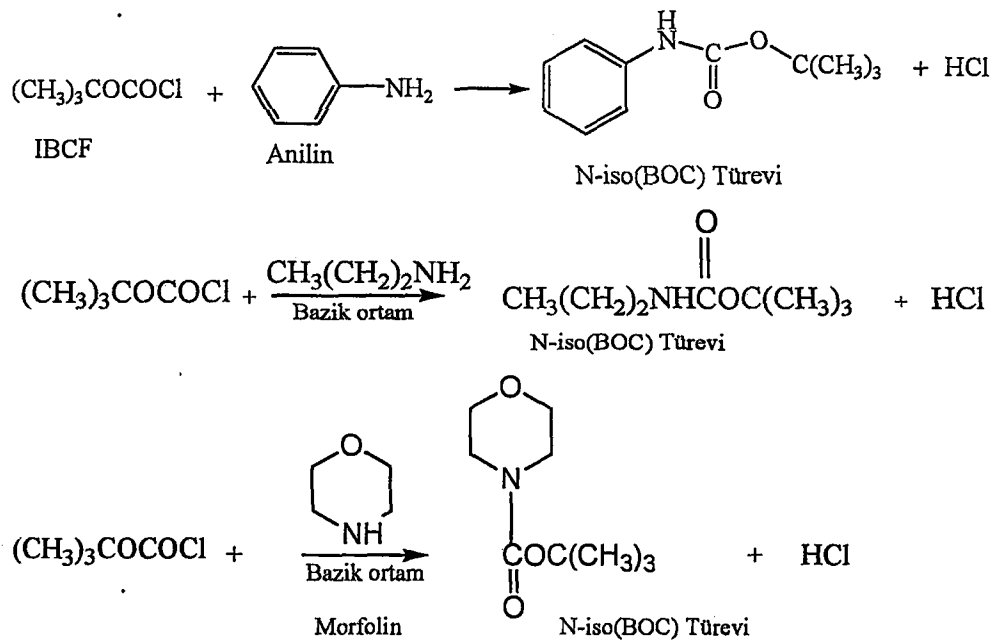
Şekil 2.1 Standart amin karışımının BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonundan sonra kuru fazda türetme ile GC-FID ve GC-MS’de belirlenmesi.

Metot kısaca; analiz edilecek numunenin içerisinde aminlerin iyon çifti reaktifi içeren organik bir çözücü ile alınması ve bu çözücünün azot gazı altında uçurularak kalan kalıntının veya direkt olarak alınan standart aminlerin, sırasıyla asetonitril, pridin ve

izobutilalkol (2:1:3) ile çözölüp IBCF reaktifi ilavesi ve sodyumbikarbonat (NaHCO₃) ile tamponlanmasından sonra oluşın izo(BOC) türevlerinin kloroform fazına alınarak GC-FID ve GC-MS ile analizleri işlemlerini içermektedir. Bu çalışmada aminlerin izo(BOC) türevleri kloroform fazına alınıp hacmi 500 µL ayarlanarak GC'ye 1µL enjekte edilmiştir ve GC analizlerinde hep aynı hacimler kullanılmıştır.

2.3.2 Standart Aminlerin Gaz Kromatografisinde Alıkonma Zamanlarının Tespit Edilmesi

Standart olarak kullanılan alifatik ve aromatik aminlerin GC'de alıkonma zamanlarının belirlenmesi için her amin bileşğinin önce kloroform içerisinde konsantre çözeltileri hazırlanmış ve daha sonra gerekli seyretmeler yapılarak her birinin 10⁻⁴ ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir standart amin çözeltilisinden bilinen miktarlarda alınıp azot gazı altında çözücüsü uçurularak ayrı ayrı IBCF ile türetilmiştir. İlgili aminin izo(BOC) türevi kloroform fazına alınıp sodyum sülfat üzerinden geçirilerek tekrar azot gazı altında istenilen hacime kadar uçurulup GC-FID ile analizleri yapıldı ve alıkonma zamanları tespit edildi. Bu çalışmada kullanılan standart aminlerin alıkonma zamanları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Sözkonusu aminlerin IBCF ile türetme reaksiyonları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 Anilin, propilaminin ve morfolinin IBCF ile reaksiyonu.

2.3.3 Standart Amin Karışımının Türetilmesi

Standart aminlerin 10^{-4} ppm'lik çözeltilerinin her birinden bilinen miktarlarda alınıp karıştırılmış ve yukarıda açıklandığı gibi çözücüsü uçurularak kalıntı türetilmiş ve ilgili türevler kloroform fazına alınarak standart amin karışımı olarak kullanılmak üzere önce GC-FID daha sonra da GC-MS analizleri yapılmıştır. Standart amin karışımlarının GC-FID ve GC-MS kromatogramları Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir. GC-FID kromatogramı üzerindeki her bir standarta ait pik belirlenen alıkonma zamanları kullanılarak ayrıca kütle spektrumları yorumlanarak belirlenmiştir. Bu şekilde alıkonma zamanları ve kütle spektrumla ile belirlenen yapılardan yararlanılarak çevre ve biyolojik sıvı örneklerindeki madde yapıları aydınlatılmıştır.

2.3.4 Standart Aminlerin Ekstraksiyon İçin pH Grafiklerinin Çizilmesi

Bu çalışmada önerilen metotda kullanılan iyon çifti ekstraksiyon tekniğinde ortamın pH'sının çok önemli olduğu bilindiğinden belirlenmesi istenen her bir amin için değişik pH'larda ekstraksiyon yapılarak; pik alanlarına karşı grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden de her biri için optimum pH tespit edilmiştir. Her bir amin için çizilen grafikler Şekil 2.3'de gösterilmiş olup bu grafiklerin elde edilmesindeki yol aşağıda anlatılmıştır.

Bunun için önce 18 tane amin standartının her birinin stok çözeltileri kullanılarak 10^{-5} ppm'lik sulu çözeltileri hazırlanmış ve daha sonra her birinden belirli hacimler alınıp değişik pH'larda ekstrakte edilip daha önce belirlenen şekilde GC-FID analizleri yapılmıştır. Her bir pH değeri için elde edilen pik alanları belirlenerek; pik alanlarının pH değerlerine karşı grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden yararlanılarak BEHPA ile iyon çifti ekstraksiyonu için optimum pH değerleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada pH grafiklerinden yararlanılarak amin karışımı için en uygun ekstraksiyon pH'sı 8 olarak seçilmiştir. Ayrıca metot için seçilen pH'da (pH=8) kalibrasyon eğrilerlerinden yararlanılarak her bir amin için % geri kazanım değerleri tespit edilmiştir.

2.3.5 Standart Aminlerin Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi

Standart aminlerin kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için 0.1mg hassasiyete sahip terazi kullanılarak standart aminlerin her birinden bilinen miktarlarda alınıp kuru fazda türetme işlemi yapılmıştır. Türetme işleminden sonra kloroform fazına alınan amin türevlerinin konsantrasyonları gerekli seyreltmeler yapılarak 10^{-1} ve 10^{-6} ppm arasındaki 7 farklı konsantrasyona ayarlanıp GC analizleri yapılmıştır.

Bu işlemler her bir standart için en az 7 farklı değerde ve her işlem aynı olacak şekilde 3'er kere tekrarlanarak her bir standart için elde edilen pik alanı değerlerinin konsantrasyonlarına karşı kalibrasyon grafikleri çizildi. Çalışmadaki diğer konsantrasyon değerleri bu grafiklerin ekstrapolasyonu, bu değerlerde elde edilen pik alanları ve bunların karşılaştırılması ile tespit edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de verilmiştir.

2.3.6 Geliştirilen Metodun Algılama Limitinin Belirlenmesi

Her birinin konsantrasyonu 10^{-2} ppm olacak şekilde hazırlanan metilamin, dipropilamin, morfolin, histamin, anilin ve 1,2-fenilendiamin bileşikleri gerekli seyreltmeler yapılarak her biri için 10^{-5} - 10^{-10} ppm arasında değişik çözeltileri hazırlanmıştır. Önerilen metot kullanılarak değişik konsantrasyonlardaki aminlerin analizleri GC ile yapılarak en düşük algılanabilen değerler 1,2-fenilendiamin için 10^{-5} ve 1,3-diaminobütan için 10^{-6} ve diğer tüm aminler için 10^{-8} ppm olarak belirlenmiştir.

2.3.7 Dere Suyu Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi

Zonguldak Acılık deresinden derenin durgun olan kısmından 500 mL dere suyu örneği alındı. Örnek 1M HCl ile asitlendirilerek soğuk ortamda analiz gününe kadar saklanmıştır.

500 mL'lik Dere suyunun 250 mL'si, içindeki küçük parçacıkların giderilmesi için beyaz süzgeç kağıdından süzülmüştür. Süzme işleminden sonra 1M HCl ile pH=1'e getirilerek 3 mL kloroform ile 3 kez çalkalanmıştır. Kloroform fazı sulu kısımdan ayrılarak atılmıştır. Geriye kalan sulu kısmın pH'sı 1M Na_2HPO_4 tampon çözeltisi ilave edilerek 8'e getirilerek

ve bu sırada sulu kısımda oluşan beyaz çökelek bu kısımdan tekrar süzülerek uzaklaştırılmıştır. pH'sı 8 olan sulu faz, BEHPA'nın 4'er mL'lik kloroform çözeltisi ile 3 kez iyon-çifti ekstraksiyonu yapılmıştır. Ayırma hunisi ile kloroform fazı sulu kısımdan ayrılmıştır. Bundan sonra kloroform fazı susuz sodyum sülfat (Na_2SO_4) üzerinden geçirilerek azot gazı ile tamamen kurutulmuştur. Kuru kısım üzerine sırasıyla; asetonitril, piridin ve izobutilalkol (300, 200, 600 μL) eklendi. 10 dk ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra türetme reaktifi 500 μL IBCF eklenerek ve hemen ardından 1mg NaHCO_3 eklenmiştir. 5 dk ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. IBCF-amin türevleri kloroform ile ekstrakte edilerek susuz Na_2SO_4 ile kurutulmuş ve kloroform fazı alınmıştır. Kloroform hacmi 500 μL 'ye kadar uçurularak bunun 1 μL 'si GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.3.8 Deniz Suyu Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi

Zonguldak limanından 500 mL deniz suyu örneği alındı ve 1M HCl ile asitlendirilerek soğuk ortamda saklanmıştır.

500 mL'lik Deniz suyunun 250 mL'si, içindeki küçük parçacıkların ayrılması için süzölmüştür. Süzme işleminden sonra 500 mL lik bir behere alınan su örneğinin pH'sı HCl ile 1'e getirilmiştir. Daha sonra 3 mL kloroform ile 3 kez çalkalanarak kloroform fazı sulu fazdan alınarak atılmıştır. Böylece deniz suyunda bulunan hümkik asit türünden bazı büyük moleküllü asitler ayrılmış olmaktadır.

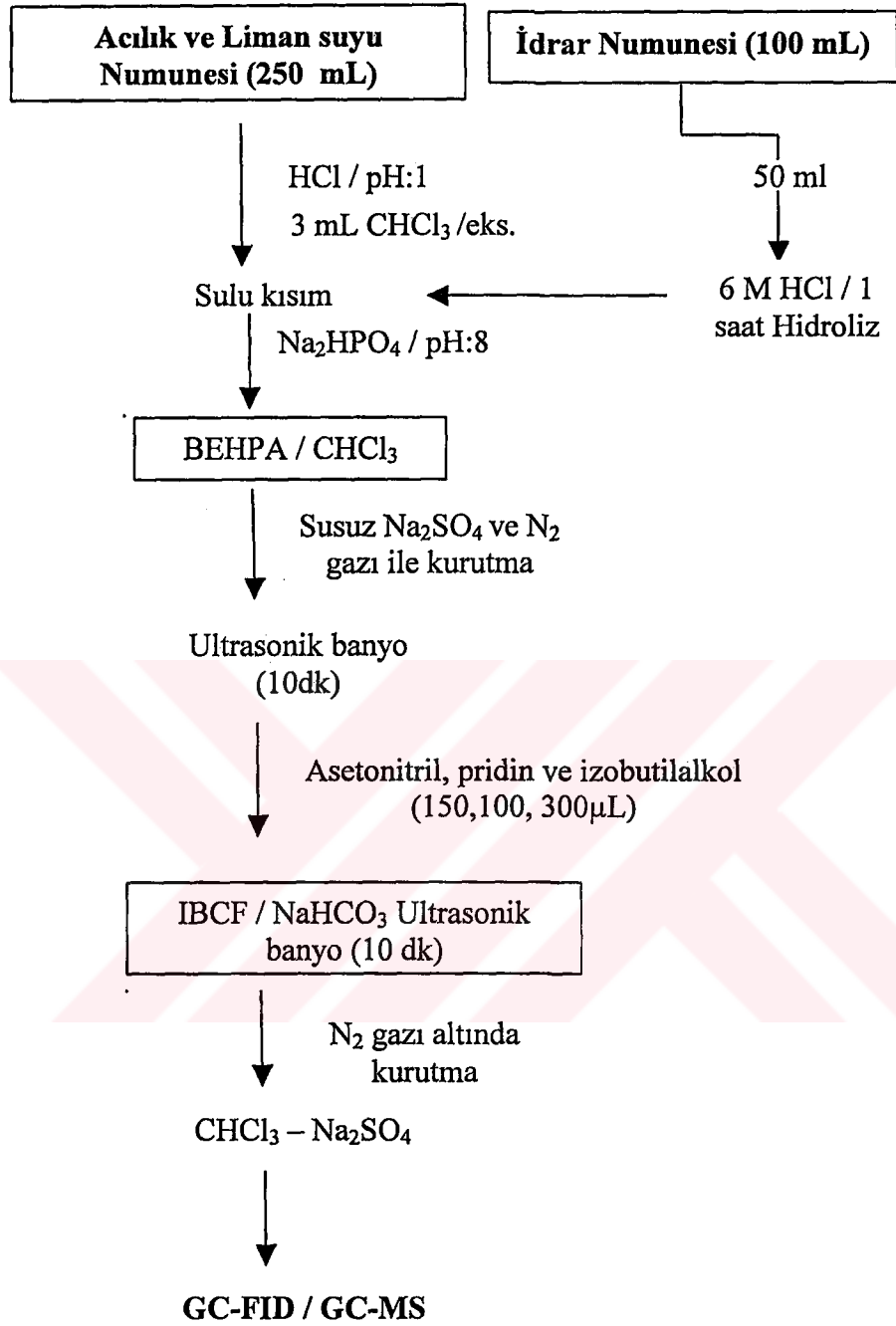
Deniz suyu numunesinin pH'sı tekrar 1M Na_2HPO_4 tampon çözeltisi ilavesiyle 8'e ayarlanarak oluşan beyaz çökelek ayrıldıktan sonra 4mL BEHPA içeren CHCl_3 ile 3 kez ekstraksiyon yapılmıştır. Kloroform fazı alınarak susuz Na_2SO_4 ile kurutulduktan sonra azot gazı (N_2) altında kurutularak ve sırasıyla asetonitril, piridin ve izobutilalkol (300, 200, 600 μL) eklenerek 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çözelti karışımı üzerine 500 μL IBCF eklendi ve 1 mg NaHCO_3 ilave edilerek tekrar 5 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Söz konusu aminlerin IBCF türevleri 1 mL kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Santrifüjlenerek ayrılan kloroform fazı susuz Na_2SO_4 ile kurutularak hacmi 500 μL olana kadar azot gazı ile uçurulmuş ve söz konusu aminleri içeren kloroform fazının 1 μL 'si GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

2.3.9 İdrar Numunelerindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi

İdrar numunesi sabah yapılan ilk idrar olup numune -20 °C'de ve 10 mL 1M HCl ile asitlendirilerek renkli şişelerde saklanmıştır.

İdrarB numunesi iki kısma ayrılarak bunlardan birisi direk ekstrakte edilirken 2. kısım ise asit ile hidroliz edildikten sonra aynı şekilde izole edilerek analizleri yapılmıştır ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İlk kısımda 50 mL idrar numunesi alınarak pH'sı 10M HCl ile 1'e ayarlanarak 3mL kloroform ile 3 kez ekstraksiyon yapılmıştır. Kloroform fazı atılarak sulu kısım tekrar behere alınıp pH'sı 1M Na₂HPO₄ tampon çözeltisi ilavesiyle 8'e ayarlanmıştır. Sulu fazda oluşan beyaz çökelek süzülerek ayrıldıktan sonra, 4 mL BEHPA içeren CHCl₃ ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Kloroform fazı susuz Na₂SO₄ ile kurutularak azot gazı altında çözücü kısmı tamamen uçurulmuştur. Kuru kalıntı daha önce belirtilen şekilde IBCF ile türetilerek oluşan IBCF türevleri tekrar kloroform fazına alınarak hacmi 500 µL'ye ayarlandıktan sonra 1 µL içerisindeki aminlerin izo(BOC) türevleri GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir.

İkinci kısımda 50 mL idrar numunesi 10 mL 6M HCl ile 1 saat 80 °C'de ısıtılarak hidroliz edilmiştir. Hidrolizden sonra su fazının üstünde oluşan yağimsı tabaka sulu fazdan ayrılarak pH'sı 1'e ayarlandı ve 3'er mL kloroform ile 3 kez ekstrakte edilerek kloroform fazı ayrılmıştır. Sulu fazın pH'sı tekrar fosfat tamponu ile 8'e ayarlanıp 4 mL BEHPA içeren kloroform ile ekstrakte edilmiştir ve kloroform alınarak susuz Na₂SO₄ ile kurutulup N₂ altında tamamen çözücü kısmı uçurulmuştur. Kuru kalıntı yukarıda belirtilen şekilde türetilerek kloroform fazına alınan aminlerin analizleri GC-FID ve GC-MS ile yapılmıştır. İdrarB numunesinin hem hidroliz edilmeden hem de hidroliz edilerek alınan GC-FID ve GC-MS sonuçlarına bakılarak hidroliz işlemi ile belirlenen aminlerin konsantrasyonunun ve çeşitliliğinin arttığı belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı diğer tüm idrar numuneleri hidroliz işlemi yapılarak türetilmiştir. Deniz suyu, dere suyu ve idrar örneklerinin analizleri şematik olarak Şekil 2.3.'de verilmiştir.

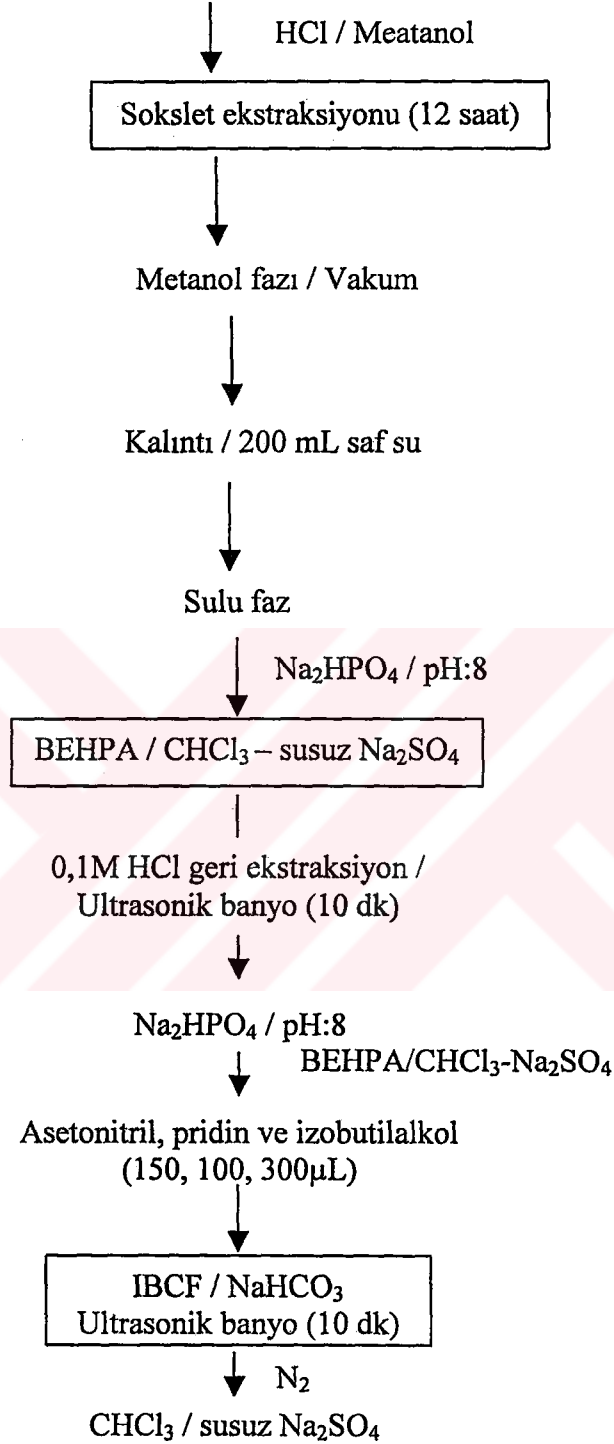


Şekil 2.3. Deniz suyu, dere suyu ve idrar örneklerindeki alifatik ve aromatik aminlerin iyon çifti ekstraksiyonu ve GC-MS analizlerine ait akım şeması.

2.3.10 Acılık Deresi Dip Çamuru Örneğindeki Alifatik ve Aromatik Aminlerin Belirlenmesi

Acılık deresinde özellikle suyun durgun olduğu kısımdan alınan yaklaşık 100g dip çamuru açık havada güneş ışınlarına maruz bırakılmaksızın kurutulmuş ve öğütülerek buzdolabında saklanmıştır. Öğütülmüş kısımdan 35g alınarak 10 mL 0,1M HCl ile asitlendirilmiş 200 mL metanol ile 12 saat sokslet ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyondan sonra metanol kısmı alınarak vakum altında (25 °C'de) kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kalıntı kısmı 250 ml saf su ile çözülüp pH'sı 1'e getirilmiştir ve 3mL'lik kısımlar halinde kloroform ile yeşil renk kayboluncaya kadar çalkalanarak kloroform fazı atılmaktadır. Bu işlemde sonra geriye kalan sulu fazın pH'sı fosfat tamponu ile 8'e ayarlanmakta, oluşan beyaz çökelek uzaklaştırılmaktadır ve sulu faz 4 mL BEHPA içeren kloroform ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Kloroform fazı alınarak susuz Na₂SO₄ üzerinden geçirilerek azot gazı altında tamamen kurutulmuştur. Kuru kalıntı IBCF ile türetilmekte ve 1mL kloroforma alınan IBCF-amin türevleri 1µL enjekte edilerek GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Öğütülmüş kısımdan alınan ikinci 35 g'lık dip çamuru numunesinin aynı şekilde sokslet ekstraksiyonu yapılarak metanol fazı kurutulup kalıntı sulandırılarak pH'sı Na₂HPO₄ tampon çözeltisi ilavesiyle 8'e ayarlandı ve 4'er mL BEHPA'ın kloroform çözeltisi ile 3 kez ekstrakte edilmiştir. Toplanan kloroform fazı 15mL 0.1M HCl çözeltisi ile sözkonusu aminlerin izolasyonu için 10 dk ultrasonik banyoda bekletilerek ekstrakte edilmiştir. Bu şekilde tekrar sulu faza geri ekstrakte edilen aminler; sulu fazın pH'sı fosfat tamponu ile 8'e ayarlanıp oluşan beyaz çökelek ayrıldıktan sonra BEHPA'ın kloroform çözeltisi ile 3 kere 4'er mL'lik kısımlar halinde ekstrakte edilerek tekrar kloroform fazına alınmıştır. Toplanan kloroform fazı sodyum sülfat üzerinden geçirilerek azot gazı altında kurutulmakta ve sırasıyla kalıntıya asetonitril, pridin ve izobutil alkol (300, 200, 600 µL) ilave edilerek kalıntının çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmektedir. Bu karışım üzerine 500 µL IBCF ve 1g NaHCO₃ ilave edilerek tekrar 5 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Bu şekilde türetilen aminlerin IBCF türevleri 1 mL kloroforma alınarak susuz sodyum sülfat ile kurutuldu ve hacmi 500 µL olana kadar azot gazı altında buharlaştırılmıştır. Alifatik ve aromatik aminlerin IBCF türevlerini içeren bu kloroform fazının 1 µL'si GC-FID ve GC-MS'e enjekte edilerek analizleri yapılmıştır. Şekil 2.4'de yukarıda deneysel kısmı anlatılan dip çamuru örneğinin analizinin akım şeması verilmiştir. İki farklı yöntemle analizi yapılan dip çamuruna ait sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Dip Çamuru örneği



GC-FID / GC-MS

Şekil 2.4 Dip çamuru örneğindeki amin bileşiklerinin iyon çifti ekstraksiyonu ve GC-FID / GC-MS analizlerine ait akım şeması.

BÖLÜM 3

DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Çevre ve idrar örneklerinde çok düşük konsantrasyonlarda bulunan alifatik ve aromatik aminlerin GC-FID ve GC-MS’de belirlenebilmeleri için ilk olarak bu maddelerin ortamdan seçici olarak izole edilmeleri ve aynı zamanda konsantre edilmeleri gerekmektedir. Öncelikle çevre ve idrar örneklerinde bulunabilecek aminler tespit edilerek ilgili standartlar ile metot optimize edilmiştir. Optimize işlemi; standartların türetilmesi ve alıkonma zamanlarının GC-FID’de belirlenmesi, düşük konsantrasyonlarda (10^{-1} - 10^{-6}) her bir standart için kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi ve iyon çifti ekstraksiyonu için en uygun pH değerinin her bir standart amin için belirlenmesini içermektedir. Ayrıca sulu ortamdan ekstrakte edilen amin standartlarının pik alanı değerleri ile karşılık geldiği kalibrasyon grafiklerindeki pik alanı değerleri karşılaştırılarak her bir amin standardı için iyon çifti ekstraksiyonun % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca en düşük algılama sınırının belirlenmesi için 10^{-5} - 10^{-10} ppm’lik çözeltilerin analizleri, ayrı ayrı standartize edilmiş metot ile yapılmıştır ve bu değer bir çok amin için 10^{-8} ppm olarak tespit edilmiştir.

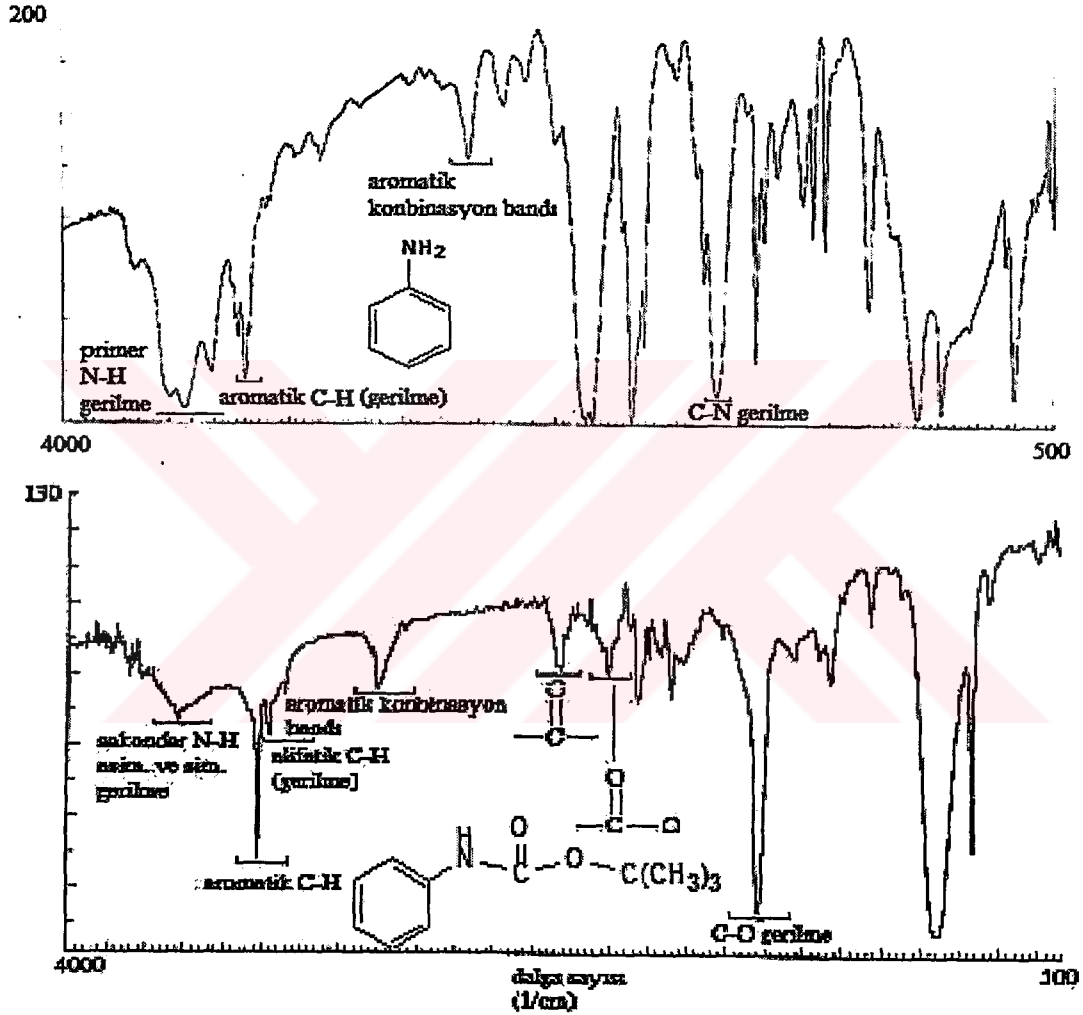
Bu çalışmada önerilen metot alifatik ve aromatik aminlerin analizleri için değişik çevre örnekleri ve idrar örneklerine uygulanmış olup sözkonusu aminlerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar literatürde geçen benzer çalışmalarla karşılaştırılmış ve metodun üstünlükleri sonuçlar ve değerlendirme kısmında verilmiştir.

3.1 DENEYSEL SONUÇLAR

3.1.1 Standart Aminlerin Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi

Standart olarak kullanılan her bir amin belirli miktarlarda alınarak IBCF ile türetilip kloroformda çözülmüş ve GC’ye her biri ayrı ayrı enjekte edilerek alıkonma zamanları belirlenmiştir. Standartların alıkonma zamanları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Standartların

türetme reaksiyonlarının veriminin hesaplanması amacıyla standartların türetme reaksiyonlarından önce ve türetildikten sonra IR spektrumları alınmış ve $-NH$, $-NH_2$ fonksiyonel gruplarına ait piklerin kaybolma oranları hesaplanmıştır. IR spektrumlarında $-NH$ ve $-NH_2$ piklerinin kaybolması söz konusu aminlerin yaklaşık tamamının türediğini göstermektedir. Örnek olarak anilinin türetmeden önce ve sonra alınan IR spektrumları Şekil 3.1’de verilmiştir.



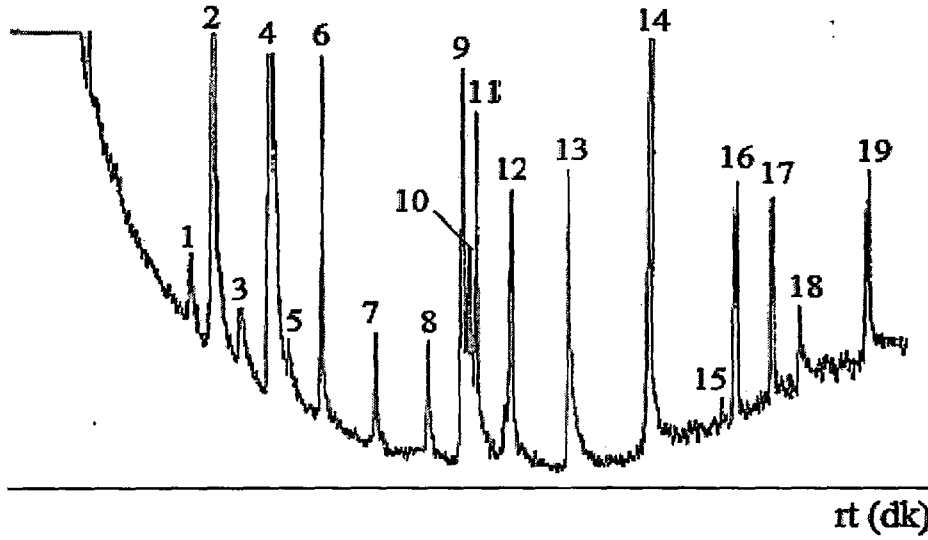
Şekil 3.2 Anilin ve Anilin-izo(BOC) türevinin çözümlenmiş IR spektrumları.

Spektrumlardan da görüldüğü gibi anilinin IBCF ile reaksiyonu sonucu oluşan türevdeki en belirgin değişim primer $-NH_2$ 'deki hidrojenin birisi tütüyerek bu grubun sekonder $-NH$ dönüşmesidir. Anilinin IBCF türevinin spektumunda keton grubu ve eter fonksiyonel grupları anilinin spektrumundan farklı olarak ortaya çıkmaktadır. Alifatik $-C-H$ grupları da oluşan türevin belirgin farklı fonsiyonel gruplardandır.

Çizelge 3.1 Standart aminlerin GC-FID’de alıkonma zamanlarının belirlenmesi.
Deney sayısı : 5 dakika: dk

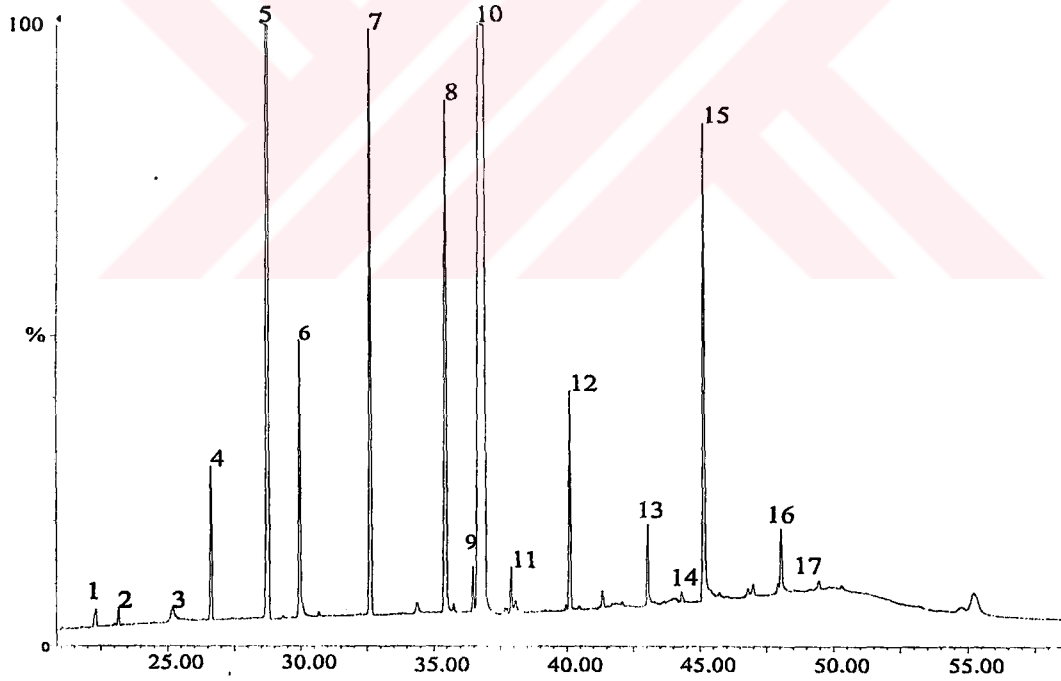
Standart Aminler	Alıkonma Zamanı (dk) (GC-FID)
Metilamin	16,42
Dipropilamin	18,25
Propilamin	19,20
Morfolin	21,23
Piperidin	21,86
Histamin	22,31
N-metilanilin	24,10
Anilin	26,90
Difenilamin	27,42
Benzilamin	27,69
Feniletilamin	28,68
p-Toluidin	29,67
Benzimidazol	31,72
4-Bromanilin	34,64
4-aminofenol	35,14
Piperazin	38,09
1-Naftilamin	39,53
1,4-Diaminobütan	41,66
1,2-Fenilendiamin	43,24

Alıkonma zamanları belirlendikten sonra standart amin karışımı türetilerek GC ve GC-MS kromatogramları alınmıştır. Şekil 3.2 kolon uzunluğu 30m olan GC-FID’de ve Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de kolon uzunluğu 60m olan GC-MS’de alınan kromatogramları verilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de kullanılan standart aminler aynı olmakla beraber ilk kromatogramda benzilamin ve 1,2-fenilendiamin bozunduklarından belirlenememişlerdir bununla birlikte ikinci kromatogramda feniletilamin bozunduğundan bu kromatogramda görülememektedir. Bu sebepten dolayı tüm standart aminlerin iki ayrı GC-MS kromatogramları gösterilmiştir.



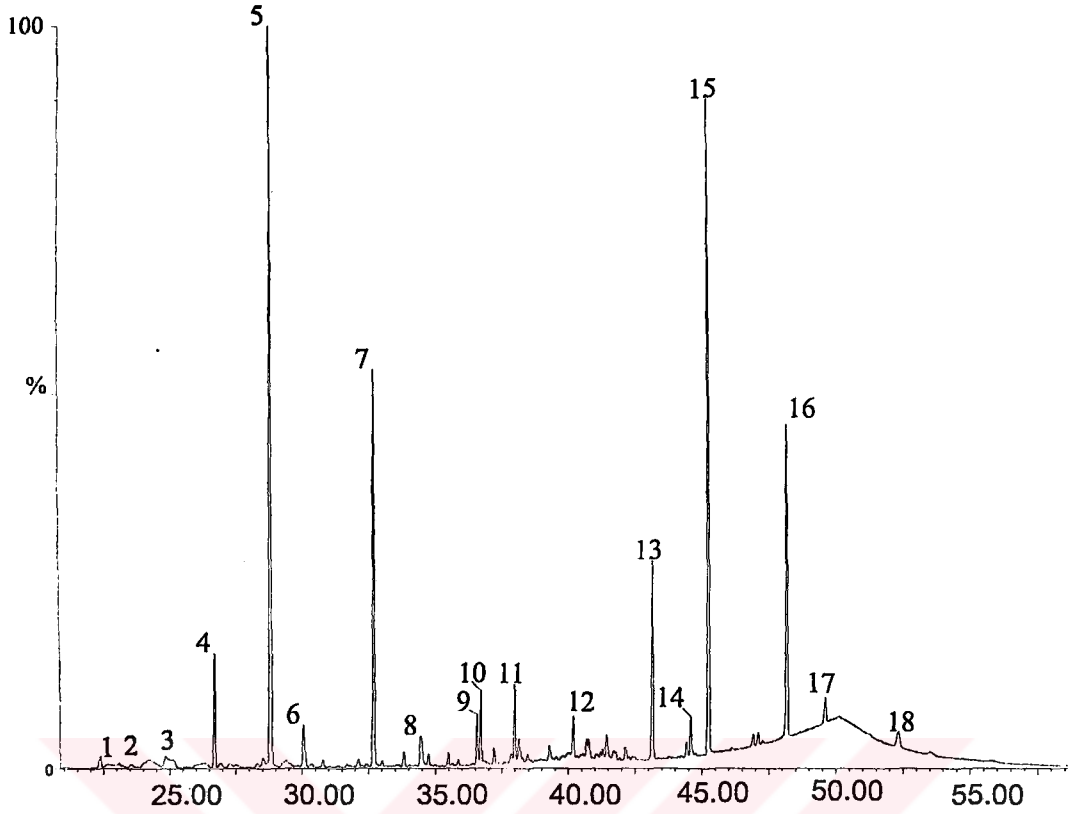
Şekil 3.2 Standart amin karışımının IBCF türevlerinin GC-FID kromatogramı.

1. Metilamin, 2. Propilamin, 3. Dipropilamin, 4. Piperidin, 5. Morfolin, 6. Histamin, 7. *N*-Metilanilin, 8. Anilin, 9. Difenilamin, 10. Benzilamin, 11. Feniletilamin, 12. Benzimidazol, 13. *p*-Toluidin, 14. Bromanilin, 15. 4-Aminofenol, 16. Piperazin, 17. 1-Naftilamin, 18. 1,4-Diaminopropan, 19. 1,2-Fenilendiamin



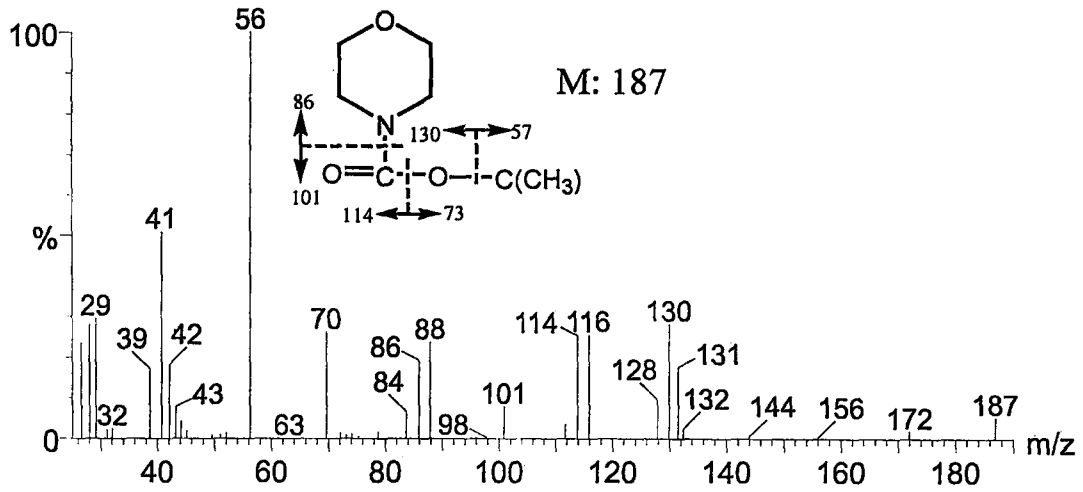
Şekil 3.3 Standart amin karışımının IBCF türevlerinin GC-MS kromatogramı (a)

1. Metilamin, 2. Dipropilamin, 3. Propilamin, 4. Piperidin, 5. Morfolin, 6. Histamin, 7. *N*-metilanilin, 8. Anilin, 9. Difenilamin, 10. Benzilamin, 11. *p*-Toluidin, 12. Benzimidazol, 13. 4-Bromanilin, 14. 4-Aminofenol, 15. Piperazin, 16. 1-Naftilamin, 17. 1,4-Diaminopropan,

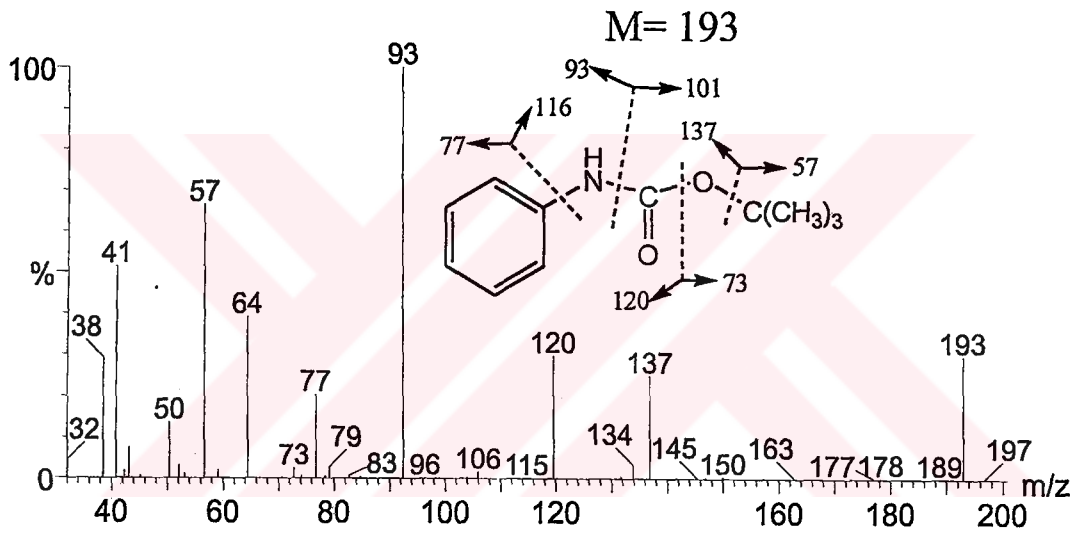


Şekil 3.4 Standart amin karışımının IBCF türevlerinin GC-MS kromatogramı (b)
1. Metilamin, 2. Dipropilamin, 3. Propilamin, 4. Piperidin, 5. Morfolin,
6. Histamin, 7. *N*-metilanilin, 8. Anilin, 9. Difenilamin, 10. Feniletilamin,
11. *p*-Toluidin, 12. Benzimidazol, 13. 4-Bromanilin, 14. 4-Aminofenol,
15. Piperazin, 16. 1-Naftilanin, 17. 1,4-Diaminopropan,
18. 1,2-Fenilendiamin.

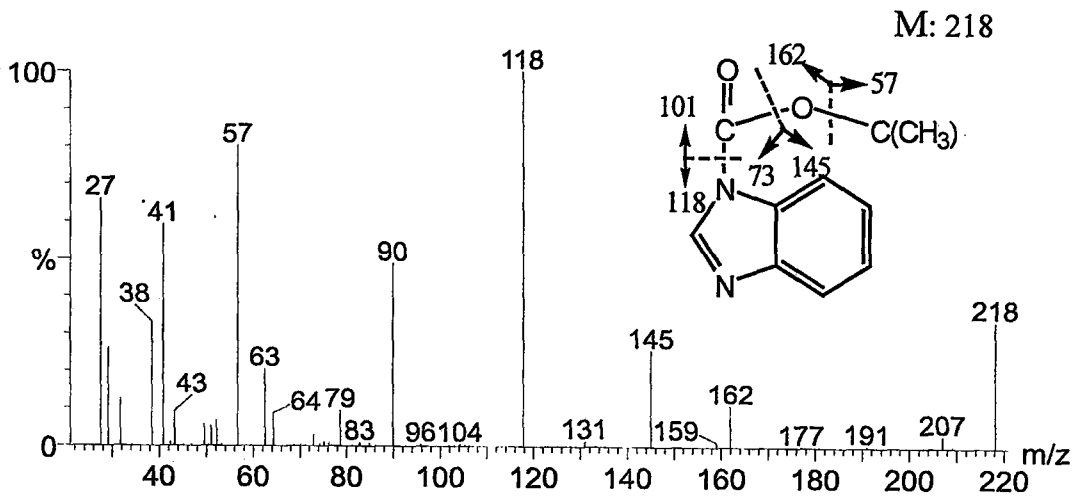
Primer aromatik aminlerde de alıkonma zamanı molekül ağırlığı ile doğru orantılıdır (Weiss et al., 2002). Standart aminlerin GC’de alıkonma zamanlarına bakıldığında düşük molekül ağırlıklı metilaminin en düşük alıkonma zamanına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte sekonder amin olan dipropilaminin tek hidrojenin de türemesi ve azot grubuna bağlı serbest hidrojenin kalmaması ile kolondan daha hızlı çıkmaktadır ki propilaminden daha düşük alıkonma zamanına sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.2, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de kromatogramları verilen standart aminlerin kütle spektrumları aşağıda verilmiştir.



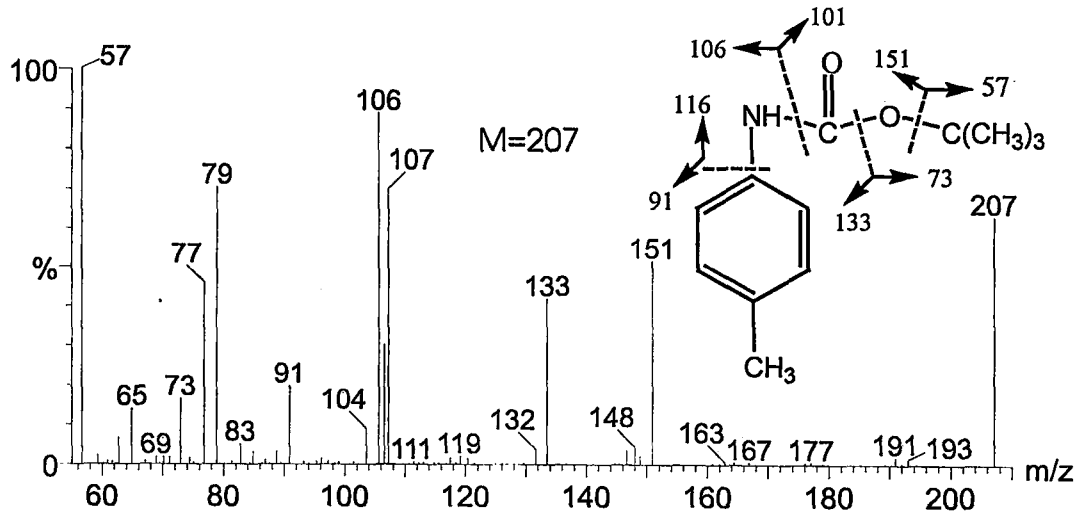
Şekil 3.5 Morfolin izobütoksikarbonil (izo(BOC)) türevinin kütle spektrumu.



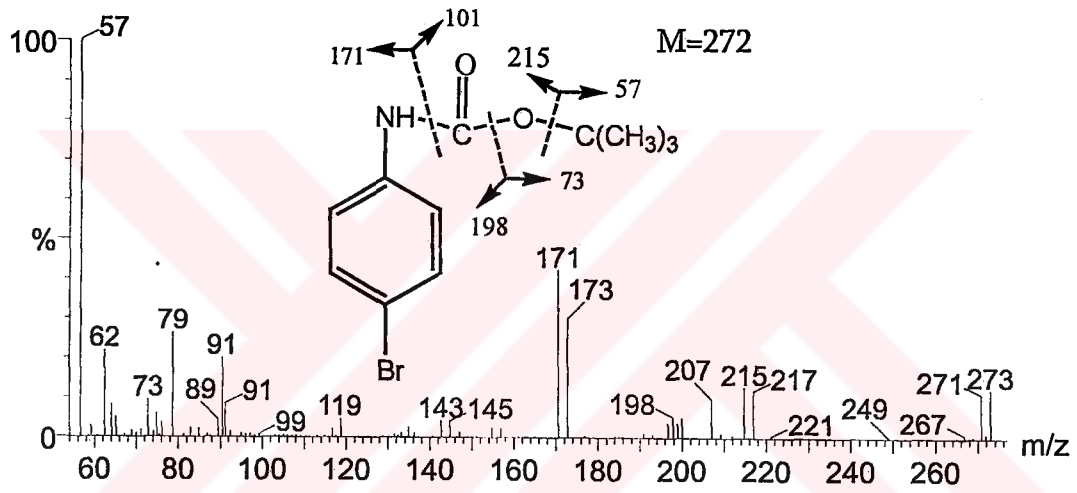
Şekil 3.6 Anilinin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu.



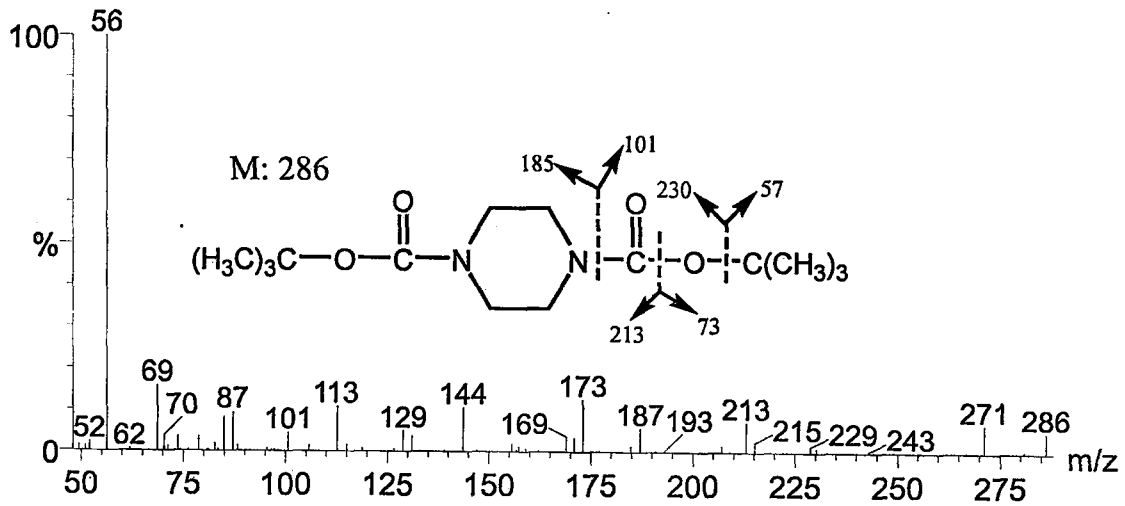
Şekil 3.7 Benzimidazol-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu



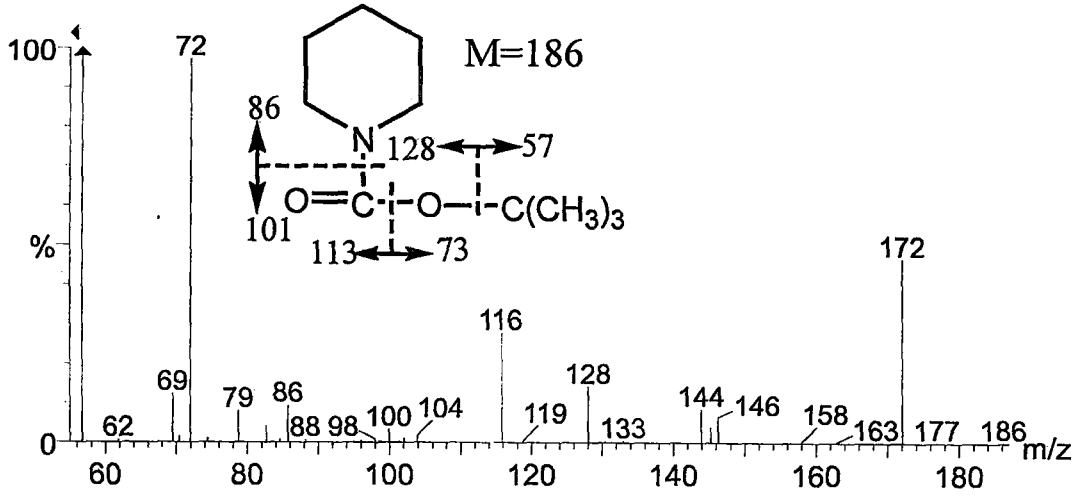
Şekil 3.8 *p*-Toluidin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu.



Şekil 3.9 4-Bromanilin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu.



Şekil 3.10 Piperazin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu.



Şekil 3.11 Piperidin-izo(BOC) türevinin kütle spektrumu.

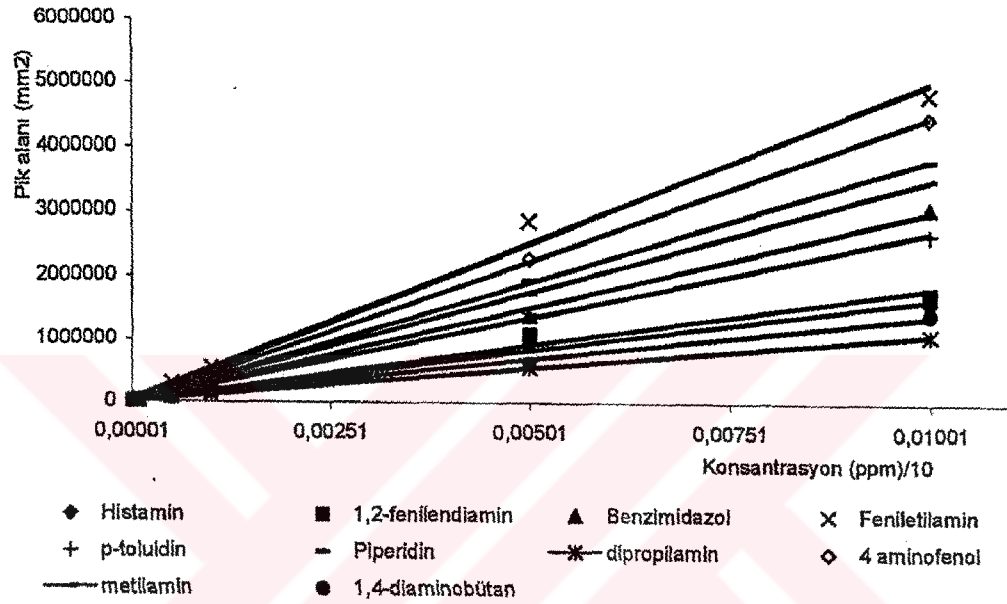
Çizelge 3.2’de yukarıda spektrumları verilen bazı standart aminlerin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül iyon piki (M^+) ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri verilmiştir. Kütle spektrumlarında şiddeti en fazla olan pik temel pik ve bileşiğin molekül kütlesine eşit olan pik ise M^+ piki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

Çizelge 3.2 Bazı standart aminlerin IBCF türevlerinin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri.

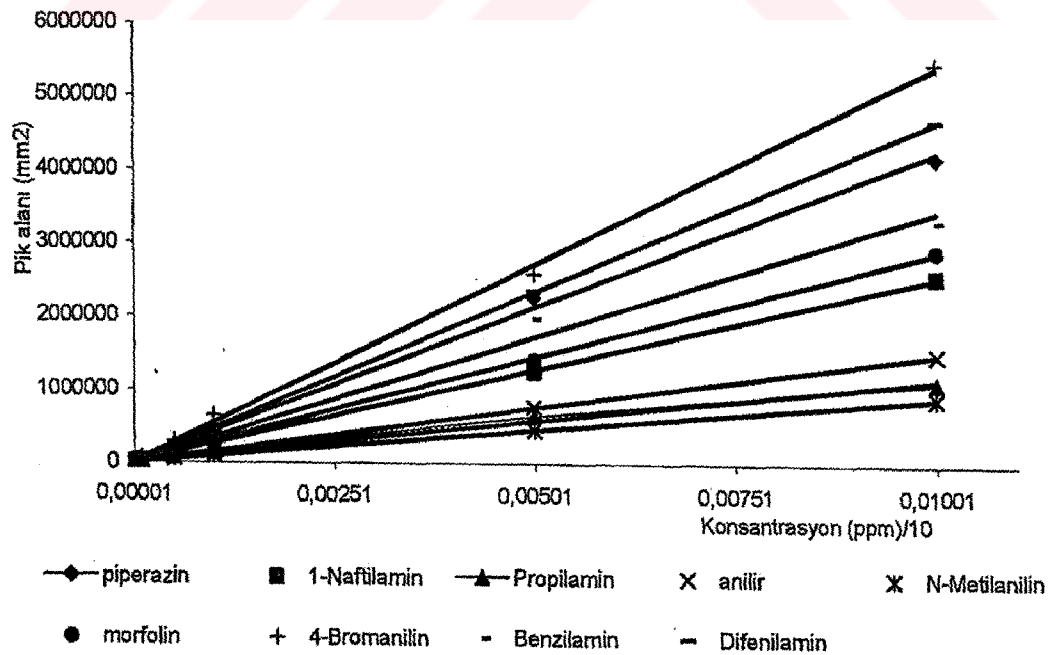
Aminler (IBCF türevleri)	Temel pik	Moleküler (M^+) piki	Diğer pikler	karakteristik
Morfolin	56	187	41, 130, 114, 86	
Anilin	56	193	77, 57, 120, 116	
Benzimidazol	118	218	57, 145, 162, 101	
<i>p</i> -Toluidin	56	207	106, 73, 133, 151	
Bromanilin	57	272	215, 198, 171, 73	
Piperazin	56	286	230, 213, 185, 73	
Piperidin	57	172	133, 113, 128, 72	

3.1.2 Standart Aminlerin Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi

Direkt hassas terazide tartımları yapılarak alınan standart aminler 1 mL kloroform içersine alınıp gerekli seyreltmeler yapılarak her biri 10^{-6} ppm olacak şekilde μL enjektörler ile ayarlanarak kuru fazda türetilmişlerdir. Her bir amin için GC'ye enjekte edilen miktar aynıdır. Şekil 3.12, Şekil 3.13'de kalibrasyon grafikleri ve Çizelge 3.2' de bu grafiklere ait denklemler ve r^2 değerleri verilmiştir.



Şekil 3.12 Standart aminlerin kalibrasyon eğrileri



Şekil 3.13 Standart aminlerin kalibrasyon eğrileri

Çizelge 3.3 Aminlerin kalibrasyon grafiklerine ait denklemler ve r^2 değerleri
[y: pik alanı (mm^2), x: Madde konsantrasyonu (ppm)].

Standart amin	r^2 değeri	Denklem	Standart amin	r^2 değeri	Denklem
Metilamin	0,9998	$y = 3\text{E}+08x$	p-Toluidin	0,9982	$y = 3\text{E}+08x$
Piperidin	0,9985	$y = 4\text{E}+08x$	Propilamin	0,9945	$y = 1\text{E}+08x$
Morfolin	0,9997	$y = 3\text{E}+08x$	Feniletilamin	0,9924	$y = 5\text{E}+08x$
N-Metilanilin	0,9997	$y = 9\text{E}+07x$	Benzilamin	0,9990	$y = 3\text{E}+08x$
Anilin	0,9998	$y = 2\text{E}+08x$	Piperazin	0,9985	$y = 4\text{E}+08x$
Difenilamin	0,9990	$y = 5\text{E}+08x$	1-Naftilamin	0,9985	$y = 3\text{E}+08x$
4-Bromanilin	0,9989	$y = 5\text{E}+08x$	Benzimidazol	0,9985	$y = 3\text{E}+08x$
Histamin	0,9990	$y = 2\text{E}+08x$	4-aminofenol	0,9992	$y = 4\text{E}+08x$
1,2-Fenilendiamin	0,9986	$y = 2\text{E}+08x$	Dipropilamin	0,9991	$y = 1\text{E}+08x$
1,4-Diaminobütan	0,9954	$y = 1\text{E}+08x$			

Pik alanlarına karşı konsantrasyonlar alınarak kalibrasyon eğrileri çizilerek bu grafiklerden standart olarak kullanılan 19 tane primer ve sekonder aminin korelasyon katsayısı (r^2) değerlerinin 0,9924 ile 0,9998 arasında olduğu tespit edilmiştir.

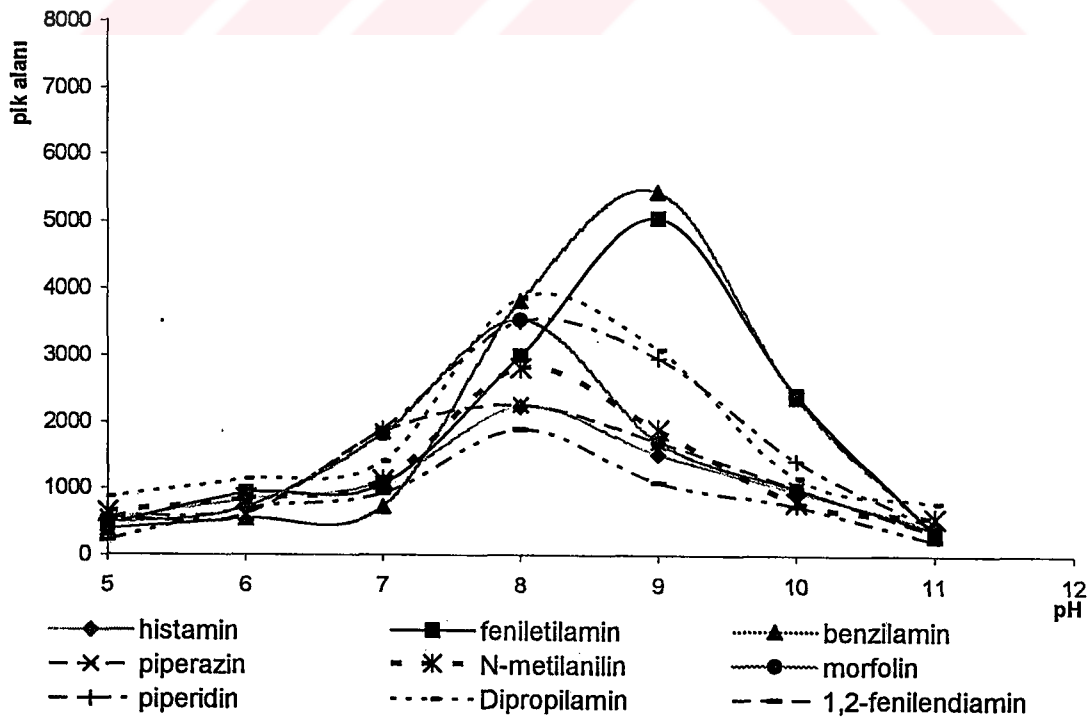
3.1.3 İyon Çifti Ekstraksiyonu İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Kromatografik analiz öncesinde farklı organik bazların ekstraksiyonu için kullanılan BEHPA'nın çok güçlü ve etkili bir iyon çifti reaktifi olduğu uzun süredir bilinmektedir (Casal et al., 2002). Bu çalışmada değişik çevre örneklerindeki çok düşük konsantrasyonlarda bulunan alifatik ve aromatik aminlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır ve bu konudaki diğer çalışmalarla kıyaslanabilecek etkili sonuçlar elde edilmiştir.

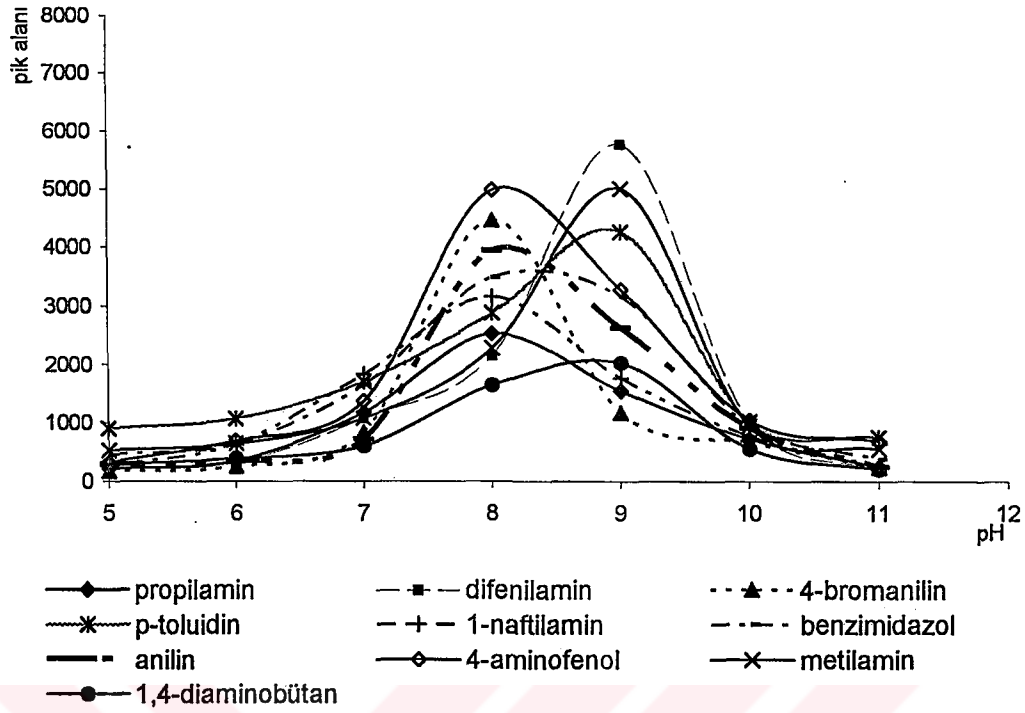
Standart aminlerin iyon çifti ekstraksiyonunda uygun pH değerlerinin belirlenmesi için her bir amin bileşiğinin konsantre (10^{-2} ppm) miktarları hazırlandı ve gerekli seyreltmeler yapılarak 100 mL 10^{-5} ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. 10^{-5} ppm konsantrasyonundaki çözeltilerin her biri için pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11'de olmak üzere 7

farklı pH değerinde iyon-çifti ekstraksiyonu uygulanıp daha sonra sulu çözeltiden kloroform fazına alınan her bir standart amin bileşiğinin kloroform fazları uçurulduktan sonra geride kalan kuru kısımlar IBCF ile türetilmiş ve 1mL kloroform ile türevler ekstrakte edilmiştir. Bu işlemler her bir pH değerinde tamamen aynı olacak şekilde yapılmış ve GC-FID' ye enjekte edilen miktarları da eşit alınmıştır. Enjeksiyon miktarı 1µL olup alınan miktar her pH değerinde aynı hassaslıktadır.

Her bir amin 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. Aynı zamanda tespit edilen optimum pH değerleri için okunan pik alanı değerleri 3.14'deki kalibrasyon grafiğinde yerine konularak bu pH değerlerinde amin standartlarının iyon çifti ekstraksiyonunda % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerden yola çıkarak çevre örneklerinde bulunması muhtemel alifatik ve aromatik aminlerde göz önünde bulundurularak örnek numunelerin analizlerinde kullanılacak en uygun pH değeri saptanmıştır. pH: 8 ve pH: 9 değerlerinde amin standartları maksimum pik alanını vermektedir. Seçilen en uygun pH değeri türetilen tüm standartlar için verimi % 85 altında olmayan pH=8'dir. Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'de pH kalibrasyon grafikleri ve Çizelge 3.4'de pH=8 ve pH=9'da standart aminlerin % geri kazanım değerleri verilmektedir.



Şekil 3.14 Standart aminlerin pH'a karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik.

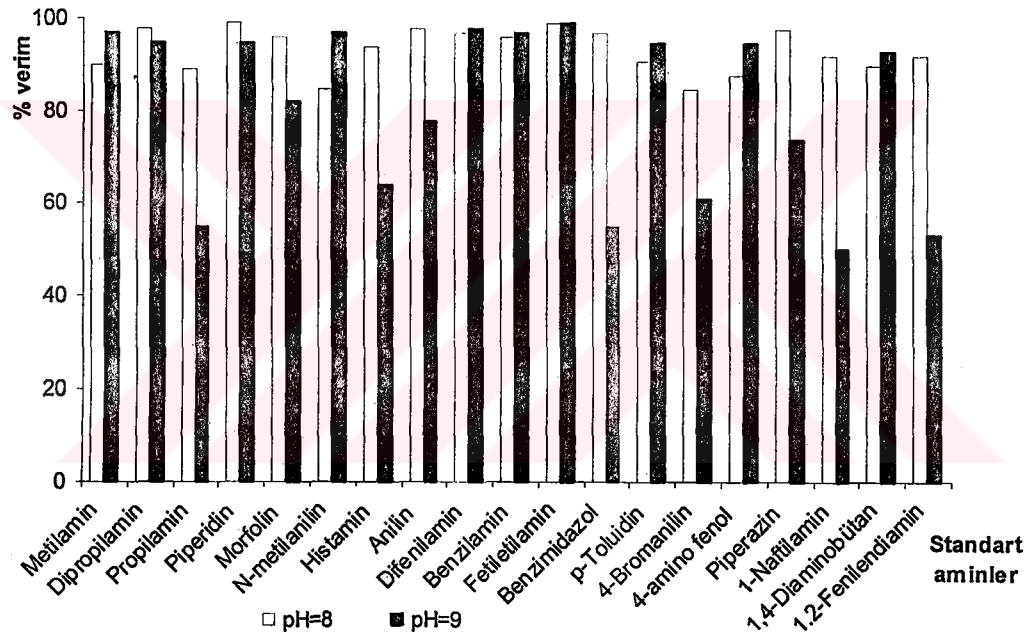


Şekil 3.15 Standart aminlerin pH'a karşı pik alanlarının değişimini gösteren grafik.

Çizelge 3.4 Aminlerin pH=8 ve pH=9 değerlerindeki % geri kazanımları.
Deney sayısı: 5, standart sapma : s.s.

Standart Aminler	Aminlerin pH:8'deki verimleri (%) (s.s)	Aminlerin pH:9'daki Verimleri (%) (s.s)
Metilamin	77 (3,0)	97 (4,5)
Dipropilamin	96 (2,0)	77 (1,4)
Propilamin	89 (2,5)	55 (2,0)
Piperidin	99 (1,2)	85 (2,8)
Morfolin	96 (3,1)	82 (2,3)
Histamin	94 (1,7)	64 (3,3)
N-Metilanolin	97 (2,2)	63 (2,6)
Anilin	98 (1,3)	78 (1,1)
Difenilamin	68 (1,1)	98 (1,3)
Feniletilamin	79 (1,4)	99 (1,6)
Benzilamin	77 (2,3)	97 (2,6)
Benzimidazol	92 (2,6)	55 (4,9)
p-Toluidin	80 (3,8)	95 (1,7)
4-Bromanilin	85 (4,6)	61 (4,9)
4-Aminofenol	99 (2,5)	67 (3,1)
Piperazin	98 (1,8)	74 (1,6)
1-Naftilamin	92 (4,7)	50 (2,5)
1,4-Diaminobütan	90 (3,8)	93(5,1)
1,2-Fenilendiamin	92 (4,8)	53 (3,5)

Bu çalışmada standardize edilmiş metot uygulanarak önceden her bir numune (deniz suyu, dere suyu, dip çamuru ve idrar) içerisinde anilin miktarı belirlendikten sonra bu örneklerle değişik konsantrasyonlarda anilin enjekte edilerek aynı metot ile % geri kazanım deneyleri yapılmış ve her bir numune için tespit edilen bu değerler; dip çamuru için % 95, deniz suyu, dere suyu ve idrar numunesi için % 98 olup deneylerin tekrarında %1-2 standart sapma hesap edilmiştir bu da metodun söz konusu örneklerle aynı hassasiyetle uygulanabileceğini göstermektedir. Her örnek için hesaplanan % geri kazanım değerleri söz konusu örneklerde belirlenen aminlerin konsantrasyonlarının hesaplanmasında göz önüne alınmıştır. Amin standartları için belirlenen her iki optimum pH değeri için hesaplanan % geri kazanım değerleri de Şekil 3.16’da verilmiştir.

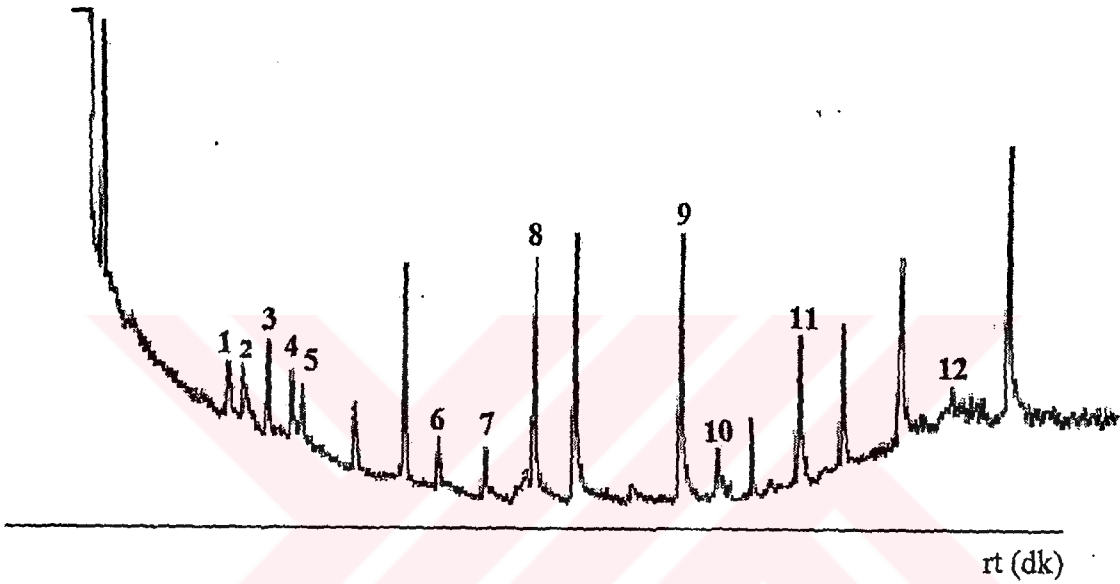


Şekil 3.16 Standart aminlerin pH:8 ve pH:9’da iyon-çifti ekstraksiyonu ile % geri kazanımlarının belirlenmesi

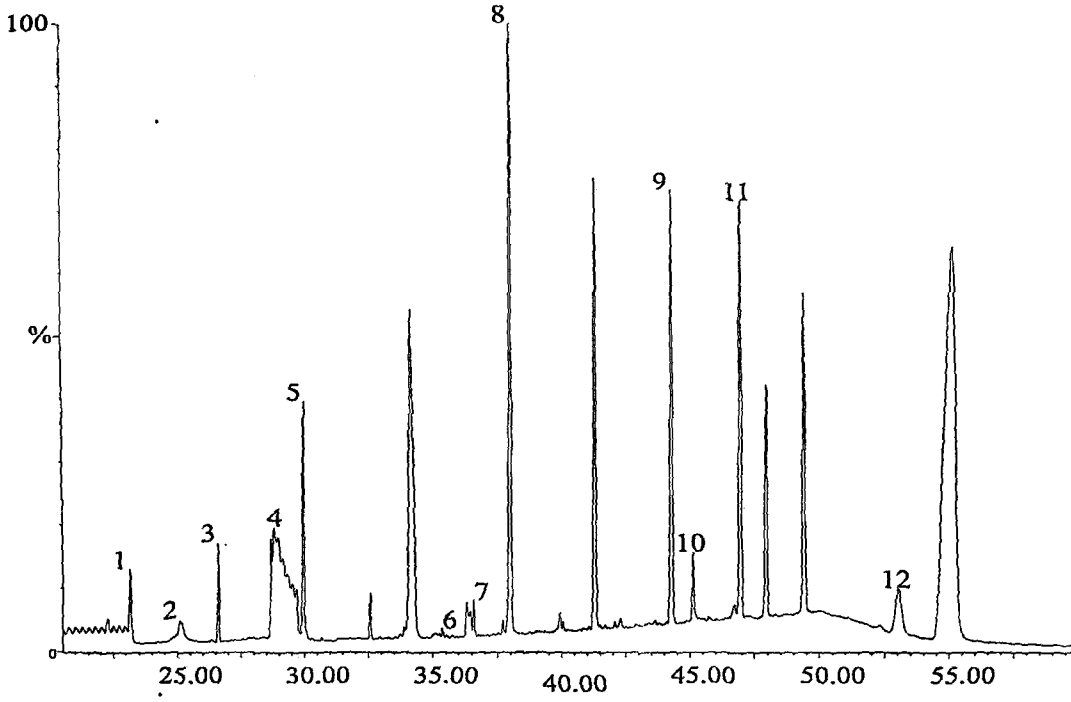
3.1.4 Deniz Suyu Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yaz ve kış aylarında Zonguldak Liman bölgesi deniz suyundan alınan 250 mL’lik örneklerin analizleri GC ve GC-MS kullanılarak yapılmıştır. Örneklerin kromatogramlarındaki piklerin alıkonma zamanları ile standart aminlerin kromatogramlarındaki alıkonma zamanları karşılaştırılarak birbirine uyum sağlayan aminler tespit edildi, ayrıca tespit edilen bu aminlerin kütle spektrumları da yorumlanıp

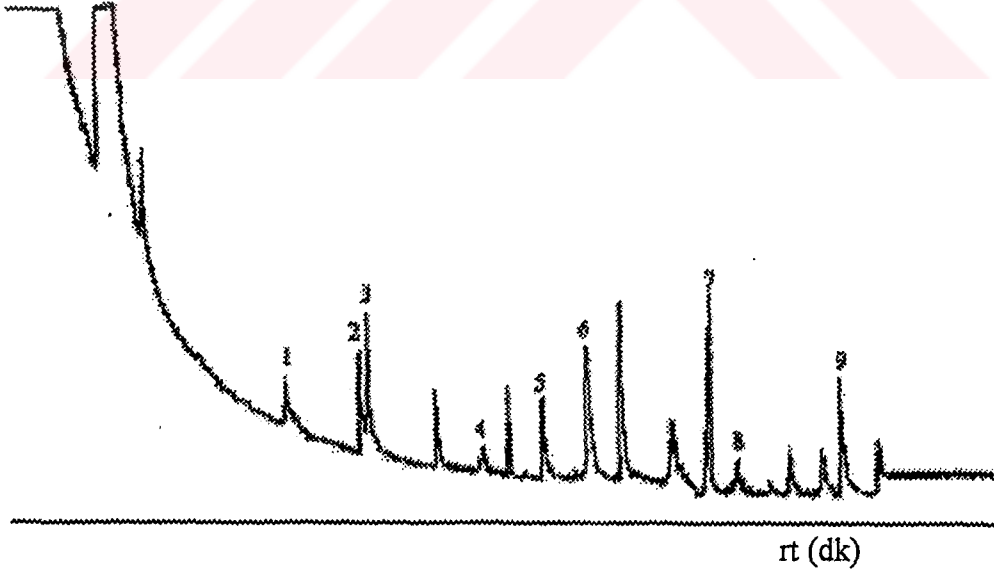
GC-MS'in mevcut kütüphane verilerinden yararlanılmıştır. Belirlenen aminlerin pik alanları standart aminlerin kalibrasyon eğrileri ile karşılaştırılarak farklı zamanlardaki liman bölgesi deniz suyundaki amin konsantrasyonları standart ekleme ile alınan % verim de dikkate alınıp hesaplanmıştır. Konsantrasyon hesaplanmasında belirlenen aminlerin Çizelge 3.4.'deki ekstraksiyondan sonra % geri kazanımları da göz önüne alınmıştır. Şekil 3.17 ve Şekil 3.18'de deniz suyu numunesinin farklı zamanlarda analizlerine ait GC ve GC-MS kromatogramları ve Çizelge 3.5'de yaz ve kış aylarında yapılan analizlerinde tespit edilen aminlerin hesaplanan konsantrasyonları verilmiştir.



Şekil 3.17 Deniz suyu numunesinin GC kromatogramı, 1. dipropilamin, 2. propilamin, 3. piperidin, 4. morfolin, 5. histamin, 6. anilin, 7. feniletilamin, 8. *p*-toluidin, 9. aminofenol, 10. piperazin, 11. 1-naftilamin, 12. 1,2-fenilendiamin. (2004 Ocak-Nisan aylarında yapılan analiz).



Şekil 3.18 Deniz suyu numunesinin GC-MS kromatogramı, 1. dipropilamin, 2. propilamin, 3. piperidin, 4. morfolin, 5. histamin, 6. anilin, 7. feniletilamin, 8. *p*-toluidin, 9. aminofenol, 10. piperazin, 11. 1-naftilamin, 12. 1,2-fenilendiamin (2004 Ocak-Nisan aylarında yapılan analiz).



Şekil 3.19 Deniz suyu numunesinin GC kromatogramı, 1. propilamin, 2. morfolin, 3. histamin, 4. anilin, 5. feniletilamin, 6. *p*-toluidin, 7. aminofenol, 8. piperazin, 9. 1-naftilamin. (2003 Mayıs-Ağustos aylarında yapılan analiz).

Çizelge 3.5 Deniz suyu numunesinde belirlenen aminlerin yaz ve kış aylarında hesaplanan konsantrasyonları.

Tespit edilen Aminler	Belirlenen Konsantrasyon(mg/l) (2003 Mayıs-Ağustos)	Belirlenen Konsantrasyon(mg/l) (2004 Ocak-Nisan)
Dipropilamin	-	3×10^{-4}
Propilamin	$0,8 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}
Piperdin	-	$3,8 \times 10^{-3}$
Morfolin	$3,0 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$
Histamin	$3,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$
Anilin	$0,3 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$
Feniletilamin	$1,9 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Toluidin	$3,2 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-2}$
Aminofenol	$6,3 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$
Piperazin	$2,3 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4}$
1-Naftilamin	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-2}$
1,2-Fenilendiamin	-	$1,6 \times 10^{-4}$

Liman bölgesi deniz suyu örneğinde Mayıs-Ağustos aylarında yapılan GC ve GC-MS analizlerinde; propilamin, morfolin, histamin, anilin, feniletilamin, *p*-toluidin, aminofenol, piperazin ve 1-naftilamin tespit edilmiş olup konsantrasyonları kalibrasyon grafikleri ve standart ekleme metodundaki verim de kullanılarak hesaplanmıştır. Belirlenen aminlerin GC-MS kromatogramlarından ve kütle spektrumlarından faydalanılarak yapıları aydınlatılmıştır. Deniz suyu örneğindeki aminlerin konsantrasyonları mg/l (ppm) olarak Çizelge 3.5’de verilmiştir. Ocak-Nisan aylarında alınan deniz suyu numuneleri de aynen Mayıs-Ağustos aylarında olduğu gibi analiz edilerek yaz ve kış aylarında deniz suyunda bulunan aminlerin çeşitliliği ve konsantrasyonları arasındaki farklar belirlenmiştir. Ocak-Nisan aylarında deniz suyunda dipropilamin, propilamin, piperdin, morfolin, histamin, anilin, feniletilamin, *p*-toluidin, aminofenol, piperazin, 1-naftilamin ve 1,2-fenilendiamin tespit edilmiştir. Ocak ve nisan aylarında deniz suyu numunesinde yapılan analizlerde 1×10^{-4} - $5,8 \times 10^{-2}$ mg/l arasındaki değişen konsantrasyonlarda ve Mayıs-Ağustos aylarında yapılan analizlerde ise $0,8 \times 10^{-4}$ - $6,0 \times 10^{-2}$ mg/l konsantrasyonlarında aminler tespit edilmiştir. Çizelge 3.5’de yaz ve kış aylarında belirlenen tüm aminlerin konsantrasyonları

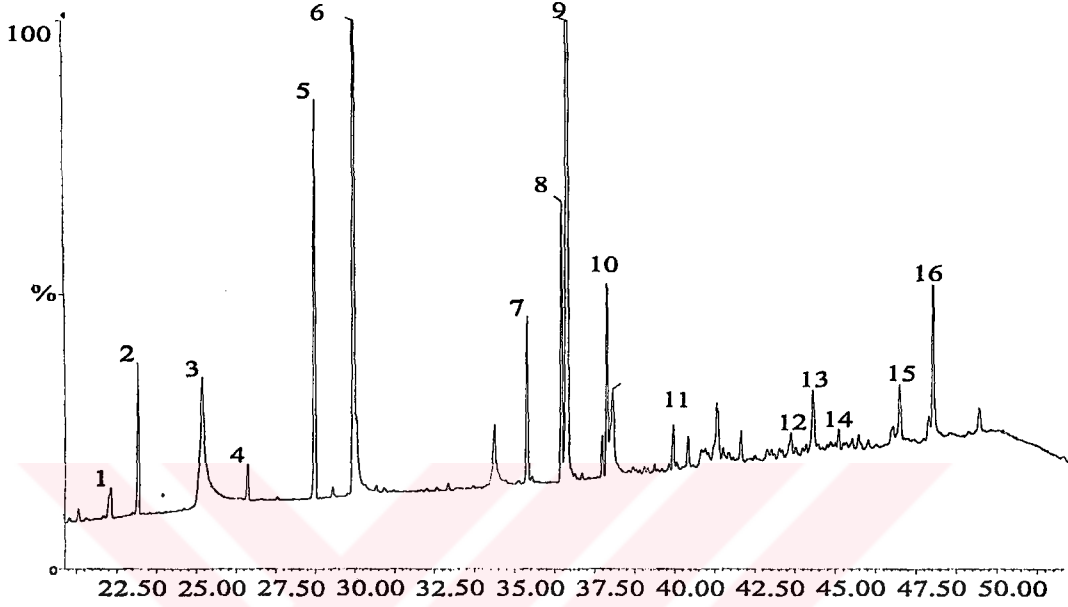
verilmiştir. Deniz suyunda düşük moleköl ağırlıklı alifatik aminlerin aranması için Terashi et. (1990) yaptıkları çalışmada, propilamin için metodun algılama limiti 0,06µg/l olarak verilmiştir. Bu çalışmada ise propilamin de dahil olmak üzere önerilen metodun algılama limiti 10^{-8} ppm'dir ve deniz suyunda tespit edilen propilamin konsantrasyonu $0,8 \times 10^{-4}$ ppm'dir. Müler et al. (1997)'de anilin, toluidin gibi aromatik aminlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada su örnekleri için kat-faz mikro ekstraksiyonu kullanmışlardır. Kullandıkları metodun algılama limiti 0,05 µg/l olarak belirtilmektedir. Bu çalışmada ise deniz suyu numunesinde belirlenen aromatik aminlerin konsantrasyonu 10^{-5} - 10^{-2} ppm arasındadır.

Çizelge 3.5'de her iki analizde belirlenen ve konsantrasyonları tespit edilen aminlerden Ocak-Nisan aylarında deniz suyunda tespit edilen propilamin, piperidin, 1,2-fenilendiamin Mayıs-Ağustos aylarında belirlenememiştir. Propilamin gibi düşük moleköl ağırlıklı aminlerin kaynama noktalarının çok düşük olması ve yaz aylarında sıcaklıkların yükselmesi ile bu tür aminlerin deniz sularındaki konsantrasyonun azaldığı düşünülmektedir. Bununla beraber piperidin ve 1,2-fenilendiamin gibi aromatik aminlerin deniz suyundaki konsantrasyonlarının çok düşük olması, güneş ışığı ve oksijenin bol olduğu yaz aylarında yükseltgenme ile hidroksil ve nitrolu bileşiklere dönüştüğü düşünülmektedir. Donlon et al. (1997), aromatik aminlerin yükseltgenmesinde oluşan ilk ürünün hidroksilaminler olduğunu belirtmiştir ve deniz suyu örneğinde yapılan bu çalışmada aminofenol konsantrasyonunun yaz aylarında artması ve bunun yanında diğer aminlerin konsantrasyonlarının azalması bu fikir ile örtüşmektedir. Acılık deresi su örneğinde yüksek konsantrasyonda değişik alifatik ve aromatik aminler belirlenmiştir, dolayısıyla döküldüğü yer olan liman bölgesinden alınan deniz suyu örneğinde belirlenen alifatik ve aromatik aminlerin çeşitliliğinin kaynağı olduğu düşünülmektedir.

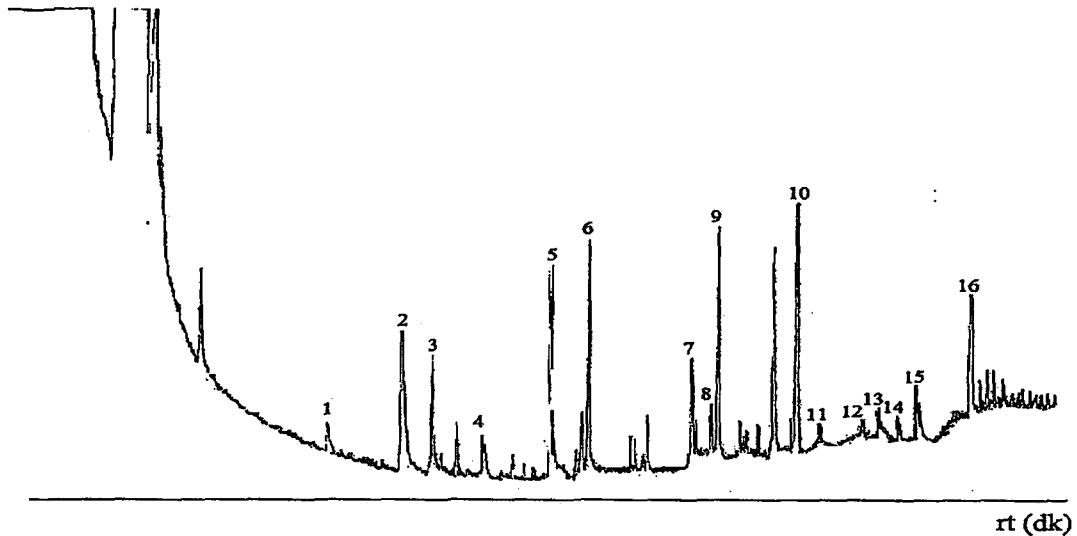
3.1.5 Dere Suyu (Acılık bölgesi) Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Acılık numunesinin GC-FID kromatogramına bakılarak amin türevlerinin alıkonma zamanları, standart aminlerin GC kromatogramlarından belirlenen alıkonma zamanları ile karşılaştırılmış ve GC-MS spektrumları ile mevcut kütüphane verileri yorumlanarak amin bileşikleri tespit edilmiştir. Standart amin bileşiklerinin kalibrasyon eğrilerine bakılarak ve

standart ekleme metodundaki % verim de hesaba katılıp tespit edilen aminlerin pik alanlarından konsantrasyon hesapları yapılmıştır. Acılık dere suyunda standart ekleme ile yapılan türetmede % 98 olarak hesaplanmıştır. Dere suyu analizleri 2003 yılı Mayıs-Ağustos ve 2004 yılı Ocak-Mart aylarında yapılmış ve kromatogramları Şekil 3.20 ve 3.21'de ve konsantrasyonları da Çizelge 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.20 Acılık dere suyu örneğinin GC-MS kromatogramı, (2004, Ocak-Nisan),
1. metilamin, 2. dipropilamin, 3. propilamin, 4. piperidin, 5. morfolin,
6. histamin, 7. anilin, 8. difenilamin, 9. feniletilamin, 10. *p*-toluidin,
11. benzimidazol, 12. bromanilin, 13. 4-aminofenol, 14. piperazin
15. 1-naftilamin, 16. 1,4-diaminobütan'dır.



Şekil 3.21 Acılık dere suyu örneğinin GC kromatogramı, (2004, Ocak-Nisan),
1. metilamin, 2. dipropilamin, 3. propilamin, 4. piperidin, 5. morfolin,
6. histamin, 7. anilin, 8. difenilamin, 9. feniletilamin, 10. *p*-toluidin,
11. benzimidazol, 12. bromanilin, 13. 4-aminofenol, 14. piperazin,
15. 1-naftilamin, 16. 1,4-diaminobütan'dır.

Çizelge 3.6 Acılık dere suyu numunesinde belirlenen aminlerin hesaplanan konsantrasyonları (2004, Ocak-Nisan ayları analizi).

Tespit Edilen Aminler	Belirlenen Konsantrasyon(mg/l)	Tespit Edilen Aminler	Belirlenen Konsantrasyon (mg/l)
Metilamin	$3,6 \times 10^{-5}$	Feniletilamin	$9,1 \times 10^{-2}$
Dipropilamin	$3,1 \times 10^{-2}$	<i>p</i> -Toluidin	$9,4 \times 10^{-2}$
Propilamin	$2,8 \times 10^{-2}$	Benzimidazol	$2,6 \times 10^{-5}$
Piperidin	$2,1 \times 10^{-4}$	4-Bromanilin	$1,9 \times 10^{-5}$
Morfolin	$7,8 \times 10^{-2}$	4-Aminofenol	$3,9 \times 10^{-5}$
Histamin	$8,2 \times 10^{-2}$	Piperazin	$0,8 \times 10^{-5}$
Anilin	$3,3 \times 10^{-3}$	1-Naftilamin	$2,3 \times 10^{-4}$
Difenilamin	$2,7 \times 10^{-4}$	1,4-Diaminobütan	$1,6 \times 10^{-3}$

Zonguldak Acılık deresi su örneğinde yapılan analizlerde konsantrasyonları 10^{-5} - 10^{-2} ppm arasında olan alifatik ve aromatik aminler tespit edilmiştir. Bu aminler sırasıyla; metilamin, Dipropilamin, prpopilamin, piperidin, morfolin, histamin, anilin, difenilamin, feniletilamin, *p*-toluidin, benzimidazol, 4-bromanilin, 4-aminofenol, piperazin, 1-naftilamin, 1,4-diaminobütan'dır. Dere sularında yapılan literatürde geçen benzer çalışmaların bir çoğunda bu tür maddelere rastlanmıştır. Terashi et al. (1990) dere ve deniz sularındaki alifatik aminleri belirlemek için yaptıkları çalışmada propilamin, dipropilamin gibi alifatik aminleri belirlemeyi başarmıştır. Geliştirdikleri metodun algılama limiti $0,06 \mu\text{g/l}$ 'dir. Benzer bir çalışmada Schmidt et al. (1997) tarafından yapılmıştır. Nehir suyu örneklerinde amino toluen gibi bir çok aromatik amin bileşiği tespit etmişlerdir. Kullanılan metodun algılama limiti $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 'dir. Başlangıçta zararlı böceklerle karşı kullanılan böcek öldürücü bazı tarım ilaçları sulara ve toprağa karışarak aerobik ve anaerobik bozunma sonucu anilin, aminofenol, aminotoluen ve dietilamin gibi zararlı bileşikler oluşmakta ve bu bileşiklerin konsantrasyonları bitkilere, çevredeki diğer canlılara ve özellikle insan sağlığına tehdit oluşturacak düzeylere ulaşmaktadır (Schmidt et al., 1997; Lloret et al., 2002; Brown and Laboureur, 1983).

Acılık deresinde anilin, naftilamin gibi aromatik aminlerin konsantrasyonunun fazla olması, ev atıkları ve bazı atık suların dereye bırakıldığı fikrini vermektedir. Deniz suyu numunesinde belirlenen amin konsantrasyonu ile dere suyundaki konsantrasyonlar

karşılaştırıldığında dere suyundaki amin konsantrasyonunun çok yüksek olduğu görülmüştür.

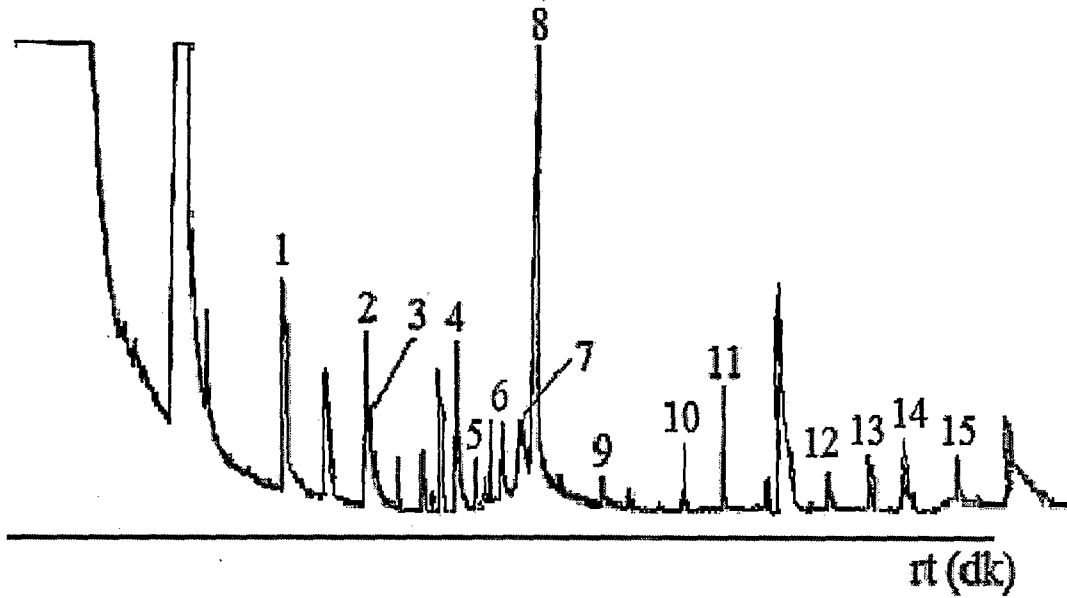
Özellikle balıklarda birikme özelliği olan histaminin konsantrasyonu üst sınıra oldukça yakındır. Dere suyunun hiç bir arıtma işlemi yapılmadan denize dökülmesi ile bunun sonucunda deniz suyundaki söz konusu bu aminlerin konsantrasyonu artarak denizde yaşayan canlılara zarar verecek düzeye çıkabileceği fikrini ortaya koymaktadır. Balıkçılığın önemli bir yer tuttuğu ve balığın sık tüketildiği Zonguldak ilinde söz konusu bu aminlerin kanser riskini attırabileceği düşünülebilir.

3.1.6. Dip Çamuru Numunesinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

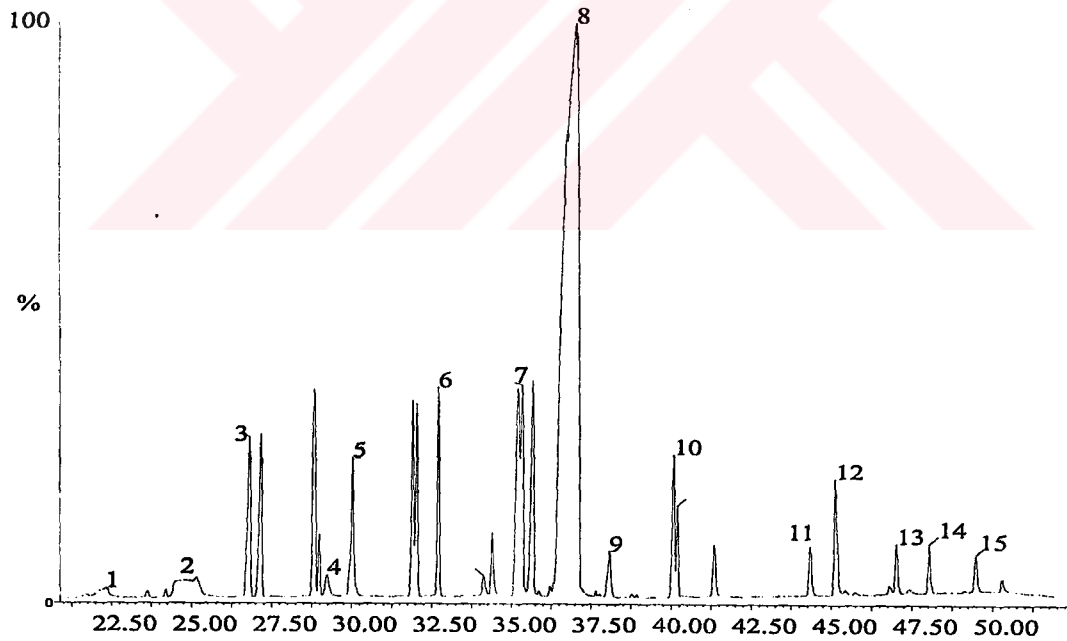
İki farklı yöntemle analizi yapılan dip çamuru örneğinin Şekil 3.22 ve Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'de GC-FID ve GC-MS kromatogramları ile Çizelge 3.7'de hesaplanan konsantrasyonları verilmektedir. Belirlenen aminlerin çeşitliliği ve konsantrasyonları göz önüne alındığında geri ekstraksiyondan sonra türetme işleminin dip çamurundaki aminlerin belirlenmesi için uygun bir ön ekstraksiyon işlemi olduğu düşünülebilir.



Şekil 3.22 Acılık Deresi dip çamuru örneğinin geri eks. yapılmadan önerilen türetme metodu ile alınan GC kromatogramı, 1. metilamin, 2. dipropilamin, 3. piperidin, 4. morfolin, 5. histamin, 7. anilin, 8. benzilamin 9. *p*-toluidin, 10. benzimidazol, 11. aminofenol, 12. piperazin, 13. 1-naftilamin, 15. 1,2-fenilendiamin.



Şekil 3.23 Geri ekstraksiyondan sonra türetilerek analizi yapılan dip çamuru örneğinin GC-FID kromatogramı, 1. Metilamin, 2. Dipropilamin, 3. Piperidin, 4. Morfolin, 5. Histamin, 6. *N*-Metilanilin, 7. Anilin, 8. Benzilamin, 9. *p*-Toluidin, 10. Benzimidazol, 11. Aminofenol 12. Piperazin, 13. 1-Naftilamin, 14. 1,4-Diaminobütan, 15. 1,2-Fenilendiamin.



Şekil 3.24 Acılık Deresi dip çamuru örneğinin geri ekstraksiyon yapıp önerilen metot ile türetilen kısmının GC-MS kromatogramı, 1. Metilamin, 2. Dipropilamin, 3. Piperidin, 4. Morfolin, 5. Histamin, 6. *N*-Metilanilin, 7. Anilin, 8. Benzilamin, 9. *p*-Toluidin, 10. Benzimidazol, 11. Aminofenol, 12. Piperazin, 13. 1-Naftilamin, 14. 1,4-Diaminobütan, 15. 1,2-Fenilendiamin.

Çizelge 3.7 Acılık deresi dip çamuru örneğinin analizinde belirlenen aminlerin konsantrasyonu (2004, Mayıs-Ağustos).

Tespit edilen aminler	Konsantrasyon (mg/Kg) (geri ekst.)	Konsantrasyon (mg/Kg) (geri eks. yapılmadan)
Metilamin	$3,2 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-3}$
Dipropilamin	$5,6 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3}$
Piperdin	$3,6 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-5}$
Morfolin	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Histamin	$0,9 \times 10^{-4}$	$0,3 \times 10^{-3}$
N-metilanilin	$3,56 \times 10^{-3}$	-
Anilin	$2,1 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-5}$
Benzilamin	$3,8 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-1}$
p-Toluidin	$4,8 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-5}$
Benzimidazol	$0,3 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$
Aminofenol	$6,6 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-4}$
Piperazin	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-6}$
1-Naftilamin	$3,2 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-5}$
1,4-Diaminobütan	$1,1 \times 10^{-5}$	-
1,2-Fenilendiamin	$1,2 \times 10^{-5}$	$0,5 \times 10^{-5}$

Dip çamuru örnekleri özellikle bir ön ekstraksiyondan geçirilmiştir. Bu tür örnekler içersinde bir çok organik madde çözünmüş olarak bulunabilmektedir. Ayrıca analizde istenmeyen bu maddeler suda yüksek çözünürlüğe sahip olduklarından türetme işleminde IBCF reaktifinin etkinliğinde azaltabilirler. Bununla birlikte dip çamuru örneğinin ikinci kısmında geri ekstraksiyon yapılmasının en büyük sebebi de bu tür istenmeyen organik bileşiklerdir. Hong et al. (2004)'de çevrede ve balıklardaki klorlanmış pestisitlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada çeşitli organik çözücülerle hem ön bir ekstraksiyon hem de geri ekstraksiyon yöntemi kullanarak istenmeyen yağları ortamdan uzaklaştırmışlardır. Ön ekstraksiyon işlemini aseton-hekzan karışımı ile yapılmış ve fazda yağların çok az çözündüğü asetonitril kullanarak ikinci bir ekstraksiyon yöntemi kullanmış ve istenmeyen bu bileşikleri ayırmayı başarmışlardır. Dip çamuru gibi bir çok organik

maddeyi içerisinde bulunduran örneklerde bu tür ekstraksiyon işlemleri analiz için büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmalar göz önünde bulundurularak belirli miktardaki dip çamuru örneği asidik metanol ile sokslet düzeneği hazırlanıp 12 saat ekstraksiyon yapılmıştır. Deneysel kısım 2.3.9'da ayrıntılı olarak anlatılmaktadır. Ön ekstraksiyon işleminden sonra sulu kısma izole edilen maddeler içerisinde istenmeyen bir çok bileşik bulunmaktadır. Özellikle hidroksil ve karboksil içerikli yapıların suda çok iyi çözündüğü düşünüldüğünde bu bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu bileşikleri uygun bir organik çözücü ile sulu kısımdan uzaklaştırmak için ortamın pH'sı HCl ile 1'e getirilerek bu bileşiklerin ve özellikle yağların organik çözücüye geçmesi sağlandı. Organik çözücü olarak kloroform kullanılmıştır. Kloroform ile ekstraksiyon işlemi organik fazda renklenme gözlenmeyene kadar tekrarlanmıştır. Bu işlemlerden sonra iyon çifti ekstraksiyonu yapılarak türetme metodu uygulanmıştır. Bu ekstraksiyonda istenmeyen maddeler organik fazla uzaklaştırılırken aminlerin sulu fazda kalması sağlanmıştır. İkinci kısım dip çamurunda uygulanan geri ekstraksiyon işleminin temel amacı da bazı düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve fenolik bileşiklerin kloroform ile uzaklaştırılmadığının düşünülmesidir. Bunun için BEHPA ile ekstraksiyondan sonra kloroform fazı HCl ile geri ekstraksiyon yapılarak aminlerin sulu faza geçerek istenmeyen organik maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu tür bileşiklerin aminlerin analizini güçleştiren diğer bir tarafıda, türetme reaktifi ile reaksiyona girmelerinden dolayı yeterli miktarda reaktifle aminlerin reaksiyona girememesidir. Reaktifin bu gruplarla ve aminlerle reaksiyon önceliği Bölüm 1.6.5'de detaylı olarak anlatılmıştır. IBCF reaktifi özellikle düşük molekül ağırlıklı asitlerin türetilmesinde kullanılmaktadır.

Anilin ve benzer yapıların çevre sularında ve dip çamurlarında bozunma ürünlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ortamdaki mikrobiyal aktivitelerin fazlalığı, aerobik ve anaerobik parçalanmalarda ortamdaki oksijen miktarının farklılığı ile oluşan aromatik ürünlerin çeşitliliğinin değiştiği belirtilmiştir (Ekici et al., 2001; Razo-Flores et al., 1997).

Dip çamuru örneğinde yapılan geri ekstraksiyon işleminden sonra amin bileşiklerinin çoğunun konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Hidroliz işlemi ile dip çamuru gibi çevre örneklerinde bulunan bir çok nitrozamin bileşiklerinin HCl asit ile hidroliz olarak ilgili aminlere dönüştüğü düşünülebilir. Hidrolizden önce ve sonra alınan sonuçlarda metilamin

konsantrasyonunun hidrolizden sonra artması ilgili nitrozaminin hidroliz olduğu fikrini vermekte olup literatür çalışmaları da bu düşünceyi desteklemektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda değişik yollarla oluşan aromatik aminlerin miktarı parçalanmanın türüne ve parçalanma süresine bağlı olarak değişik çevre örneklerinde farklılık göstermektedir. Tekstil azo boyar maddeleri dere suyu dip çamurunda anaerobik bozunmaya uğrayıp 10-140 saatte parçalanarak anilin, naftilamin, aminofenol türü bileşikler oluşurken, göl sularında aerobik bozunmaya uğrayan sözkonusu maddelerin 25-10 günde bozunarak 1-amino-2-hidroksinaftelen gibi sülfolanmış bileşiklere dönüştüğü belirtilmektedir (Bornick et al., 2001;).

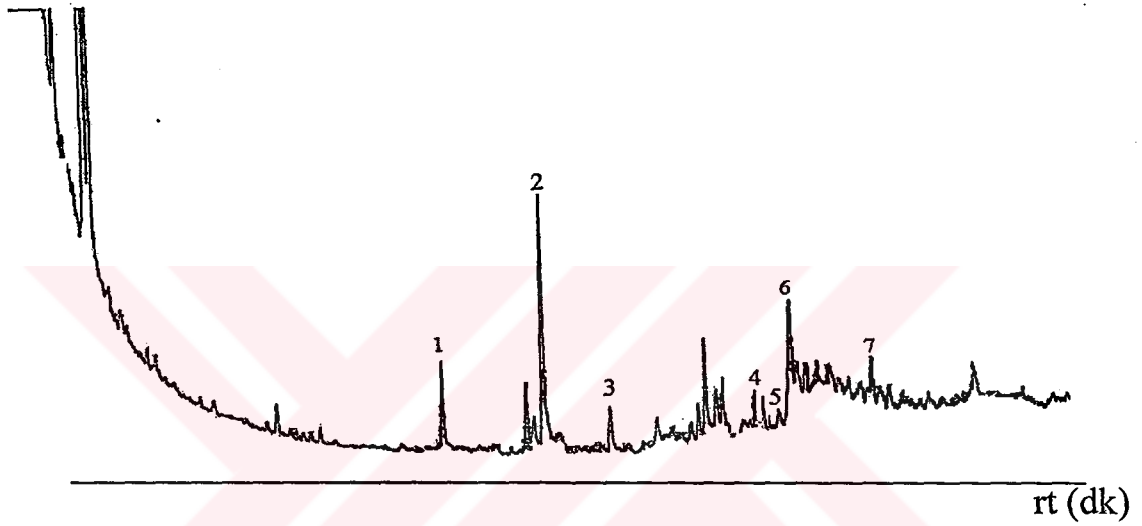
3.1.7 İdrar Numunelerinin GC ve GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Eşit hacimde aynı kişiden alınan 50 mL'lik idrar numunesinin ilk kısmı 6M HCl ile hidroliz edildi ve sulu kısmın pH:8'de BEHPA ile ekstraksiyon yapıp türetilerek GC-FID ve GC-MS ile analizleri yapıldı. İkinci kısım numune pH:8'de BEHPA ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra önerilen metot ile kuru fazda türetildi ve GC ve GC-MS'de analizleri yapıldı. Kromatogramlardan çıkan pikler standart amin kromatogramı ile karşılaştırılarak idrar numuneleri içerisindeki aminler belirlendi. Ayrıca GC-MS spekturumlarından faydalanılarak standart aminlerin mevcut kütüphane verileri karşılaştırılıp bu tespitlerin doğruluğu desteklendi. İki farklı yöntemle analizi yapılan idrar numunesinde tespit edilen aminlerin konsantrasyonları karşılaştırıldı. İlk analizi yapılan idrar numunesi (İdrarA) 35 yaşlarında hiçbir saç boyası ürünü kullanmamış, hiç sigara içmemiş ve fazla miktarda kızarmış ürün tüketmeyen bir bayandan alınmıştır.

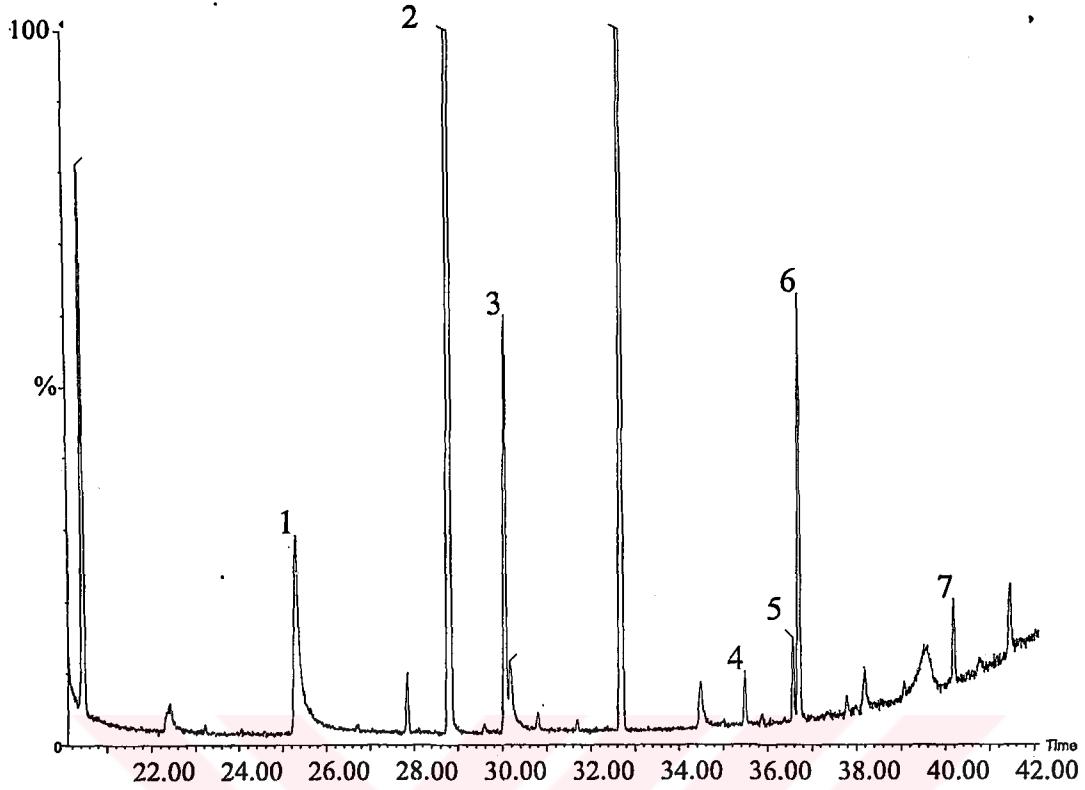
Diğer idrar numuneleri (İdrarB ve İdrarC) yaklaşık 10-15 yıldır sigara içen ve piyasada ucuz olarak satılan saç boyalarını kullanan aynı zamanda kızarmış yiyeceklerle de beslenen iki bayandan alınmıştır. Diğer bir idrar numunesi de saç boyası kullanmayan fakat 20 yıldır sigara kullanan ve özellikle kızarmış yiyecekler tüketen prostat kanseri teşhisi konulan bir hasta erkekten alınmıştır.

İdrarB numunesinde hidroliz edilerek yapılan analizlerin sonuçları hidroliz edilmeden yapılan örnek numune sonuçları ile karşılaştırıldığında hidroliz işlemi uygulanarak yapılan

analizler daha hassas ve spesifik olduğu görüldüğünden, diğ er idrar numuneleri hidroliz edilerek analiz edilmişlerdir. İdrar numunelerinin GC ve GC-MS analizleri sırasıyla Şekil 3.25, Şekil 3.26, ve Şekil 3.27, Şekil 3.28 ve Şekil 3.29’da verilmiş olup Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da hesaplanan konsantrasyonları tablo halinde gösterilmektedir. Belirlenen aminlerin konsantrasyonlarının hesaplanması GC’den alınan kromatogramlardaki pik alanları kalibrasyon grafiklerinde yerine konulup idrar örnekleri için yapılan standart ekleme metodu ile alınan verimler ve ekstraksiyon verimleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.25 İdrar numunesinin (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekte alın an numune) ikinci kısım analizinin GC kromatogramı, 1. propilamin, 2. morfolin, 3. anilin, 4. histamin, 5. benzilamin, 6. feniletilamin, 7. benzimidazol.



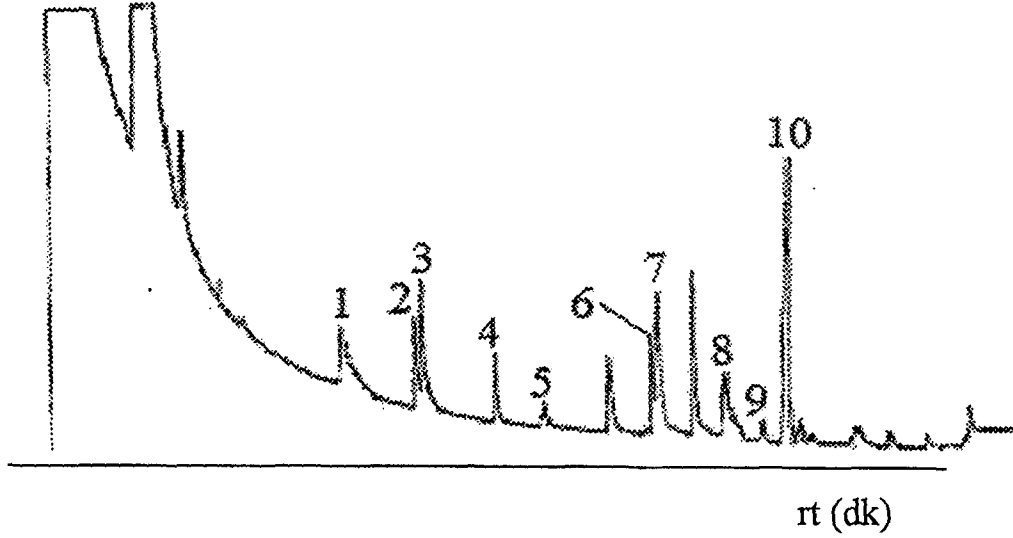
Şekil 3.26 İdrar numunesinin (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekte alınmış numune) GC-MS kromatogramı, 1. propilamin, 2. morfolin, 3. anilin, 4. histamin, 5. benzilamin, 6. feniletilamin, 7. benzimidazol.

Çizelge 3.8. İdrar numunesinde (saç boyası kullanmayan ve sigara içen bir erkekte alınmış numune) belirlenen aminler ve konsantrasyonları.

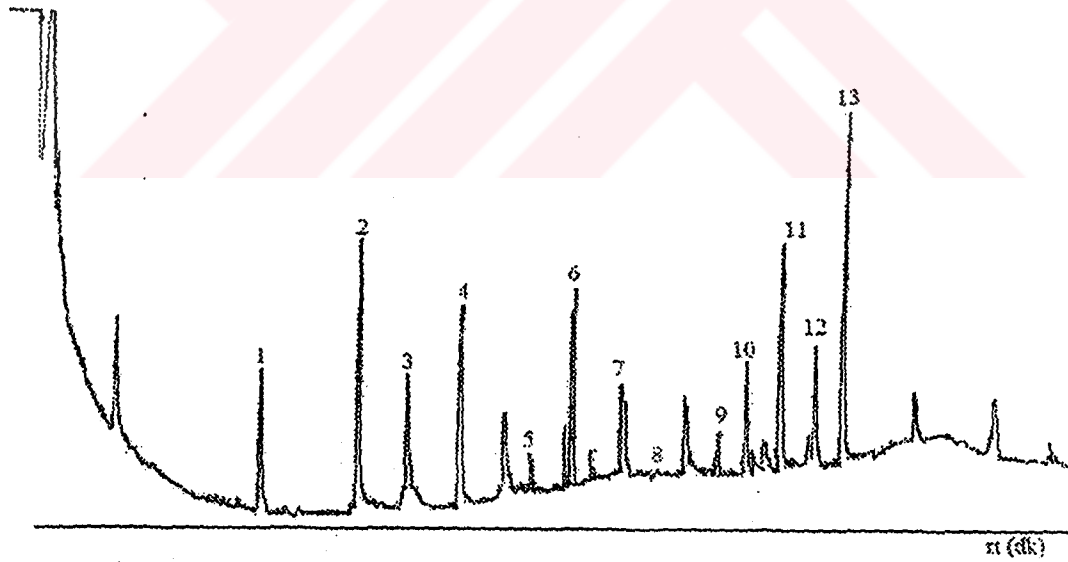
Belirlenen Aminler	Konsantrasyon (mg/l)
Propilamin	$0,5 \times 10^{-2}$
Morfolin	$1,1 \times 10^{-1}$
Anilin	$1,3 \times 10^{-2}$
Histamin	$0,9 \times 10^{-5}$
Benzilamin	$1,3 \times 10^{-7}$
Feniletilamin	$1,6 \times 10^{-4}$
Benzimidazol	$1,3 \times 10^{-6}$

Erkek hastanın idrarında hidroliz ile yapılan analizlerde sırasıyla propilamin, morfolin, anilin, histamin, benzilamin, feniletilamin ve benzimidazol bulunmuştur. Belirlenen aminlerin pik alanları kalibrasyon grafiklerinde yerine konulup ve ayrıca ekstraksiyondaki

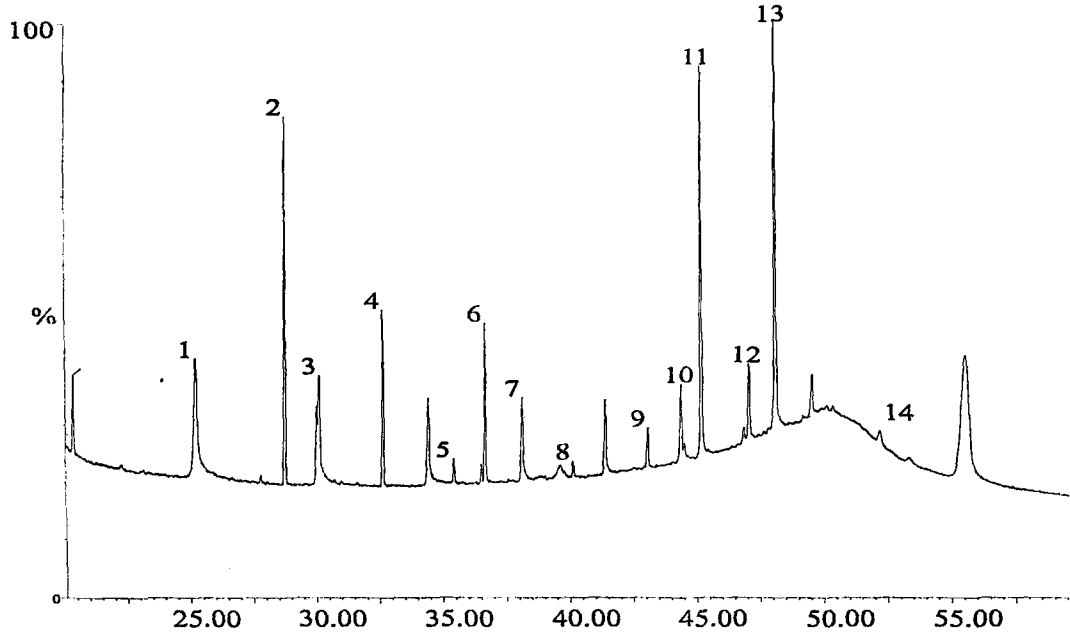
% geri kazanımlarda dikkate alınarak konsantrasyon hesapları yapılmıştır. Bu konsantrasyon değerleri sırasıyla $0,5 \times 10^{-2}$, $1,1 \times 10^{-1}$, $1,3 \times 10^{-2}$, $0,9 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-7}$, $1,6 \times 10^{-4}$, $1,3 \times 10^{-6}$ ppm'dir. en yüksek konsantrasyona sahip amin bileşiği morfolin'dir.



Şekil 3.27 İdrarB numunesinin hidroliz edilmeden türetilen kısmının GC kromatogramı
1. propilamin, 2. morfolin, 3. piperidin, 4. metilanilin, 5. anilin, 6. difenilamin, 7. feniletilamin, 8. piperazin, 9. 1-naftilamin, 10. 1,3-diaminobütan.



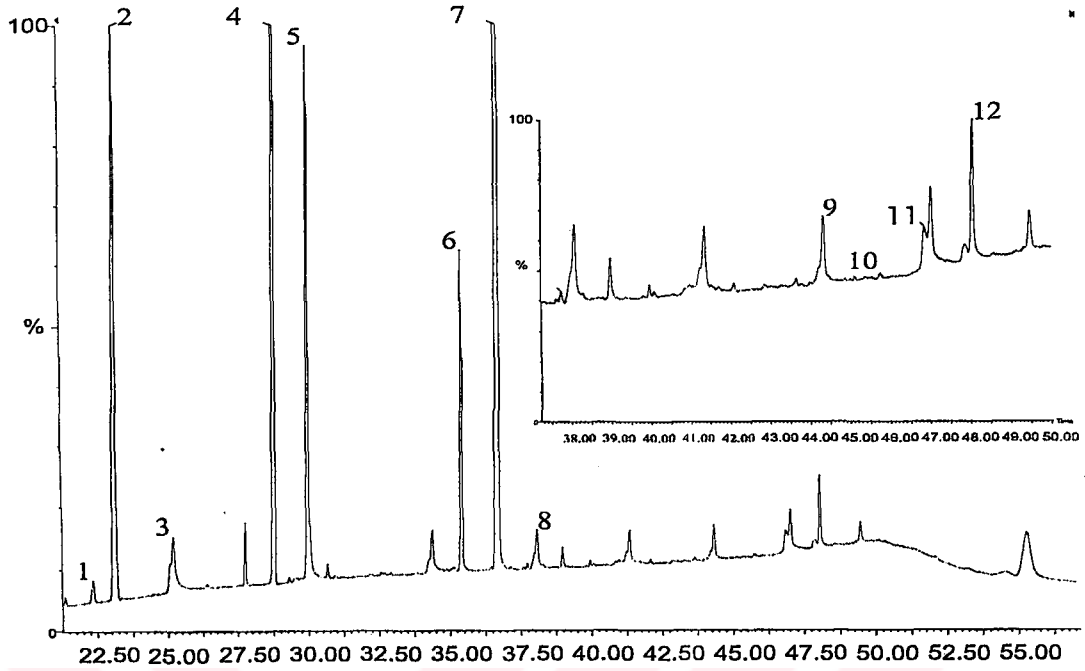
Şekil 3.28 İdrarB numunesinin hidroliz edilerek türetilen kısmının GC kromatogramı.
1. propilamin, 2. morfolin, 3. histamin, 4. metilanilin, 5. anilin, 6. feniletilamin, 7. *p*-toluidin, 8. benzimidazol, 9. bromanilin, 10. aminofenol, 11. piperazin, 12. 1-naftilamin, 13. 1,4-diaminobütan.



Şekil 3.28 İdrarB numunesinin hidroliz edilerek türetilen kısmının GC-MS kromatogramı.
1. propilamin, 2. morfolin, 3. histamin, 4. metilanilin, 5. anilin, 6. feniletilamin, 7. *p*-toluidin, 8. benzimidazol, 9. bromanilin, 10. aminofenol, 11. piperazin, 12. 1-naftilamin, 13. 1,4-diaminobütan, 1,2-fenilendiamin.

Çizelge 3.9 İdrarA ve İdrarB numunelerinde belirlenen aminlerin konsantrasyonlarının çizelge olarak gösterilmesi.

Belirlenen aminler	Konsantrasyon İdrarB(mg/l) (hidroliz)	Konsantrasyon (mg/l)İdrarB	Konsantrasyon (İdrarA)(mg/l) (hidroliz)
Propilamin	$3,2 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-7}$
Piperidin	-	$8,6 \times 10^{-3}$	-
Morfolin	$8,3 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-4}$
Histamin	$2,6 \times 10^{-3}$	-	$1,7 \times 10^{-6}$
Metilanilin	$5,1 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$	-
Anilin	$1,1 \times 10^{-5}$	$0,8 \times 10^{-5}$	$0,7 \times 10^{-7}$
Difenilamin	-	$6,9 \times 10^{-3}$	-
Feniletilamin	$4,7 \times 10^{-2}$	$7,9 \times 10^{-3}$	-
<i>p</i> -Toluidin	$1,9 \times 10^{-3}$	-	-
Benzimidazol	$1,5 \times 10^{-4}$	-	-
Bromanilin	$1,4 \times 10^{-5}$	-	-
Aminofenol	$1,2 \times 10^{-3}$	-	$0,3 \times 10^{-6}$
Piperazin	$9,4 \times 10^{-2}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-5}$
1-Naftilamin	$3,2 \times 10^{-4}$	$0,6 \times 10^{-4}$	-
1,4-Diaminobütan	$1,3 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-4}$
1,2-Fenilendiamin	$0,9 \times 10^{-4}$	-	-



Şekil 3.30 İdrarC numunesinin GC-MS kromatogramı, 1. metilamin, 2. dipropilamin, 3. propilamin, 4. morfolin, 5. histamin, 6. anilin, 7. feniletilamin, 8. *p*-toluidin, 9. aminofenol, 10. piperazin, 11. 1-naftilamin, 12. 1,3-diaminobütan.

Çizelge 3.10 İdrarC numunesinde belirlenen aminler ve kalibrasyon grafikleri kullanılarak belirlenen konsantrasyonları.

Belirlenen aminler	Konsantrasyon (mg/l)
Metilamin	$0,8 \times 10^{-5}$
Dipropilamin	$5,8 \times 10^{-2}$
Propilamin	$3,7 \times 10^{-4}$
Morfolin	$2,3 \times 10^{-2}$
Histamin	$2,2 \times 10^{-2}$
Anilin	$5,7 \times 10^{-3}$
Feniletilamin	$8,3 \times 10^{-2}$
<i>p</i> -Toluidin	$1,1 \times 10^{-5}$
Aminofenol	$2,2 \times 10^{-5}$
Piperazin	$1,5 \times 10^{-6}$
1-Naftilamin	$2,9 \times 10^{-4}$
1,3-diaminobütan	$3,6 \times 10^{-4}$

İnsan vücudunda histamin, metilamin ve anilin gibi bir çok amin bileşiği doğal olarak bulunmakta ve oluşmaktadır. 1,6-Hekzametilendiamin gibi alifatik aminlerin metabolik formlarının hücre gelişiminde rol oynadığı yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir (Laha and Luthy, 1990). İnsan vücuduna bu tür aminler çeşitli yollarla girmekte ve bir çok zararlı etki göstermektedir. Özellikle anilin ve toluidinler insanlara cilt yoluyla kolaylıkla nüfus etmektedir. Ayrıca sigara içen ve çeşitli kozmetik ürünlerini kullanan kişilerde bu tür bileşiklerin konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu yapılan bir çok araştırmada tespit edilmiştir. Özellikle sigara tütünlerinde ve dumanında da bulunan toluidin, benzilamin, sikloheksilamin gibi aromatik aminlerin insanlarda idrar kesesi kanserine yol açtığı yapılan bir çok klinik araştırmada tespit edilmiştir (Grimmer et al., 2000). Sigara dumanının kanserojen *N*-nitrozodimetilamin içerdiği bilinmektedir. Günde bir paket sigara içen kişi yaklaşık 0,8µg *N*-nitrozodimetilamin solumaktadır ve sigara içilen yerlerde bulunanlar için bu daha da fazladır (Ruhl et al., 1980; Song and Ashley, 1999).

Bitki, hayvan ve canlı organizmaların yaşamsal bir çok işlevinde kullanılan biyoaktif aminler ayrıca besin maddelerinde katkı maddesi olarak da bulunmaktadır. Biyoaktif bileşiklerin bir çoğu fizyoaktif etkinliğe sahiptir (Standara et al., 2000). Aynı zamanda vücudun genel işleyişinde bu tür aminlerin oluşumu oldukça doğal gerçekleşmektedir. Biyoaktif aminler doğada ve insan vücudunda çok düşük konsantrasyonlarda (ng/ml) bulunmaktadırlar. İnsan vücudunda bulunan bu aminler, beyin dokuları içerisinde yer alarak sinir sistemin çalışmasında görev almakta ve bazı enzimatik reaksiyonların son ürünü olarak vücutta oluşmaktadırlar (Smith, 1997; Jacinth et al., 2002).

İdrarB numunesinde hem hidroliz edilmeden hem de hidroliz edilerek önerilen türetme metodu uygulanmıştır. İdrar numunelerinin analizinde hidroliz işlemi ile hem numune içinde varolan amin konsantrasyonunun hem de çeşitliliğinin arttığı belirlenmiş olup bu sebepten dolayı tüm idrar numuneleri hidroliz işlemi uygulanarak analiz edilmişlerdir.

Prostat kanseri teşhisi konulan kişiden alınan idrar numunesinin analizinde propilamin, morfolin, anilin, histamin, benzilamin, feniletilamin ve benzimidazol belirlenmiştir. Özellikle kızarmış yiyeceklerde kadaverin, putresin, gibi biyojenik aminler ısının etkisiyle bozularak piperazin, piperidin, pirolidin ve morfolin gibi amin bileşiklerini oluştururlar. Bu tür bileşiklerin vücuttaki doğal konsantrasyonu beslenme gibi özelliklerle değiştiği gibi yaşanan çevreninde bu değişimde önemli yeri vardır. Bir çok çalışmada vücuttaki

sözkonusu aminlerin doğal konsantrasyonun ng/ml seviyede olduğu belirtilmektedir. Bu tür heterosiklik aminlerin kanser riski oluşturduğu yapılan bir çok araştırmada tespit edilmiştir (Saurina et al., 2001).

İdrarA, idrarB ve idrarC örneklerinde morfolin, piperazin belirlenmiş olup bu kişilerin kızarmış gıdaları tüketiyor olması literatür bilgileriyle de desteklenmektedir.

Gıdaların doğal yapısında bulunan spermidin, spermin gibi poliaminler vücutta monooksidaz enziminin etkisi ile ilgili nitrozaminlere dönüşmektedir (Fernandes et al., 2000). İdrarB örneğinde hidroliz edilmeden önceki piperazin ve feniletilamin konsantrasyonun hidrolizden sonra artması ilgili nitrozaminlerin sözkonusu aminlere dönüşüğünü göstermekte ve bu sonuç literatür bilgileri ile desteklenmektedir.

Saç boyası ürünlerinin deri tarafından absorplandığı ve vücut içinde çeşitli reaksiyonlar ile aromatik aminlere dönüştüğü bir çok çalışmada belirtilmektedir (Weiss et al., 2002). Bu tür boyaların bozunma ürünleri ve reaksiyonları Şekil 1.3’de verilmiştir. Saç boyası kullanan her iki bayan idrarında benzer aromatik aminler tespit edilmiştir. Özellikle aminofenol, anilin, 1-naftilamin, 1,2-fenilendiamin ve 1,4-diaminobütan türü bileşiklerin kaynağının kullanılan çeşitli saç boya olduğu düşünülmektedir. Literatürde de belirtildiği gibi aminofenolün idrar örneklerinde belirlenmesi, ilgili aminlerin ilk metaboliti olduğu fikrini desteklemektedir.

İdrar örneklerinde yapılan analizlerin sonuçlarına bakıldığında, erkek hasta, idrarB ve idrarC örneklerinde tespit edilen aminlerin her üç kişinin uzun süredir sigara içmesi ve kızarmış yiyecekleri tüketmesi ile orantılı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte sigara içmeyen ve saç boyası kullanmayan bayanda bu tür aminlerin bulunmaması veya doğal konsantrasyonlarında olması literatür bilgileri ile bire bir örtüşmektedir.

Çeşitli gıda ürünlerinde, kağıt, deri, kozmetik, ilaç, oyuncak, plastik, matbaa baskıları, tekstil gibi bir çok sanayide azo boya kullanılmaktadır ve bu maddeler genellikle aromatik aminlerin diazolanmasıyla hazırlanır. Yapılan bazı çalışmalarda karaciğerdeki azo redüktazları veya bağırsaklardaki anaerobik bakteriler, azo boya baskılarını kanserojen aminlere dönüştürerek bu boya baskıların potansiyel toksikliğini artırdığı tespit edilmiştir (Zhu et al., 2002; Danlon et al.,1997). İdrarB ve idrarC örneklerinde bulunan *p*-toluidin ve 1-

naftilamin bileşiklerinin idrarA örneğinde bulunamaması ve idrarA örneğindeki anilin konsantrasyonunun diğer iki örnektekinden çok daha az konsantrasyonda olması verilen literatür bilgisi ile desteklenmektedir.

Vücut içerisinde bulunan aminler özellikle protein yapılı dokulara bağlı olan histaminin doğal yapısını bozmakta ve histamini serbest forma geçirmektedirler (Tsikas et al., 1993). Tüm idrar örneklerinde histamin tespit edilmiştir. Fakat İdrarA örneğinde bu miktarın diğer idrar örneklerindeki miktarlara göre çok düşük konsantrasyonda olması yukarıda belirtilen literatür bilgisi ile uyum sağladığı düşünülebilir. Bununla birlikte idrarB ve idrarC örneklerindeki histamin miktarının erkek hasta idrarındaki miktardan daha fazla olması sözkonusu aminlerin vücuttaki histamin miktarını etkilediği fikrini desteklemektedir.

İdrar örneklerinin genel analiz sonuçlarına bakıldığında belirlenen aminlerin hem vücut içerisindeki doğal konsantrasyonda hem de dış etkilere ile vücuda karışan aminlerin konsantrasyonunun önerilen bu metot ile belirlenebileceği ayrıca vücutta bulunan ve çeşitli enzim aktiviteleri ile nitrozaminlere dönüşen amin bileşiklerinin de idrar numunelerinin hidroliz edilmesi ile tespit edilebileceği bu çalışma ile verilmektedir.

İdrar örneklerinde piperazin belirlenmesi için Skarping et al. (1986) tarafından yapılan çalışmada, piperazinin sulu çözeltisinin pH'sı 10 ayarlanarak izobutilkloroformat ile türetme yapılmış ve türevler kloroform fazına alınarak GC ile analiz edilmiştir. Metodun algılama limiti 20 pg/µl olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada önerilen metot ile idrar örneğinde piperazin iyon çifti ekstraksiyonu ile % 98 verimle ekstrakte edilmiştir. Ayrıca BEHPA ile kloroform fazına alınan piperazin geri ekstraksiyon yapılarak sulu faza alınıp aynı şartlarda IBCF ile türetilmiş ve verim % 65 olarak hesaplanmış olup kloroform fazının uçurulup kalıntının IBCF ile türetilmesindeki verim ise % 98 olarak belirlenmiştir. Metodun piperazin için algılama limiti 10^{-8} ppm olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, bu çalışmada önerilen metot kullanılarak sözkonusu aminlerin, daha düşük konsantrasyonlarda ve daha yüksek verimle belirlenebileceklerini göstermektedir.

3.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Bu çalışmada çevre örneklerinde ve biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonlarda bulunan primer ve sekonder aminlerin BEHPA reaktifi ile iyon çifti reaksiyonu tekniği kullanılarak izole edilmesi, kromatografik analizler öncesi uygun türetme reaksiyonlarının uygulanması ve GC/GC-MS analizlerinin yapılması basamaklarını içeren bir metot önerilmektedir. Metot deniz suyu, nehir suyu, dip çamuru ve idrar örneklerinde uygulanmış ve elde edilen sonuçlar genel olarak aşağıda özetlenmiştir.

- Metodun sözkonusu aminler için GC -FID ile belirlenen algılama limiti 10^{-8} ppm'dir. GC-FID kullanılarak belirlenemeyen fakat GC-MS kullanıldığında belirlenen aminler; metodun GC-MS ile birlikte kullanıldığında algılama limitinin GC-FID ye göre çok daha düşük olabileceğini göstermektedir.
- Deniz suyu örneklerinin analizleri yaz ve kış aylarında yapılmış ve kış aylarında propilamin ve dipropilamin gibi alifatik aminlerin konsantrasyonun yaz aylarına göre daha yüksek olduğu, kış aylarında amin çeşitliliğinin artış gösterdiği ve ayrıca yaz aylarında aminofenol gibi hidroksi aminlerin konsantrasyonun kış aylarına göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Nehir ve deniz suyu örneklerinin analizi için yapılan bu çalışma literatürde geçen bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında hem değişik türden aminlere cevap vermesi hem de deniz suyu gibi amin konsantrasyonunun çok düşük olduğu seviyelerde dahi metotun başarıyla uygulanabilmesi bakımından alternatif bir analiz metodu olarak önerilmektedir.
- Dip çamuru örneklerinin analiz sonuçları; önerilen metotun sözkonusu aminlerin bu kompleks yapılardan izole edilerek belirlenebilmesi için kullanılabileceğini göstermektedir.
- İdrar örneklerinden elde edilen sonuçlar; metotun kanser riskini gözlemlemek amacıyla idrar örneklerindeki kanserojen aminlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için kullanılabileceğini göstermiştir .

- Zonguldak bölgesinden toplanan çevre örneklerinin analizinde başta anilin olmak üzere primer ve sekonder aminlerin çeşitliliğinin fazla olduğu ve Acılık deresi suyunun Liman bölgesi deniz suyuna karışarak bu ortamda bulunan aminlerin konsantrasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bu metotun, sözkonusu aminlerin balıkların dokularında birikme özellikleri bilindiğinden, balıkların dokularındaki bu bileşiklerin analizleri için önerilebileceği düşünülmektedir.
- Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, metodun çok düşük konsantrasyonlardaki ($<10^{-8}$ ppm) alifatik ve aromatik aminlerin değişik çevre örnekleri ve biyolojik sıvılardaki analizleri için spesifik ve hassas bir şekilde kullanılabileceğini; ayrıca metodun hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle, standart bir metot olarak önerilebileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Ababouch, L.M.E., Afilal, H., Benab Del, Jelil., F.F. Butsa, J., (1986) Histamine levels in commercially processed fish in Morocco, *J. Food Prot.*, Vol. 49 pp. 904-908.
- Angerer, Jürgen., Lehnert, G., Mannschreck, C., Peters, M., (1994) Verhandlungen der DGAUM, Hazardous Substances in Biological, *Me Jahrestagung*, Vol. 34, p. 117.
- Auger, J., Boulay, R., Jaillais, B., Delion-Vancassel, S. (2000) Analysis of biogenic amines by solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 870, pp. 395-403.
- Avery, M.J. and Junk, G.A. (1985) Gas chromatography/mass spectrometry determination of water-soluble primary amines as their pentafluorobenzaldehyde imines, *Anal. Chem.*, Vol. 57, p. 790.
- Aymard, G., Labarthe, B., Warot, D., Berlin, I., Diquet, B. (2000) Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, Vol. 744, pp. 25-31.
- Bae, Hee-Sung., Cho, Young-Gyun., Oh, Sang-Eun., Kim, In-Soo., Lee James, M., Lee, Sung-Taik. (2002) Anaerobic degradation of pyrrolidine and piperidine coupled with nitrate reduction, *Chemosphere*, Vol. 48, pp. 329-334.
- Bang, Joakim., Nukaya, Haruo., Skog, Kertsin. (2002) Blue Chitin columns for the extraction of heterocyclic amines from cooked meat, *J. Chromatogr. A*, Vol. 977, pp. 97-105.
- Belardi, R.P. and Pawliszyn, J.B. (1989) The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, *J. Canada Water Pollution Res.*, Vol. 24, p. 179.
- Berner Louise, A., (1996) Heterocyclic Amines In Foods And Their Implications To Health, *Cattlemen's Beef Board*,
- Billedeau, S. M., Vollmer, D.L., Wilkes, J.G., and Thompson, H.C. (1996) Detection of N-nitrosamines in raw materials used in cosmetic formulations following nitrosation by LC/ELSD and PB/TEA with EI and ESI/MS confirmation, *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Real Time Analytical Strategies Using Hyphenated Techniques*, Vol. 2, pp. 31.
- Bornick, H., Eppinger, P., Grischek, T., Worch, E. (2001) Simulation of biological degradation of aromatic amines in river bed sediments, *Water Research*, Vol. 35, pp. 619-24.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bouchereau, A., Guenot, P., Larher, F.,** (2000) Analysis of amines in plant materials, *J. Chromatogr. B*, Vol., 747, p. 49.
- Brede, Cato., Skjevrak, Ingun., Herikstad, Hallgeir,** (2003) Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, Vol. 983, pp. 35–42.
- Brown, D., Laboureur, P.** (1983) The degradation of dyestuffs: Part I - Primary biodegradation under anaerobic conditions, *Chemosphere*, Vol.12, pp. 397-404.
- Brown, D., Laboureur, P.** (1983) The aerobic biodegradability of primary aromatic amines, *Chemosphere*, Vol.12, pp. 405-414.
- Buratti, M., Valla, C., Xaiz, D., Brambilla, G., Colombi, A.** (2002) Determination of hexafluoroisopropanol, a sevoflurane urinary metabolite, by 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization, *J. Chromatogr. B*, Vol. 776, pp. 237–243.
- Busto, O., Guasch, J., Borrull, F.** (1996) Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, *J. Chromatogr. A*, Vol. 737, p. 205.
- Cardenes, Lourdes., Ayala, Juan H., Gonzalez, Venerando., Afonso Ana, M.** (2002) Fast microwave-assisted dansylation of *N*-nitrosamines Analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 946, pp. 133–140.
- Casal, S., Fernandes, J.O., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A.** (2002) Gas chromatographic–mass spectrometric quantification of 4-(5-)-methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction, *J. Chromatogr. A*, Vol. 976, pp. 285–291.
- Castillo, Monserrat., Barceló, Damià.** (2001) Characterisation of organic pollutants in textile wastewaters and landfill leachate by using toxicity-based fractionation methods followed by liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 426, pp. 253–264.
- Chang, Wei-Yan., Sung, Yu-Hsiang., Huang, Shang-Da.** (2003) Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 495, pp. 109-122.
- Chinchilla, Rafael., Dodsworth, David, J., Najera, Carmen and M. Soriano, Jose.** (2002) 2,7-Di-tert-butyl-Fmoc-P-OSu: A New Polymer-Supported Reagent for the Protection of the Amino Group, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 12, pp. 1817–1820.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Da Ponte, D.J.B., Roozen, J.P., Pilinik, W.** (1986) Effect of irradiation on the stability of minced cod, with and without hydrocolloids during frozen storage, *J. Food Technol.* Vol. 21, p. 33.
- Dalane, M., Skarping, G.**, (1985) Trace analysis of amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection IV. Determination of free aromatic amines using nitrogen-selective detection, *J. Chromatogr.* Vol. 331, p. 321.
- Decker, Claudia., Richling, Elke., Haring, Dietmar., Herderich, Markus., Schreier Peter.,** (1997) Analysis of heterocyclic aromatic amines in wine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectroscopy, *J. Chromatogr. A*, Vol. 791, pp. 71–77.
- Donlon, B., Razo-Flores, E., Luijten, M., Swarts, H., Lettinga, G., 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.*, Vol. 47, pp. 83 – 90.
- Draisci, R., Cavalli, S., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Palleschi, L.,** (1998) Improved ion chromatography–integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods, *J. Chromatogr.*, Vol. 35, p. 584.
- Eisert, R., Levsen, K.** (1996) Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water, *J. Chromatogr. A*, Vol. 733, pp. 143–157.
- E.K. Paleologos, S.D. Chytiri, I.N Savvaidis, M.G. Kontominas,** (2003) Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation, *J. Chromat. A*, Vol. 1010, pp. 217–224.
- Ekici, P., Leupold, G., Parlar, H.** (2001) Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems, *Chemosphere*, Vol. 44, pp. 721–728.
- El-Bayoumy, K., Donahue, J.M, Hecht, S.S., Hoffmann, D.** (1986) Identification and quantitative determination of aniline and toluidines in human urine, *Cancer Res.*, Vol. 46, p. 6064.
- Eskilsson, Cecilia Sparr., Davidsson, Richard., 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*, Vol. 955, pp. 215–227.
- 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*, Vol. 886, pp. 183–195.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Fiddler, W., Pensabene, J.W. (1996) Supercritical fluid extraction of volatile N-nitrosamines in fried bacon and its drippings: method comparison, *J. AOAC Int.*, Vol. 79, p. 895.
- Flick, George J., Oria, Maria P., and Laura, Douglas, (2001) SYNOPSIS OF WORK OF IFT PANEL ON PROCESSING PARAMETERS NEEDED TO CONTROL HAZARDS IN COLD-SMOKED FISH, *J. Food Science*, Vol. 66, p. 7.
- Forehand, J.B., Dooly, G.L., Moldoveanu, S.C. (2000) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as sole sample clean-up step, *J. chromatogr. A*, Vol. 898, pp. 111-124.
- Fromberg, A., Nilsson, T., Larsen, B.R., Montanarella, L., Facchetti, S., Madsen, J.Q., (1996) *J. Chromatogr. A*, Vol. 746, p. 71.
- G., Colombi A. (2002) Determination of hexafluoroisopropanol, a sevoflurane urinary metabolite, by 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization, *J. Chromatogr. B*, V. 776, pp. 237-243.
- Garrigos M.C., Reche F., Marín M.L., Jimenez A. (2002) Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products, *J. Chromatogr. A*, Vol. 976, pp. 301-307.
- Gennaro, M.C., Marengo, E., Gianotti, V., Angioi, S., (2002) Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of mono-, di- and trichloroanilines through a gradient elution optimised by experimental design, *J. Chromatogr. A*, Vol. 945, pp. 287-292.
- Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo-Castro, R., Domenech-Carbo, M.T., Bosch-Reig, F., Domenech-Carbo, A., De la Cruz-Canizares, J., Casas-Catalan, M.J. (2002) Analytical study of proteinaceous binding media in works of art by gas chromatography using alkyl chloroformates as derivatising agents, *Talanta* Vol. 56, pp. 71-77.
- Gray, J. I. and Stachiw, M. A. (1987) . Formation of N-nitrosamines in low moisture systems, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol.70, p. 64.
- Grimmer, Gernot., Dettbarn, Gerhard., Seidel, U. Albrecht, Jacob Jurgen. (2000) Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers, *The Science of the Total Environment*, Vol. 247, pp. 81-90.
- Gross, G.A. and Grüter, A. (1992) Quantitation of mutagenic-carcinogenic heterocyclic aromatic in food products, *J. Chromatogr.*, Vol. 592, p. 271.
- Hlavica, P., Golly, I., Lehnerer, M., Schulze, J. (1997) Primary aromatic amines: their N-oxidative bioactivation, *Hum. Exp. Toxicol.*, Vol.16, p. 441.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Hotchkiss, J. H., (1989) Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages, *Cancer Surv.* Vol. 8, pp. 293-321.
- Husek, Petr., (1991) Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids, *J. Chromatogr. A*, Vol. 552, p. 289.
- Husek, Petr., Sweeley, C.C., (1991) Identification of side-products formed by derivatization of 2-hydroxycarboxylic acids with methyl and ethyl chloroformate, *J. High Res. Chromatogr.*, Vol. 14, p. 751.
- Husek, Petr., Hang, Zhi-Heng. and Sweeley, Charles C. (1992) Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkyl chloroformates. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 259, pp. 185-192.
- Kago, M., Akiyama T. And Shinohara R. (1980) *Bunseki Kagaku*, Vol. 30, p. 745.
- Karpas, Zeev., Tilman, Boris., Gdalevsky, Rachel., Lorber, Avraham. (2002) Determination of volatile biogenic amines in muscle food products by ion mobility spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 463, pp. 155-163.
- Kataoka, H., Ohrui, 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*, Vol. 633, p. 311.
- Kataoka, H., Shindoh, S. and Makita, M. (1996) Selective determination of volatile N-nitrosamines by derivatization with diethyl Chlorothiophosphate and gas chromatography with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 723, p. 93.
- Kataoka, H., (1996) Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, Vol. 733, pp.19-34.
- Kataoka, H., Shindoh, S. and Makita, M., (1995) Determination of secondary amines in various foods by gas chromatography with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 695, p. 142.
- Kawata, Kuniaki., Ibaraki, Tsuyoshi., Tanabe, Akiko., Yagoh, Hiroaki., Shinoda, Akiko., Suzuki, Hiroshi., Yasuhara, Akio., (2001) Gas chromatographic-mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt, *J. Chromatogr. A*, Vol. 911, pp. 75-83.
- Kim, Kyoung-Rae, Kim, Jung-Han., Oh, Chang-Hwan, Mabry Tom, J., Capillary gas chromatography of protein amino acids as N(O,S)-isobutyloxycarbonyl tert-butyltrimethylsilyl derivatives in aqueous samples. (1992) *J. Chromatogr. A*, Vol. 605, pp. 241-249.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kim, Kyoung-Rae, Kim, Jung-Han., Cheong, Eun-ji., Jeong, Chan-min.** (1996) Gas chromatographic amino acid profiling of wine samples for pattern recognition, *J. Chromatogr. A*, Vol. 722, pp. 303-309.
- Kimura, Jun., Karube, Isao., Schmid Rolf, D.,** (1992) Thin-film polyamine biosensor: substrate specificity and application to fish freshness determination, *Analitica Chem. Acta*, Vol. 263, pp. 93-100.
- Kirschbaum, Jochen., Rebscher, Kertsin., Bruckner, Hans,** (2000) Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride, *J. Chromatogr. A*, Vol. 881, pp. 517-530.
- Knapp, D.R.,** (1979) Handbook of Analytical Derivatization Reactions, *Jhon Wiley and Sons, Inc.*, p. 2.
- Knepper, T.P., Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Karrenbrock, F., Roerden, O., Lindner, K.,** (1999) Detection of polar organic substances relevant for drinking water, *Waste Management*, Vol. 19, pp. 77-99.
- Kutlan, D., Molnar-Perl, I.** (2003) New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthalaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography Analysis of wine, beer and vinegar, *J. Chromatogr. A*, Vol. 987, pp. 311-322.
- Laha, S., Luthy R.G.** (1990) Oxidation of aniline and other primary aromatic amines by manganese dioxide, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 24, pp. 363-373.
- Liu, Xin., Wang Hong., Liang Shu-Cai., Zhang Hua-Shan,** (2001) Determination of primary and secondary aliphatic amines by *N*-hydroxysuccinimidyl 4,3,2-naphthapyrone-4-acetate and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 441, pp. 45-52.
- Lloret, S. Meseguer., Legua, C. Molins., Falco, P. Campins.** (2002) Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packings Application to the screening analysis in environmental water samples, *J. of Chromatogr. A*, Vol. 978, pp. 59-69.
- Lloret, S. Meseguer, Molins Legua C., Verdú Andrés J., Campyngs Falcó P.,** (2004) Sensitive determination of aliphatic amines in water by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1035, pp. 75-82.
- Ma, T.S. and Ladas, A.S.** (1976) Organic Functional Group Analysis by Gas Chromatography, *Acedemic Press*, Vol. 76, p. 20.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- McKenzie Jacinth, A.M., Watson Christopher, J., Rostand Rebecca, D., German, Igor., Witowski Steven, R., Kennedy Robert, T. (2002) Automated capillary liquid chromatography for simultaneous determination of neuroactive amines and amino acids, *J. Chromatogr. A*, Vol. 962, pp. 105–115.
- Moradian, Allen., Mohr, Gerhard, J., Linnhoff, Michael., Fehlmann, Marc., Spichiger-Keller Ursula, E. (2000) Continuous optical monitoring of aqueous amines in transfectance mode, *Sensors and Actuators B*, Vol. 62, pp. 154–161.
- Muller, L., Fattore, E., Benfenati, E. (1997) Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples, *J. Chromatogr. A*, Vol. 791, pp. 221.
- Neumann, H.G., (1984) It may be hazardous to your health, *Arch. Toxicol.*, Vol. 56, p. 1.
- Neumann, H.G., van Dorp, C., Zwirner-Baier, I. (1995) *Toxicol. Lett.* Vol. 771, pp. 82–83.
- Neurath, G.B., Dunger, M., Pein, F.G., Ambrosius, D. And Schreiber, O. (1977) Primary and secondary amines in the human environment, *Food Cosmet. Toxicol.*, Vol.15, p. 275.
- Oh, Chang-Hwan., Kim, Jung-Han., Kim, Kyoung-Rae., Mabry Tom, J., (1995) Rapid gas chromatographic screening of edible seeds, nuts and beans for non-protein and protein amino acids, *J. Chromatogr. A*, Vol. 708, pp. 131-141.
- Oh, Chang-Hwan., Kim, Jung-Han., Kim, Kyoung-Rae., Bronson Delia, M. And Mabry Tom, J. (1994) Simultaneous gas chromatographic analysis os non-protein and protein amino acids as N(O,S)-isobutyloxycarbonyl tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr. A*, Vol. 669, pp. 125-137.
- Ono, Yoshiro., Somiya, Isao and Oda, Yoshimitsu. (2000) Identification of a Carciogenic Heterocyclic Amine in River Water, *Wat. Res.*, Vol. 34, pp. 890-894.
- Öllers, Sjef., Singer Heinz, P., Fassler, Philipp., Müller Stephan, R. (2001) Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low- ng/l level in surface and waste water, *J. Chromatogr. A*, Vol. 911, p. 234.
- Pagga, U., Brown, D. (1986) The degradation of dyestuffs: Part II Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests, *Chemosphere*, Vol. 15, pp. 479-91.
- Paleologos, E.K., Chytiri, S.D., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., (2003) Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid cromatographic seperation, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1010, pp. 217–224.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Palmiotto, G., Pierraccini, G., Moneti, G., Dolara, P.** (2001) Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy, *Chemosphere*, Vol. 43, pp. 355-361.
- Persson, B.A. and Schill, G.** (1993) Ion-Pair Ekstraktion in Chromatography, *Jhon Wiley and Sons Ltd.*, pp. 253-265.
- Pfundstein, B., Tricker, A. R., Theobald, E., Spiegelhalder, B., and Preussmann, R.** (1991) Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990, *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 29, p. 733.
- Pichon, V.** (2000) Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water, *J. Chromatogr. A*, Vol. 885, pp. 195-215.
- Pineda, Renan., Knapp, Allen, D., Hoekstra John, C., Johnson Dennis, C.** (2001) Integrated square-wave electrochemical detection of biogenic amines in soybean seeds following their separations by liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 449, pp. 111-117.
- Pinheiro, H.M., Touraud, E., Thomas, O.,** (2004) Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dyes and Pigments*, Vol. 61, pp. 121-139.
- Poels, I., Nagels, L.J.** (2001) Potentiometric detection of amines in ion chromatography using macrocycle-based liquid membrane electrodes, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 440, pp. 89-98.
- Razo-Flores, E., Donlon, B., Lettinga, G., Field, JA.** (1997) Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 20, pp. 525-38.
- Reche, F., Garrigos, M.C., Marín, M.L, Jimenez, A.** (2002) Determination of N-nitrosamines in latex by sequential supercritical fluid extraction and derivatization, *J. Chromatogr. A*, Vol. 976, pp. 301-307
- Rinde, E. and Trol, W.** (1975) 1975. Metabolic reduction of benzidine azo dyes to benzidine in the rhesus monkey, *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 55, pp. 181.
- Ruhl, C., Adams, J.D., Hoffman, D.,** (1980) Chemical studies on tobacco smoke. LXVI. Comparative assessment of volatile and tobacco-specific N-nitrosamines in the smoke of selected cigarettes from the USA, West Germany and France. *J. Anal. Toxicol.* Vol. 4, p. 255.
- Sacher, F., Lenz, S., Brauch, HJ.** (1997) Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride, *J. Chromatogr. A*, Vol. 764, pp. 85-93.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sahasrabuddhey, Bhushan., Jain, Archana and Verma Krishna, 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*, Vol. 124, pp. 1017–1021.
- Saurina, Javier., Hernández-Cassou, Santiago.** (1999) Flow-injection and stopped-flow completely continuous flow spectrophotometric determinations of aniline and cyclohexylamine, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 396, pp. 151–159.
- Schmidt, Torsten, C., Less, Melanie., Haas, Rainer., Low Eberhard, von., Steinbach Klaus., Stork, Gottfried.** (1998) Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine. I. Derivatization, *J. Chromatogr. A*, Vol. 810, pp. 161–172.
- Schmidt, T.C., Haas R., Steinbach K., von Low E.** (1997) Derivatization of aromatic amines for analysis in ammunition wastewater. I. Derivatization via bromination of the aromatic ring, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Vol. 357, pp. 909–914.
- Seiler, J. P.** (1977) Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, Vol. 58, p. 353.
- Shafi, N., Midgley, J.M., Watson, D.G., Smail, G.A.** (1989) Analysis of biogenic amines in the brain of the american cockroach (*periplaneta americana*) by gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, Vol. 490, pp. 9–19.
- Shakila R, Jeya., Vasundhara, T.S., Kumudavally, K.V.** (2001) A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in .sh and shery products, *Food Chemistry*, Vol. 75, pp. 255–259.
- Shaul, GM., Holsdworth, T.J., Dempsey, CR., Kotsal, KA.** (1991) *Chemosphere*, Vol. 22, pp. 107–119.
- Singh, Vandana., Gupta, Manju., Jain, Archana., K. Verma, Krishna.** (2003) Determination of aromatic primary amines at mg l level in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry involving *N*-allyl-*N* 9-arylthiourea formation and their on-line pyrolysis to aryl isothiocyanates, *J. Chromatogr. A*, Vol. 1010, pp. 243–253.
- Skarping, G., Bellander, T. and Mathiasson, L.** (1986) Determination of piparazine in working atmosphere and in human urine using derivatization and capillary gas chromatography with nitrogen- and mass-selective detection, *J. Chromatogr. A*, Vol. 370, pp. 245–258.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Skarping, G., Dalene, M., Brorson, T., Sandström, J.F., Sagö, C., Tiljander, A. (1989) Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. I. Determination of 1,6-hexamethylenediamine using glass capillary gas chromatography and thermionic specific detection, *J. of Chromatogr. A*, Vol. 479, pp. 125-133.
- Skog, K.I., Jagerstad, M.I., Solyakov, Alexey., Arvidsson, Patrik. (1998) Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, Vol. 803, pp. 227-233.
- Skog, K.I., Johansson, M.A., Jagerstad, M.I., (1998) Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods - A Review on Formation, Occurrence and Intake", *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 36, pp. 879.
- Smith, T. A., (1980) Identification and reduction of toxic pollutants in textile mill effluents, *Food Chem.*, Vol. 6, pp. 169 – 200.
- Solomons, Graham and Fryhle, Craig, (2000) *Organik Kimya* (7. Basımdan Çeviri), Literatür Yayıncılık.
- Song, S., Ashley, D.L., (1999) "Supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in cigarettes", *Anal. Chem.*, Vol. 71, p. 1303.
- Spyridaki, Maria-Helen E., Tsitsimpikou, C.J., Siskos, P.A., Georgakopoulos, C.G. (2001) Determination of ephedrine in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J. chromatogr. B*, Vol. 758, pp. 311-314.
- Standara, S., Vesela, M. and Drdak, M. (2000), Determination of biogenic amines in cheese by ion Exchange chromatography, *Nahrung*, Vol.44, pp. 28-31.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W, Taylor, S. L. (1991) Developments in the high-performanceliquid chromatography of metallo-organic compounds, *J. Food Protect.*, Vol. 54, p. 460.
- Szaefer, Hanna., Jodynys-Liebert, Jadwiga., Cichocki, Michal., Matuszewska, Arleta., Baer-Dubowska, Wanda. (2003) Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by *o*-toluidine, *Toxicology*, Vol. 186, pp. 67-77.
- Tan, NCG., Prenafeta-Boldu, FX., Opsteeg, J., Lettinga, G., Field, JA. (1999) Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 51, pp. 865-71.
- Takatsuki, K. and Kikuchi, T. (1990) Determination of N-nitrosodimethylamine in fish products using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr.*, Vol. 508, p. 357.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Terashi, Akiko., Hanada, Yoshifumi., Kido, Azuma., Shinohara, R.** (1990) Determination of primary and secondary aliphatic amines in environment as sulphonamide derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Vol. 503, pp. 369-375.
- Thomsen, M., Willumsen, D.** (1981) Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reserved-phase ion-pair liquid chromatography, *Chromatogr.*, Vol. 211, p. 213.
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T.,** (2000) Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract, *J. Chromatogr. A*, Vol. 880, pp. 101-112.
- Toribio, E., Moyano, L., Puignou M.T., Galceran.** (2002) Ion-Trap Tandem Mass-Spectrometry for the Determination of Heterocyclic Amines in Food", *J Chromatogr. A*, Vol. 948, pp. 267-281.
- Tsikak, D., Valasquez, R., Tolendano, C. and Brunner, G.** (1993) Ion-pair extraction of histamine from biological fluids and tissues for its determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J.Chromatogr.* Vol.614, pp. 37-41.
- Tsukioka, Tadashi., Ozawa, Hideaki., Murakami, Tetsuro.** (1993) Gas chromatographic-mass spectrometric determination of lower aliphatic tertiary amines in environmental samples. *J. Chromatogr.*, Vol. 642, pp. 395-400.
- Türkiye Çevre Vakfı** (1995) Türkiye'nin Çevre Sorunları, *Türkiye Çevre Vakfı Yayını*, Önder Matbaa, Kasım, s. 91.
- Vale, Silvana., Beartiz, M., Gloria, A.** (1998) Biogenic amines in Brazilian cheeses, *Food Chemistry*, pp. 343-348.
- Vidal-Carou, M. Carmen., Lahoz-Portoles, Ferda., Bover-Cid, Sara., Marine-Font, Abel.** (2003) Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages, *J. Chromatogr. A*, Vol. 998, pp. 235-241.
- Vitali, P., Venturini, E., Bonora, C., Calori, R., Raffaelli, R.** (1994) Determination of Triazines and Dinitroanilines in Waters by HPLC after SPE, *J. Chromatogr. A*, Vol. 660, pp. 219-222.
- Weiss, Tobias., Angerer, Jürgen.** (2002) Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, Vol. 778, pp. 179-192.
- Will, W.,** (1995) Biomonitoring of heterocyclic aromatic amine metabolites in human urine, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Vol. 353, pp. 215.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Wittmann, Gy., Van Langenhove, H., Dewulf, J. (2000) Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, Vol. 874, pp. 225–234.
- Yamamoto, S., Itano, H., Kataoka, H. and Makita, M. J. (1982) Gas chromatographic method for the determination of urinary acetylpolyamines. *J. Chromatogr. B*, Vol. 233, pp. 29–38.
- Yang, X.H., Lee, C. And Scranton, M.I. (1993) Determination of nanomolar concentrations of individual dissolved low molecular weight amines and organic acids in sea water. *Anal. Chem.*, Vol. 65, p. 572.
- Zhao, Yuan-Yuan., Jing, Zhi-Zhong., Wang, Hong., Zhang, Hua-Shan., Yu, Jian-Xin. (2002) Analysis of aromatic amines in water samples by liquid–liquid–liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 468, pp. 255–261.
- Zhang, A.Q., Mitchell, S.C., Ayesh, R. And Smith, R.L. (1992) Determination of trimethylamine and related aliphatic amines in human urine by head-space gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, Vol. 584, pp. 141.
- Zhu, L, Tay, CB, Lee, HK. (2002) Liquid–liquid–liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Vol. 963, pp. 149–56.

BİBLİYOGRAFYA

Tricker, A.R., R. Preussmann, (1991) *Mutat. Res.*, Vol. 259, p. 277.

Tricker, A.R., R. Preussmann, (1992) *Clin. Invest.*, Vol. 70, p. 283.

Shalaby, A.R., (1996) *Food Res. Intern.* Vol. 29, p. 675.

Hinsberg, O. (1980) *Chem. Berg.*, Vol.23, p. 2962.

Husek, P., (1991) *J. Chromatogr. A*, Vol. 552, p. 289.

Husek, P., C.C. Sweeley, (1991) *J. High Res. Chromatogr.*, Vol. 14, p. 751.

Shaul, GM., Holsdworth., Dempsey, TJ., Kostal K.A., CR. (1991), *Chemosphere*, Vol. 22, pp. 107-119.

Ternes, T.A., Hirsch R., Mueller, J., Haberer, K., (1998) *Fresenius J. Anal. Chem.*, Vol. 362, p. 329.

ÖZGEÇMİŞ

Şevket ATA 1979 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 1997 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Devrek Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2001 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2002 yılından beri ZKÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ

Adres: Karaelmas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, Zonguldak

Tel: (372) 257 4010-1388

Faks: (372) 257 4181

E-posta: sevketa@yahoo.com