

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENATÜRE ETİL ALKOL İÇİNDEKİ METİL ve t-BUTİL ALKOL'ÜN GAZ
KROMATOĞRAFI/ALEV İYONLAŞMALI DEDEKTÖR (GC/FID) YÖNTEMİ
İLE TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE METODUN
VALİDASYONU

Beril YÜCEL

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DENATÜRE ETİL ALKOL İÇİNDEKİ METİL ve t-BUTİL ALKOL'ÜN GAZ KROMATOĞRAFI/ALEV İYONLAŞMALI DEDEKTÖR (GC/FID) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE METODUN VALİDASYONU

Beril YÜCEL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Kübra İNAL

Etil alkol gıda, içecek ve kişisel bakımdan ilaç ve elektroniğe kadar birçok farklı sektörde kullanım alanına sahiptir. Birçok ülke, alkollü içeceklerde veya gıdalarda kullanılabilecek her türlü alkole özel tüketim vergisi uygularken insan tüketimi için uygun olmayan etil alkol bu özel tüketim vergilerinden muaftır. “Denatüre alkol” terimi, benzen, piridin, dietil ftalat, nafta, aseton, tersiyer butil alkol, denatonyum benzoat gibi denatüran adı verilen toksik ve/veya tadı kötü olan katkı maddeleriyle karıştırılmış ve insan tüketimi için uygun olmayan alkol ürünlerini ifade etmektedir. Bu nedenle, denatüre etil alkol yüksek oranda vergilendirilmiş saf alkol ve içilebilir alkole kıyasla endüstriyel amaçlar için daha düşük maliyetli çözücü olarak kullanılmaktadır. 30/10/2011 tarihli ve 28100 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan “Etanol ve metanolün üretimi ile iç ve dış ticaretine ilişkin usul ve esaslar hakkında yönetmelik”e göre denatürasyon, farklı denatüranların belirlenen miktarlarda katılması suretiyle gerçekleştirilmektedir. Hem ürünlerine denatüran ekleyen şirketler hem de yönetmeliğe uygunluğu izleyen devlet kurumları, denatüre etil alkol içeren ürünlerin hızlı ve güvenilir analizi için basit bir analitik tekniğe ihtiyaç duymaktadır. Bu tez çalışmasında, denatüre etil alkol analizi için gaz kromatografi alev iyonlaşmalı dedektör ile metot geliştirilerek valide edilmiştir. Optimum koşullar altında korelasyon katsayısı tersiyer butil alkol ve metil alkol için sırasıyla 0,9904 ve 0,9963 olarak bulunmuştur. Ticari amaçla kullanılacak 3 farklı seriye ait gümrükten temin edilen denatüre etil alkol numuneleri ve piyasadan satın alınan farklı markalara ait dezenfektanlar geliştirilen bu yöntem ile analiz edilmiştir.

Eylül 2024, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Denatüre, etil alkol, metil alkol, t-butil alkol, gaz kromatografi, alev iyonlaşmalı dedektör

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF METHYL AND t-BUTYL ALCOHOL IN DENATURATED ETHYL ALCOHOL WITH GC/FID METHOD AND METHOD VALIDATION

Beril YÜCEL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Emine Kübra İNAL

Ethyl alcohol is used in a wide range of industries, from food, beverages and personal care to pharmaceuticals and electronics. While many countries impose excise duties on any alcohol that can be used in alcoholic beverages or food, ethyl alcohol that is not fit for human consumption is exempt from these excise duties. The term “denatured alcohol” refers to alcohol products that are adulterated with toxic and/or bad-tasting additives called denaturants, such as benzene, pyridine, diethyl phthalate, naphtha, acetone, tertiary butyl alcohol, denatonium benzoate, etc. and are not fit for human consumption. Therefore, denatured ethyl alcohol is used as a lower cost solvent for industrial purposes compared to highly taxed pure alcohol and potable alcohol. According to the “Regulation on the procedures and principles regarding the production and domestic and foreign trade of ethanol and methanol” published in the Legal Gazette dated 30/10/2011 and numbered 28100, denaturation is carried out by adding different denaturants in specified amounts. Both companies adding denaturants to their products and government agencies monitoring compliance with the regulation need a simple analytical technique for fast and reliable analysis of products containing denatured ethyl alcohol. In this thesis, a gas chromatography flame ionization detector method for the analysis of denatured ethyl alcohol was developed and validated. The correlation coefficient under optimum conditions was found to be 0,9904 and 0,9963 for tertiary butyl alcohol and methyl alcohol, respectively. Denatured ethyl alcohol samples obtained from customs belonging to 3 different series to be used for commercial purposes and disinfectants of different brands purchased from the market were analyzed by this method.

September 2024, 70 pages

Key Words: Denatured, ethyl alcohol, methyl alcohol, t-butyl alcohol, gas chromatography, flame ionization detector

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine Kübra İNAL'a,

Çalışmalarım sırasında bilgi, öneri ve deneyimleriyle tezime ışık tutan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Abdülkadir AKAY ve Sayın Prof. Dr. Orhan ATAOL'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her konuda destek olan sevgili meslektaşım ve kıymetli dostum Erdal EMİR'e ve

Her daim yanımda olan, bana güç veren canım annem Fadile ÖZYURT ve canım kardeşim Berk YÜCEL'e, zor anlarımda beni cesaretlendiren, yorulduğumda bana güç veren sevgili eşim Ali Can DİYARBAKIRLI'ya en derin teşekkürlerimi sunarım.

Beril YÜCEL
Ankara, Eylül 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve/veya KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 Etil alkol (Etanol)	6
2.2 Metil alkol (Metanol)	6
2.3 t-Butil alkol (Tersiye büt il alkol)	7
2.4 Denatüre alkol	7
2.4.1 Denatüre alkolün kullanım alanları	8
2.4.2 Denatü r an türleri	9
2.5 Kromatografi	10
2.5.1 Kromatografi türleri.....	11
2.6 Gaz Kromatografisi	11
2.6.1 Gaz kromatografisi kullanım alanları ve önemi	13
2.6.2 Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler.....	13
2.6.2.1 Alev iyonlaş ma dedektörü (FID)	13
2.6.2.2 Termal iletkenlik dedektörü	14
2.6.2.3 Elektron yakalama dedektörü	15
2.6.2.4 Termiyonik dedektör	15
2.6.2.5 Fotoiyonizasyon dedektör.....	15
2.6.2.6 Helyum iyonizasyon dedektör.....	16
2.6.2.7 Alev fotometrik dedektör	16
2.6.2.8 Kemilü minesans dedektör	16
2.6.2.9 Atomik emisyon dedektörü	17
2.7 Gaz kromatografisinde kullanılan temel parametreler.....	18
2.7.1 Alıkonma zamanı	18
2.7.2 Teorik plaka sayısı	19
2.7.3 Kuyruklanma faktörü.....	19
2.7.4 Ayırma gücü (Rezolüsyon)	20
2.8 Laboratuvar iç i analitik metot validasyonu.	21
2.8.1 Miktar tayini yöntem validasyonu.....	22
2.8.2 Analitik metot validasyon parametreleri.	22
2.8.2.1 Seçicilik.	22
2.8.2.2 Sistem uygunluk.	23
2.8.2.3 Kesinlik.	23
2.8.2.4 Sistem kesinliğı.	23
2.8.2.5 Yöntem kesinliğı (Tekrarlanabilirlik).....	24
2.8.2.6 Laboratuvar iç i kesinlik.	24
2.8.2.7 Doğrusallık.....	24

2.8.2.8 Doğruluk (%Geri kazanım).	25
2.8.2.9 Çalışma aralığı.....	25
2.8.2.10 Sağlamlık.....	26
2.8.2.11 Çözelti stabilitesi.	27
2.9 Kaynak Özetleri	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1 Materyal	31
3.2 Yöntem	32
3.3 Çözeltilerin hazırlanışı.....	33
3.3.1 Metil alkol stok çözeltisi.....	33
3.3.2 t-Butil alkol stok çözeltisi.....	34
3.3.3 Etil alkol stok çözeltisi	38
3.3.4 Numune çözeltileri	38
3.3.5 Doğruluk çözeltileri.....	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1 Validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi	46
4.1.1 Seçicilik/Spesifiklik	46
4.1.2 Sistem uygunluğu	48
4.1.3 Doğrusallık	50
4.2 Metil alkol doğrusallık sonuçları	50
4.3 t-Butil alkol doğrusallık sonuçları	51
4.4 Doğruluk	54
4.5 Alt tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	55
4.6 Kesinlik	55
4.7 Sağlamlık.....	59
4.8 Stabilitate	62
5. SONUÇ	64
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER DİZİNİ

C ₂ H ₅ OH	Etil Alkol
CH ₃ OH	Metil Alkol
C ₄ H ₁₀ O	t-Butil Alkol
CS ₂	Karbon Disülfür
COS	Karbonil Sülfür
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
SO ₂	Kükürt Dioksit
CO	Karbon Monoksit
NO	Azot Monoksit
NO ₂	Azot Dioksit
°C	Santigrat
g/cm ³	Gram/santimetreküp
g/kg	Gram/kilogram
cm/s	Santimetre/saniye
kPa	Kilo paskal
g	Gram
ppm	Milyonda kısım (mg/L)
β	Beta
mL	Mililitre
R ²	Korelasyon katsayısı
m	Metre
mm	Milimetre
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
GSC	Gaz-Katı Kromatografisi
GLC	Gaz-Sıvı Kromatografisi
GC/FID	Gaz Kromatografisi Alev İyonlaşmalı Dedektör
SPL	Split/splitless Enjeksiyon Bloğu
HS-GC-MS	Head-Space Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi
FID	Alev İyonlaşma Dedektörü
TCD	Termal İletkenlik Dedektörü
ECD	Elektron Yakalama Dedektörü
NPD	Azot - Fosfor Dedektörü veya Termiyonik Dedektör
FPD	Alev Fotometrik Dedektör
PID	Fotoiyonizasyon Dedektörü
AED	Atomik Emisyon Dedektörü
HID	Helyum İyonizasyon Dedektörü
SD	Standart Sapma
RSD	Bağıl Standart Sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Etil alkol (Etanol).....	6
Şekil 2.2 Metil alkol (Metanol).....	7
Şekil 2.3 t-Butil alkol (Tersiyer butil alkol).....	7
Şekil 2.4 Kromatografi türleri	11
Şekil 2.5 Gaz kromatografisi şematik diyagramı	12
Şekil 2.6 FID'deki alev sürecinin şematik diyagramı	13
Şekil 3.1 Analizde kullanılan GC cihazı	34
Şekil 4.1 Yapılan tüm kromatografik denemelere ait değişen parametre özetleri	39
Şekil 4.2 Deneme-1'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	40
Şekil 4.3 Deneme-2'ye ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	40
Şekil 4.4 Deneme-3'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	41
Şekil 4.5 Deneme-4'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	41
Şekil 4.6 Deneme-5'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	42
Şekil 4.7 Deneme-6'ya ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	42
Şekil 4.8 Deneme-7'ye ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	43
Şekil 4.9 Deneme-8'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	43
Şekil 4.10 Deneme-9'a ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	44
Şekil 4.11 Deneme-10'a ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	44
Şekil 4.12 Deneme-11'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogramı	45
Şekil 4.13 748,16 ppm metil alkol ait seçicilik kromatogramı	47
Şekil 4.14 775,56 ppm t-butil alkol'e ait seçicilik kromatogramı	47
Şekil 4.15 776,40 ppm etil alkol'e ait seçicilik kromatogramı	47
Şekil 4.16 Gümrük numunesi-1'e ait seçicilik kromatogramı	48
Şekil 4.17 Seçicilik parametresi için metil alkol (748,16 ppm) ve t-butil alkol (775,56 ppm) kromatogram karşılaştırması	48
Şekil 4.18 Metil alkol alkol için çizilen doğrusallık grafiği.....	51
Şekil 4.19 t-Butil alkol için çizilen doğrusallık grafiği.....	52
Şekil 4.20 Doğrusallık parametresi için hazırlanan metil alkol çözeltileri kromatogram karşılaştırması	53
Şekil 4.21 Doğrusallık parametresi için hazırlanan t-butil alkol çözeltileri kromatogram karşılaştırması	53
Şekil 4.22 Gümrük-1, Gümrük-2 ve Gümrük-3 numuneleri için tekrarlanabilirlik parametresi örnek kromatogramları karşılaştırması	57

Şekil 4.23 Kolonya-1 ve Kolonya-2 numuneleri için tekrarlanabilirlik parametresi örnek kromatogramları	58
Şekil 4.24 25 °C kolon sıcaklığı ve 30 °C kolon sıcaklığına ait örnek metil alkol ve t-butil alkol kromatogramları karşılaştırması	61
Şekil 4.25 0,30 mL/dk. akış hızı ve 0,44 mL/dk. akış hızına ait örnek metil alkol ve t-butil alkol kromatogramları karşılaştırması	61
Şekil 4.26 180 °C SPL ve 220 °C SPL sıcaklığına ait örnek metil alkol ve t-butil alkol kromatogramları karşılaştırması	61



ÇİZGELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Yaygın kullanılan gaz kromatografi dedektörleri için seçicilik, LOD ve lineer aralık özetleri.....	17
Çizelge 2.2 Miktar tayini için validasyon parametreleri.....	22
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firmalar ve saflık dereceleri	31
Çizelge 3.2 Gümrükten gelen ticari etil alkol numuneleri	31
Çizelge 3.3 Piyasada alınarak analiz edilen numune örnekleri	31
Çizelge 3.4 Denemelere ait kromatografik şartlardaki değişen veriler.....	35
Çizelge 3.5 Metil alkol doğrusallık çözeltileri	37
Çizelge 3.6 t-Butil alkol doğrusallık çözeltileri	37
Çizelge 3.7 Metil alkol ve t-butil alkol doğruluk çözeltileri.....	38
Çizelge 4.1 Optimum koşullarda belirlenen kolon sıcaklığı programı	46
Çizelge 4.2 Seçicilik parametresine ait özet sonuçlar	46
Çizelge 4.3 Seçicilik parametresine ait gümrük numunesi-1 özet sonuçları	46
Çizelge 4.4 1:10 oranında hazırlanan metil alkol standart-1 sistem uygunluk sonuçları	49
Çizelge 4.5 1:10 oranında hazırlanan metil alkol standart-2 sistem uygunluk sonuçları	49
Çizelge 4.6 1:10 oranında hazırlanan t-butil alkol standart-1 sistem uygunluk sonuçları	49
Çizelge 4.7 1:10 oranında hazırlanan t-butil alkol standart-2 sistem uygunluk sonuçları	49
Çizelge 4.8 1:10 oranında hazırlanan standart-1 ve 2 metil alkol çözeltilerine ait % benzerlik sonucu	50
Çizelge 4.9 1:10 oranında hazırlanan standart-1 ve 2 t-butil alkol çözeltilerine ait % benzerlik sonucu	50
Çizelge 4.10 Metil alkol doğrusallık çözeltileri ve ortalama pik alanları	51
Çizelge 4.11 t-Butil alkol doğrusallık çözeltileri ve ortalama pik alanları	52
Çizelge 4.12 Metil alkol doğruluk parametre sonuçları.....	54
Çizelge 4.13 t-Butil alkol doğruluk parametre sonuçları	54
Çizelge 4.14 Metil alkol ve t-butil alkol için LOQ ve LOD sonuçları	55
Çizelge 4.15 Tekrarlanabilirlik parametre sonuçları.....	56
Çizelge 4.16 Laboratuvar içi kesinlik parametre sonuçları.....	58

Çizelge 4.17 Tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi kesinlik sonuçları arasındaki % fark	59
Çizelge 4.18 Sağlamlık parametre sonuçları-1	60
Çizelge 4.19 Sağlamlık parametre sonuçları-2	62
Çizelge 4.20 Stabilite parametre sonuçları-1	63
Çizelge 4.21 Stabilite parametre sonuçları-2	63



1. GİRİŞ

"Alkol" kelimesini modern anlamında ilk kez kullanan kişi Paracelsus'tur. Paracelsus, 16. yüzyılda yaşayan bir simyacı ve doktor olarak, bu terimi "spiritus vini" yani "şarap ruhu" anlamında kullanmıştır. Ancak, "alkol" kelimesinin kökeni Paracelsus'tan çok daha eskiye dayanır. Kelime, Arapça "al-kuhl" (ال كحل) kelimesinden türemiştir. Arapça'da "al-kuhl," ince toz haline getirilmiş bir mineral olan "antimon" için kullanılırdı ve özellikle gözlere sürme olarak uygulanan bir maddeyi tanımlardı. Zamanla, bu kelime genel olarak ince öğütülmüş tozlar ve daha sonra damıtılmış maddeler için kullanılmaya başlandı. Paracelsus, bu kelimeyi daha spesifik bir kimyasal anlamda, özellikle şarap gibi maddelerin damıtılmasıyla elde edilen uçucu sıvı için kullanarak modern anlamını oluşturdu. Bu nedenle, "alkol" terimi, Paracelsus'un katkılarıyla modern kimya ve tıpta bugünkü anlamını kazanmıştır (Mahdihassan 1980).

Tarih boyunca insan toplumları, yerel habitatlarında bulunan şeker kaynaklarından fermente içecekler yapmayı keşfetmiştir. Fermente içecek üretiminin evrensel olgusu, etil alkolün ağrı kesici, dezenfektan ve yoğun zihin bulanıklığına yol açan etkilerinin birleşimiyle açıklanır. Ayrıca, fermantasyon, yiyecek ve içeceklerin besin değerini korumaya ve artırmaya yardımcı olur. Fermente içeceklerin sağladığı farmakolojik, besleyici ve duyuşsal faydaları nedeniyle kültürün ve teknolojinin gelişiminde kilit rol oynamış; tarım, bahçecilik ve gıda işleme tekniklerinin ilerlemesine ve yoğunlaşmasına katkıda bulunmuştur. Toplumun her kesiminde, doğumdan ölüme, zaferlerden hasatlara kadar önemli yaşam olaylarını işaret etmişlerdir. Hükümdarlar ve üst sınıf bireyler, genellikle özel fermente içeceklerin özel kaplarda sunulduğu ve içildiği büyük çapta ziyafetlere ilgi duymuşlardır. En gelişmiş biçimleriyle, bu tür kutlamalar toplum genelinde seküler veya dini törenlere dönüştürülmüştür.

Güney Kafkasya bölgesindeki Gürcistan'da erken Neolitik döneme (yaklaşık M.Ö. 6.000-5.000) ait yerleşim yerlerinden elde edilen çanak çömlek kumaşlarına nüfuz eden organik bileşiklerin kimyasal analizleri, Yakın Doğu'da üzüm şarabı ve bağcılığa ilişkin en eski biyomoleküler arkeolojik kanıtları ortaya koymaktadır. Yakın Doğu'da görülen en eski çanak çömleklerden bazıları olan geniş hacimli çömlekler büyük olasılıkla fermantasyon,

yıllandırma ve sunum kapları olarak kullanılmıştır. Bu bölgede M.Ö. VI. yüzyıl başlarında üzüm şarabının keşfedilmesi, Avrupa'da ve dünyanın geri kalanında alkolün gelecekteki tarihi açısından büyük önem taşımaktadır (McGovern vd., 2017).

Erken Neolitik dönemde, Çin'in Henan eyaleti Jiahu isimli köyünde ise çömlek ve çömleklere emilen antik organik maddelerin kimyasal analizleri, pirinç, bal ve meyveden (alıç meyvesi ve/veya üzüm) oluşan karışık fermente bir içeceğin milattan önce yedinci bin yılın başlarında üretildiğini ortaya koymuştur (McGovern vd., 2004).

Sanayi Devrimi ile alkol kullanımı üzerindeki kısıtlama ve düzenlemeleri güçlendirmiştir. 18. ve 19. yüzyılda alkollü içkilerin üretim maliyeti ve dolayısıyla fiyatı düşerek büyük alkollü içki tüketicileri haline gelen bir sanayi işçileri sınıfı yaratmıştır. Alkollü içecekler daha kolay bulunabilir ve daha ucuz hale gelmiştir (Dietler 2006).

Son on yılda alkolün üretimi, tüketimi, ticareti ve düzenlenmesinin ekonomik yönleri üzerine hızla büyüyen bir literatür oluşmuştur. Alkolün tarih boyunca gıda güvenliği ve sağlık üzerinde (hem olumlu hem de olumsuz) önemli bir rol oynadığı açıkça görülmektedir. Üretim teknolojileri ve firmalarının endüstriyel organizasyonu gibi tüketim kalıpları da son iki yüzyılda önemli ölçüde değişmiştir (Dietler 2006).

Alkolün önemi birçok farklı açıdan değerlendirilebilir:

- **Sosyal ve Kültürel Boyut:** Alkol, birçok kültürde sosyal etkileşimlerin ve kutlamaların önemli bir parçası olup toplumsal etkinliklerde ve özel günlerde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı kültürlerde, alkol ritüelleri dini törenlerde yer almaktadır.
- **Tıbbi Kullanım:** Alkol, bazı tıbbi uygulamalarda kullanım alanına sahiptir. Antiseptik olarak cilt temizliğinde veya bazı ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı içeceklerin bileşiminde de tıbbi bitkilerin alkollü ekstraktları bulunmaktadır.

- **Ekonomik Etki:** Alkol endüstrisi, birçok ülke için önemli bir ekonomik faktördür. Alkol üretimi, satışı ve tüketimi birçok kişiye istihdam sağlamakla birlikte vergi gelirlerinin önemli bir kaynağıdır.

Etil alkol genellikle meyvelerden fermantasyon ile elde edildiği gibi endüstriyel amaçlı melas, patates, şeker kamışı ve tahıllardan da elde edilmektedir. Fermantasyon sırasında, fermantasyon yöntemine göre değişen miktarlarda yan ürün olarak metil alkol ile birlikte çıkış maddesine göre eser miktarlarda etil alkole hoş koku kazandıran asetaldehit, etil etanoat, metil metanoat, 1-propanol, butan-2-ol, butan-1-ol, izomil alkol, 1-pentanol de açığa çıkmaktadır (Fidan ve Şahin 1983, Başoğlu vd. 1992).

Etil alkol adli toksikolojide sıkça karşılaşılan maddedir ve toplumda yaygın olarak kullanılır. Bu nedenle, alkollü araç kullanan şüpheli sürücülerin kan örneklerindeki alkol içeriğini tespit etmek ve ölçmek için güvenilir ve sağlam yöntemlerin bulunması önemlidir. Yaygın bir tespit yöntemi, numune hazırlama tekniklerinin kullanıldığı alev iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografisidir. Bu teknik hızlı ve güvenilirdir, ekstra bir numune hazırlığı veya ekstraksiyonu gerektirmez (Tylor vd., 2021).

Her ne amaçla olursa olsun, etil alkolün gerek üretim sonrası ve gerekse piyasaya sürülmeden önce analizi oldukça önemlidir. Metil alkol ise daha çok temizlik malzemesi olarak kullanılsa da yasadışı içki yapımında da kullanılıyor olması ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır.

Alkoller, kişisel bakımdan ev temizliğine kadar birçok farklı endüstride kullanıldığından, alkolün içsel özelliklerinin katkı maddelerinin eklenmesiyle değiştirilmemesi çok önemlidir; bu nedenle, katkı maddeleri kimyasal bileşimi etkilemeyecek şekilde seçilmelidir. Katkı maddeleri, alkolün performansını artırmak veya belirli özellikler kazandırmak için kullanılabilir. Ancak, bu maddelerin alkolün temel kimyasal yapısını değiştirmemesi gerekmektedir. Aksi takdirde, alkolün beklenen etkileri azalabilir veya istenmeyen yan etkiler ortaya çıkabilir. Alkol ürünlerinde katkı maddeleri seçilirken, güvenlik ve etkinlik de dikkate alınmalıdır. Özellikle kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde kullanılan alkol, doğrudan insan cildi ile temas ettiğinden, bu maddelerin

zararsız olması çok önemlidir. Alkol ve katkı maddeleriyle ilgili düzenlemeler ve standartlar, ürünlerin güvenliği ve etkinliğini sağlamak amacıyla belirlenmiştir. Bu standartlara uyulması hem tüketicilerin korunması hem de ürün kalitesinin korunması açısından gereklidir.

Alkolün yanlış ve kötüye kullanımı sağlık sorunlarına ve sosyal sorunlara yol açabileceğinden sorumlu bir şekilde kullanılması ve tüketiminde dikkatli olunması önemlidir. Özellikle kayıt dışı alkol kullanımı dünyanın tüm bölgelerinde oldukça yaygındır ve küresel olarak tüketilen toplam alkolün yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. El yapımı fermente içecekler ve yüksek alkollü içkiler küresel olarak en yaygın kayıt dışı alkol kategorisindedir. Hindistan'da endüstriyel olarak üretilen yüksek alkollü içkiler (country spirits) en yaygın olanlarıdır. Rusya ve eski Sovyetler Birliği ülkelerinde sahte alkoller el yapımı alkollü içkilerin tüketimini arttırmıştır. Özellikle Avrupa'nın bazı kesimlerinde kayıt dışı alkol elde etmenin en yaygın yöntemi ise ülkeler arası ticarettir. Dünya genelinde kayıtlara geçmeyen çok büyük miktarlarda alkol üretilmektedir. Bu tür alkolden kaynaklanan birincil zarar, genellikle ruhsatlı alkolden çok daha ucuz olmasından kaynaklanmaktadır. Kayıt dışı alkol genellikle birçok ülkede mevcut olan en ucuz alkol türü olduğundan, daha yüksek kronik bağımlılığa katkıda bulunabilir (Rehm vd., 2014).

Alkol, çok kötü tat ve/veya kokuya sahip ürünler ve (tercihen) kimyasal bir işaretleyici eklenerek insan tüketimi için uygun olmayan hale getirilebilir. Alkolü insan tüketimi için uygunsuz hale getirme işlemine alkolün (tamamen veya kısmen) denatüre edilmesi denir. Avrupa Birliği (AB) kurallarına göre denatüre edildiğinde özel tüketim vergilerinden (ÖTV) muaf tutulabilir. Bu, özellikle endüstriyel amaçlarla, gıda maddeleri ve ilaç üretmek ya da kozmetik, biyoyakıt, boya, antifriz ve temizlik ürünleri üretmek için kullanılan alkolü kapsamaktadır. Dolandırıcılığı önlemek ve tüketicileri yasadışı alkollü içki içmenin ciddi sağlık risklerinden korumak amacıyla ÖTV'den muaf olan alkol kategorileri için özel kurallar uygulanmaktadır (Anonymous 2008).

92/83/EEC sayılı Avrupa Birliği yönetmeliği, ÖTV muafiyetinden yararlanabilmek için, insan tüketimine yönelik olmayan alkolün ulusal düzeyde belirlenen uygun miktarlarda katkı maddeleri ile denatüre edilmesi gerektiğini belirtmektedir (Anonymous 2008). Bu amaçla, denatüranların derişimini belirlemek için uygun bir analitik yöntem uygulanmalıdır.

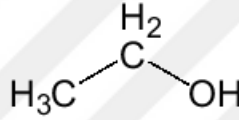
Etil alkol, t-butil alkol ve metil alkolün saflığı ve sentezi sırasında meydana gelen yan ürünlerin tayini ile çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte denatüre edilmiş alkol analizleri üzerine gaz kromatografi/alev iyonlaşma dedektörü (GC/FID) yöntemi ile literatürde valide edilmiş yeterli çalışmalar olmadığından bu tez çalışması planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında toplum sağlığı açısından oldukça önemli olan ve günlük yaşantımızda sıklıkla kullandığımız denatüre alkol bazlı ürünlerdeki t-butil alkol ve metil alkolün tayinine yönelik hızlı, kolay, yüksek duyarlılıkta ve kesinlikte analitik bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Etil Alkol (Etanol)

Kimyasal formülü C_2H_5OH olan etil alkol (etanol) organik bir kimyasal olarak çözücü, antiseptik, antifriz, yakıt gibi farklı kombinasyonlar ile çok sayıda kullanım alanına sahiptir. Etil alkol oda sıcaklığında uçucu, yanıcı, berrak ve renksiz bir sıvıdır. Su ile uygun şekilde seyreltildiğinde tadı gibi kokusu da hoş ve karakteristiktir. Yoğunluğu $0,790 \text{ g/cm}^3$ olan etil alkolün kaynama noktası $78,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ve erime noktası ise $-114,1 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. (Logsdon 2000).

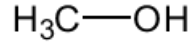


Şekil 2.1 Etil Alkol (Etanol)

2.2 Metil Alkol (Metanol)

Kimyasal formülü CH_3OH olan metil alkol (metanol) renksiz, polar, uçucu, yanıcı bir sıvıdır ve saf olduğunda hafif bir alkolik kokuya sahiptir. Yoğunluğu $0,792 \text{ g/cm}^3$ olan metil alkolün kaynama noktası $64,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ve erime noktası ise $-97,6 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Isıtıldığında karbon monoksit ve formaldehit açığa çıkararak bozunur. Metanol, perkloratlar, krom trioksit, brom, sodyum hipoklorit, klor ve hidrojen peroksit gibi oksitleyici maddelerle şiddetli reaksiyona girerek uçucu ve patlayıcı bileşikler oluşturur. Metanolün insanlar için öldürücü dozu kesin olarak bilinmemekle birlikte 0,3 ila 1 g/kg arasında değiştiği bildirilmektedir. Ölümcül metanol zehirlenmesi kurbanlarının otopsilerinde retina ve optik sinir dejenerasyonu ile iç organlarda, akciğerlerde ve merkezi sinir sisteminde çeşitli ödematöz, hemorajik ve dejeneratif değişiklikleri içeren ağır patoloji ortaya çıkmaktadır. Dünya çapında üretilen metanolün yaklaşık %70'i kimyasal sentezlerde kullanılmaktadır. Kullanılan ürünler arasında sırayla metil tersiyer-bütil eter (MTBE), formaldehit, asetik asit, metil metakrilat ve dimetil tereftalat yer almaktadır. Metanol, ekstraksiyon, yıkama, kurutma ve yeniden kristallendirme için endüstriyel ve laboratuvar

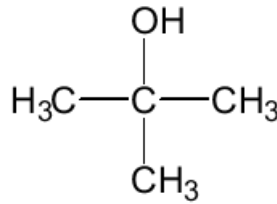
özücüsü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca boyalar, vernikler, gomalaklar, antifriz ve benzin buz çözücüsü, ön cam yıkama sıvıları, temizleme solüsyonları, çoğaltma makinelerindeki karışık solventler ve hobi yapıştırıcıları ve yapıştırıcılar dahil olmak üzere çok çeşitli ticari ve tüketici ürünlerinde bulunur (Anonymous 1997).



Şekil 2.2 Metil Alkol (Metanol)

2.3 t-Butil Alkol (Tersiyer Butil Alkol)

Kimyasal formülü $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ olan t-butil alkol (tersiyer butil alkol) beyaz kristal bir katı veya renksiz, yüksek derecede yanıcı bir sıvıdır ($25,7\text{ }^\circ\text{C}$ 'nin üzerinde) ve küf benzeri bir kokuya sahiptir. T-butil alkol, hidroksil fonksiyonel grubu içerir; alkol, eter ve diğer organik çözücülerle karışabilir ve suda özünür. Yoğunluğu $0,775\text{ g/cm}^3$ olan t-butil alkolün kaynama noktası $82\text{ }^\circ\text{C}$ ve erime noktası ise $25,7\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Suda, alkollerde, esterlerde, eterlerde ve aromatik ve alifatik hidrokarbonlarda özünür. Kurşunsuz benzinde yakıt oksijenlendiricisi, oktan yükseltici ve etanol için denatürant olarak kullanılmaktadır (Mahler 1997).



Şekil 2.3 t-Butil Alkol (Tersiyer butil alkol)

2.4 Denatüre Alkol

'Denatüre alkol' terimi, zehirli ve/veya kötü tat veren katkı maddeleriyle (örneğin metanol, benzen, piridin, hint yağı, benzin, izopropil alkol ve aseton) karıştırılarak insan tüketimi için uygun olmayan hale getirilmiş alkol ürünlerini ifade eder. Denatüre alkol, ağır vergilendirilen saf alkol ve içeceklerde kullanılan alkol ile karşılaştırıldığında, evsel

ölçekte veya endüstriyel kullanım için daha düşük maliyetli bir çözücü veya yakıt olarak kullanılır (Bekatorou 2015).

28 Ekim 2016 tarihinde Avrupa Komisyonun, Alkol ve Alkollü İçeceklerde Uygulanan Özel Tüketim Vergisi Yapılarının Düzenlenmesine İlişkin 92/83/EEC Sayılı Konsey Direktifi'nin değerlendirilmesi hakkında konseye sunduğu raporda belirsizliklerin giderilmesi ve mevzuatın daha net hale getirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca, denatüre alkolün muafiyeti konusundaki sorunların ele alınması gerektiği belirtilmiş ve bu kapsamda bazı öneriler sunulmuştur. Özellikle, denatüre alkolle ilgili dolandırıcılığın daha fazla araştırılması gerektiği ve mevzuatta daha fazla netlik sağlanarak üye devletler arasında karşılıklı güvenin artırılmasının önemi ifade edilmiştir (Anonymous 2016).

Ülkemizde, metil alkol ve etil alkolün üretimi ile iç ve dış ticaretine ilişkin usul ve esaslar hakkındaki yönetmeliğe ait son revizyon 30/12/2022 tarihinde, 32059 sayılı ile Resmî Gazetede yayınlanmıştır. Yönetmeliğin içerisinde yer alan Madde 22'ye göre etil alkolün denatürasyonu, belirli amaçlar doğrultusunda, 100 litre mutlak alkol içine yönetmelikte belirtilen denatüranların eklenmesiyle gerçekleştirilir ve bu işlem, etil alkolün kullanımı için gereken denatüranların eklenmesi yoluyla yapılır:

- Kolonya dahil kozmetik sanayiinde kullanılacak tarımsal etil alkoller için; denatürasyon tipine göre 0,8 g denatonyum benzoat ve 78,0 g tersiyer bütül alkol veya 0,5 kg dietilfitalat ve 78,0 g tersiyer bütül alkol kullanılırken;
- Genel amaçlı kullanıma sunulacak etil alkoller için; 125 g tiyofen, 0,8 g denatonyum benzoate, 3 gram CI (Colour Index) Reaktif Kırmızı 24 (Kütlece %25 sulu çözelti) ve 2 L metil etil ketondan oluşan denatüranlar en az %90 derecede etil alkolün mutlak alkol miktarı üzerinden 100 litresine birlikte ilave edilir.

2.4.1 Denatüre alkolün kullanım alanları

- **Temizlik Ürünleri:** Ev ve endüstriyel temizlik ürünlerinin birçoğu, denatüre alkol içerir. %70 denatüre etil alkol çözeltileri temizlik ve kalıntı giderme için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Genel yüzeylerin temizlenmesi, dezenfektan uygulamasından

önce ön temizlik, dezenfektan uygulamasından sonra kalıntıların giderilmesi, eldivenli ellerin temizlenmesi ve sterilizasyon sırasında kullanılır (Postlewaite ve Taraban 2015).

- **Kozmetik Ürünler:** Bazı kozmetik ürünlerde, özellikle parfüm, deodorant, krem, tıraş losyonları, makyaj temizleme ürünleri, saç boyaları, tırnak bakım ürünleri gibi ürünlerde denatüre alkol bulunabilir. Kozmetik ürünlerde kullanılan denatüre alkol köpük önleyici, bağlayıcı ve vizkozite ajanı olarak işlev görür (Andersen 2008).
- **Boya ve Vernik:** Alkoller, su bazlı boyalarda glikol eterlerle birleştirme çözücüleri olarak ve bazı yüzey kaplamalarında çözücü olarak düşük seviyelerde kullanılır. 1-butanol ve denatüre etil alkol en yaygın kullanılanlardır ve etil alkol aynı zamanda poli(vinil asetat) ve çeşitli fenolikler için aktif bir çözücü görevi görür (Mcgonigle ve Ciullo, 1996).
- **İlaç ve Kozmetik Endüstrisi:** Denatüre alkol, ilaçların ve kozmetik ürünlerin formülasyonunda çözücü olarak kullanılabilir. Ayrıca bazı bitkisel ekstraktların ve aktif bileşenlerin özütlenmesinde de kullanılır.

2.4.2 Denatüran türleri

- **Denatonyum Benzoat:** Denatonyum benzoat bilinen en acı bileşiktir. Acılığı 0,05 ppm'de kolayca tespit edilir. Bu yaklaşık olarak 3,785 L suda 1 g bileşiğe eşit derişimi ifade etmektedir. Denatonyum 10 ppm'e seyreltilmiş çözeltileri çoğu insan için son derece acıdır. Denatonyum benzoat aversif (caydırıcı) ajan olarak kullanılır. Denatüre alkol veya antifriz gibi ürünlerde kazara yutulmasını önlemek için eklenen bir maddedir. Denatonyum, astım ve alerji tedavisinde tıbbi bir uygulamaya sahiptir. Akciğerlerdeki acı reseptörlerine (T2R'ler) bağlanır ve bronş tüplerindeki düz kasların gevşemesine neden olur. Etkisi solunum yetmezliğini hafifletir ve normal solunumu geri kazandırır (Zeece 2020).

Denatonyum benzoat, diğ er bir adı ile Bitrex dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir denat randır. Farnas tik formülasyonlarda ise aroma verici madde olarak plasebo tabletlerinde ve topikal bir formülasyonda tırnak yemeyi önleyici bir preparatta kullanılmıştır. FDA'nın yayınlamış olduğu yardımcı maddeler (topikal jel ve solüsyon) kılavuzunda da yer almaktadır (Rowe vd., 2009).

- **Dietil Ftalat:** Dietil ftalat berrak, renksiz, yağlı bir sıvıdır. Kokusuzdur veya çok hafif aromatik bir kokusu ve acı, hoş olmayan bir tadı vardır. Fazla miktarda t k tilirse anestezik etki gösterebilir ve merkezi sinir sisteminde felce neden olabilir (Rowe vd., 2009).

Dietil ftalat ayrıca alkol denat ranı olarak ve vernik ve dop üretiminde selüloz asetat için çözücü olarak kullanılır. Parf meride dietil ftalat, kullanılan parfümün kütlesinin %0,1-0,5'i kadar bir konsantrasyonda parfüm sabitleyici olarak kullanılır. Dietil ftalat, kütlece %10-30 polimer konsantrasyonlarında tabletler, boncuklar ve granüller üzerindeki film kaplamaları için plastikleştirici olarak kullanılır. FDA'nın yayınlamış olduğu yardımcı maddeler (oral kapsüller, geciktirilmış etkili, enterik kaplı ve sürekli etkili tabletler) kılavuzunda da yer almaktadır (Rowe vd., 2009).

- **t-Butil Alkol:** t-Butil alkol çözücü, etanol ve diğ er bazı alkoller için denatüran, meyve esansları ve parfüm üretiminde, benzinde oktan yükseltici olarak; dehidrasyon maddesi olarak ve metil metakrilat üretiminde kimyasal bir ara madde olarak kullanılır. t-Butil alkol'e maruz kalma, buharı içeren havanın solunması ve kontamine su veya gıdaların t k tilmesi yoluyla gerçekleşir. Ayrıca doğrudan cilt teması yoluyla da maruz kalınabilir.

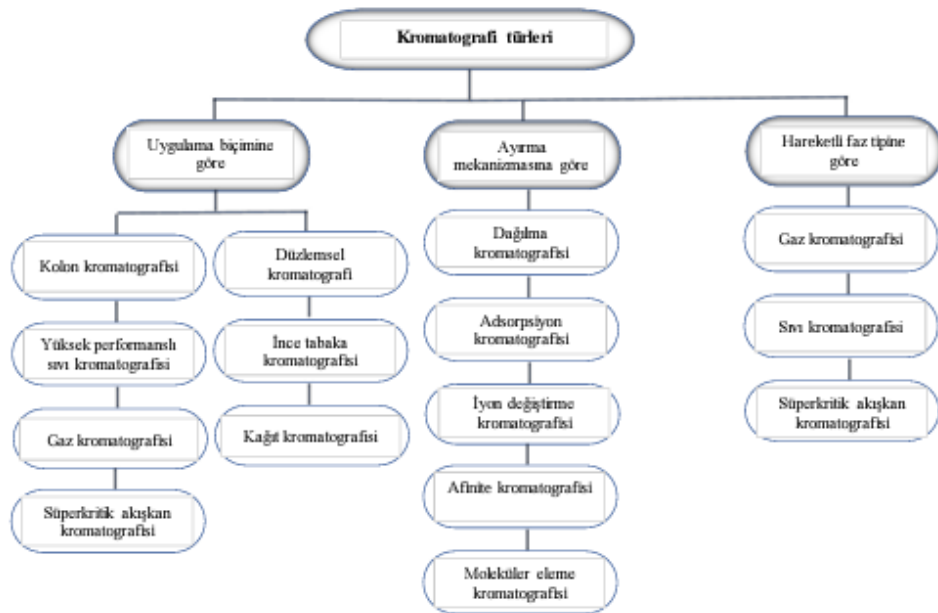
2.5 Kromatografi

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) komitesinin tanımına göre kromatografi, bir ayırma yöntemi olarak tanımlanır ve ayrılacak bileşenlerin biri sabit (durağan faz), diğ eri belirli bir yönde hareket eden (hareketli faz) iki faz arasında dağılım esasına dayanır.

Kromatografi, sıvı veya gaz formdaki bir hareketli fazda bulunan bir karışımdaki bileşenlerin sabit fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir yöntemdir.

2.5.1 Kromatografi türleri

Kromatografik yöntemler üç farklı modaliteye ayrılır: uygulama türüne, hareketli fazın türüne ve ayırma mekanizmasına bağlı olarak sabit faz ile hareketli faz arasındaki fiziksel etkileşimin incelenmesi olarak sınıflandırılabilir. Kromatografinin sınıflandırılması **şekil 2.4'te** gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Kromatografi türleri

2.6 Gaz Kromatografisi

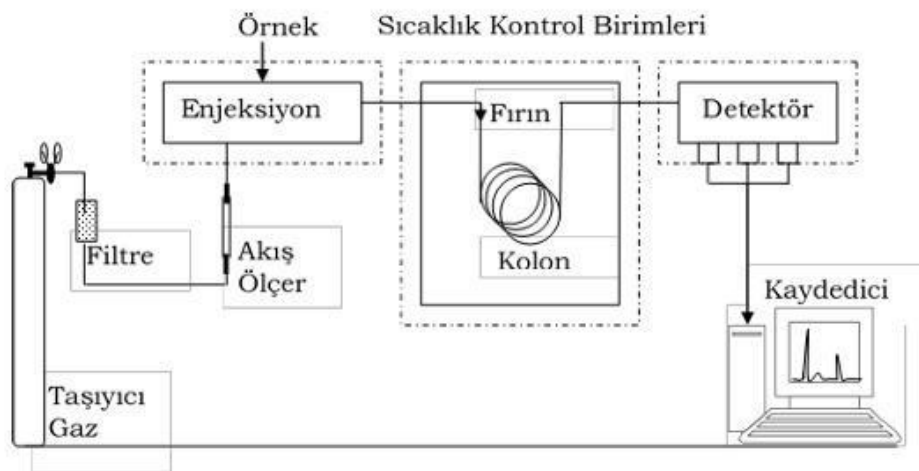
Gaz kromatografisi (GC), 1950'lerin başında Chicago Üniversitesi'nde Martin ve James önderliğindeki bir araştırma ekibi tarafından geliştirilmiştir/ortaya konmuştur. İngiliz kimyager Archer John Porter Martin ve Avustralya kökenli İngiliz biyokimyacı Richard Laurence Millington Synge, daha sonra gaz kromatografisi olarak bilinen gaz-sıvı kromatografisinin geliştirilmesiyle tanınmaktadır (Bartle ve Myers 2002).

Gaz kromatografisi yıllar içinde kapiler gaz kromatografisi, gaz-sıvı kromatografisi ve gaz-katı kromatografisi de dahil olmak üzere çeşitli özel tekniklere dönüşmüş ve çeşitlenmiştir. Kimya, biyokimya, petrokimya analizleri, adli bilimler, çevre ve ilaç araştırmaları gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan bir analitik araç haline gelmiştir.

Martin ve James tarafından gaz kromatografisinin icadı, analitik kimya alanında devrim yaratarak bilim insanlarının karmaşık karışımları yüksek hassasiyet ve verimlilikle ayırmasına ve analiz etmesine olanak sağlamıştır. Çalışmaları, günümüzde bilimsel araştırma ve analizleri ilerletmeye devam eden çok sayıda kromatografik tekniğin geliştirilmesinin temelini atmıştır.

Gaz kromatografisi; gaz-katı kromatografisi (GSC) ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC) olmak üzere iki türde tanımlanır. Gaz-katı kromatografisinde, gaz hareketli faz iken, analitleri fiziksel bir adsorpsiyon ile tutan sabit faz ise bir katıdır. Düşük mol kütleli örneğin hava bileşenleri, hidrojen sülfür, karbon monoksit ve azot oksitler gibi gazların ayrılmasını ve tayinini sağlar. Gaz-sıvı kromatografide ise; sabit faz kimyasal bağ ile tutulmuş veya inert bir katı yüzeyine adsorbe olan bir sıvı, hareketli faz ise bir gazdır. Gaz-sıvı kromatografisi sıklıkla kullanılır ve gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılır.

Bir gaz kromatografi sistemini oluşturan temel üniteler **şekil 2.5**'te verilmiştir.



Şekil 2.5 Gaz kromatografisi şematik diyagramı

2.6.1 Gaz kromatografisinin kullanım alanları ve önemi

Gaz kromatografisi gıdalar, petrol ürünleri, pestisit ve pestisit kalıntıları, farmasötik ürünler, çevresel izleme, klinik kimya ve diğer birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Modern GC'nin en önemli avantajları ise yüksek ayırma gücü, hız, hassasiyet ve onu karakterize eden hassasiyet ve doğrulukta yatmaktadır (Wang ve Pare 1997).

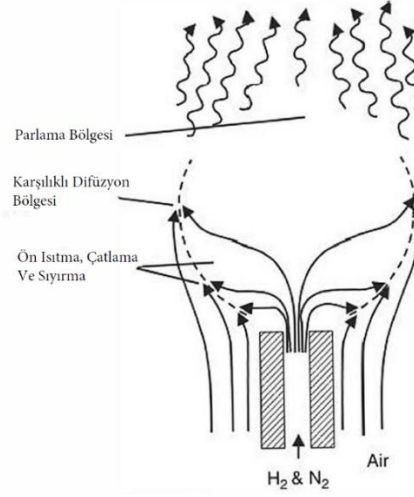
2.6.2 Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler

Kromatografide dedektör, numune karışımının bir kromatografi kolonundan elüe edilen bileşenlerini tespit etmek için kullanılır. Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler ayrıntılı olarak aşağıda anlatılmaktadır (Grob & Barry, 2004).

2.6.2.1 Alev iyonlaşma dedektörü (FID)

Alev iyonlaşma dedektörü (FID) 1958 yılında Harley ve arkadaşları ile McWilliam ve Dewar tarafından geliştirilmiştir. O zamandan beri FID, GC için en yaygın kullanılan dedektör haline gelmiştir. FID'nin popülerliğine çeşitli faktörler katkıda bulunmaktadır. İlk olarak, FID neredeyse tüm organik bileşiklere uygun hassasiyetle yanıt verir. Dedektör yanıtı akış, basınç veya sıcaklıktaki küçük değişikliklerden etkilenmez.

Kolondan gelen gaz, hidrojen ve hava ile karıştırılıp tutuşturularak alev meydana getirir. Hidrojen/hava alevinde yakılan organik bileşiklerin birçoğu iyon ve elektronlar meydana getirir. Bunlar alevden elektrik akımının geçmesine yardımcı olurlar (Skoog vd., 1998).



Şekil 2.6 FID'deki alev sürecinin şematik diyagramı

FID'de iyonizasyon mekanizmasına dahil olan süreçler jetin ucunda başlar ve alevin ayrı bölgelerinde meydana gelir. Taşıyıcı gaz, tamamlayıcı gaz ve hidrojen gazı karışımı jetten dışarı akar ve dışarı doğru genişler. Kuru hava ise jetin dışından akar. Alev reaksiyon bölgesinde üretilen ısı enerjisi, geri difüzyon yoluyla jetten gelen gaz akışını önceden ısıtır. Alev iyonlaşma dedektörü, dedektöre birim zamanda giren karbon sayısına cevap verdiği, yani dedektör sinyali, aleve giren maddelerin derişimiyle değil verdiği karbon atomları sayısı ile orantılı olduğu için, kütle-duyarlı dedektördür.

Duyarlılığı yüksek ve doğrusallık için geniş bir çalışma aralığı sunarlar. Bu nedenle, FID çok düşük ve çok yüksek derişimdeki inorganik maddeleri tayin etmek için kullanılabilir.

2.6.2.2 Termal iletkenlik dedektörü

Termal iletkenlik dedektörü (TCD) evrensel ve tahribatsız bir dedeksiyon sistemidir. Termal iletkenlik bir fiziksel özellik olduğundan, TCD aynı zamanda bir yığın özellik dedektörü olarak da tanımlanır, çünkü elüe edilen bileşenlerin varlığından kaynaklanan taşıyıcı gazın termal iletkenliğindeki bazı farklılıklara yanıt verir. TCD genellikle taşıyıcı gaz olarak helyum veya hidrojen kullanılarak çalıştırılır. Bu gazların termal iletkenliği neredeyse tüm çözünen maddelerden daha yüksektir. Bununla birlikte TCD, diğer yöntemlerle tespit edilmesi zor olan gaz halindeki maddelerin belirlenmesinde, özellikle

de dolgulu kolonların kullanıldığı gaz-katı kromatografik analizlerde; örneğin CS₂, COS, H₂S, SO₂, CO, CO₂, NO ve NO₂ gibi maddelerin belirlenmesinde çok kullanışlıdır.

2.6.2.3 Elektron yakalama dedektörü

Elektron yakalama dedektörü (ECD) günümüzde kullanılan en popüler ve değerli gaz kromatografik dedektörlerden biridir ve FID'den sonra ikinci sırada yer alır. ECD, taşıyıcı gazla çarpışarak elektron üretmek için bir β yayıcı radyoaktif kaynak kullanır ve ölçülebilir bir sabit akım üretir. Kromatografik kolondan elüe olan tür elektronları yakalayabilir ve böylece sabit akımda bir azalma kaydedilir. Bu tespit yöntemi, gaz fazında elektron yakalama reaksiyonlarına dayanır ve karmaşık matrislerdeki belirli maddelerin pikogram ve hatta femtogram seviyelerine yanıt verebilir. Bu özelliği onu çevresel ve biyomedikal çalışmalar için çok kullanışlı bir dedektör haline getirmektedir.

2.6.2.4 Termiyonik dedektör

Azot fosfor dedektörü (NPD) olarak da bilinen termiyonik dedektör (TID), bir metal anodun gazla ısıtıldığında pozitif iyonlar yayması temeline dayanır. Azot (N) ve fosfor (P) atomları içeren organik bileşiklerin seçici tayini için yaygın olarak kullanılan bir gaz kromatografik dedektördür. Bunlar arasında farmasötiklerin, pestisitlerin ve çevresel kirleticilerin belirlenmesi yer alır.

2.6.2.5 Fotoiyonizasyon dedektör

Fotoiyonizasyon dedektörü (PID), kromatografik kolondan çıkan analiti iyonlaştırmak için UV radyasyonunu esas alır. Lovelock tarafından 1960 yılında, iyonlaştırma için UV radyasyon kaynağı olarak argon ışınma deşarjı kullanan bir tasarımla tanıtılmıştır. Dedektör, vakumda çalışmayı gerektirmesi, kararsız olması, kolon kanaması nedeniyle kolayca kirlenmesi ve yetenekli bir operatör gerektirmesi nedeniyle popüler olamamıştır. Yaklaşık 15 yıl sonra PID, enerji kaynağı ile iyonizasyon odasını ayıran ve daha iyi bir stabilite sağlayan bir tasarımla yeniden ortaya çıkmıştır. Çeşitli modifikasyonlardan sonra, PID geniş bir doğrusal aralık sağlamaktadır. Bu gelişmeler PID'nin ticari olarak

piyasaya sürülmesiyle sonuçlanmıştır. Modern dedektörler ise UV radyasyon kaynağı olarak bir lamba kullanmaktadır.

2.6.2.6 Helyum iyonizasyon dedektör

Elektron yakalama dedektörüne benzer şekilde, helyum iyonizasyon dedektörü (HID) argon iyonizasyon dedektöründen yola çıkılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde argon yerine yarı kararlı helyum türleri oluşur. Yarı kararlı helyum türleri 19,8 eV enerjiye sahiptir, bu da daha önceki argon iyonizasyon dedektörünün iyonlaştıramadığı moleküllerin iyonize edebilmesini sağlar. Oluşan iyonizasyon ürünleri bir elektrik alanına tabi tutulur ve akım değişimi ölçülür.

2.6.2.7 Alev fotometrik dedektör

Alev fotometrik dedektörü (FPD), bir alevde uyarılan türlerin ışık emisyonunun yoğunluğunun izlenmesine dayanır. Kromatografik kolon çıkışındaki bileşenler ayrıştırılır ve daha sonra hidrojen bakımından zengin bir alevde daha yüksek bir elektronik duruma uyarılır. Bu türler aleve katılan heteroatomların karakteristik ışığını yayar. Emisyon spektrumlarının yoğunluğu bir foto çoğaltıcı tüp (PMT) tarafından izlenir. PMT'ye ulaşan ışığın uygun dalga boyunu seçmek için radyasyon yolundaki bir optik filtre kullanılır. FPD alev koşullarını değiştirerek halojenlere, azot içeren bileşiklere, kalay, krom, selenyum, tellür ve bora yanıt verebilmesine rağmen, çoğunlukla dedektörün genellikle seçici olduğu düşünülen organik sülfür ve organofosfor türlerinin izlenmesi için kullanılır.

2.6.2.8 Kemilüminesans dedektör

Gaz kromatografisi için sülfür kemilüminesans dedektörü (SCD) Benner ve Stedman tarafından geliştirilmiştir ve indirgeyici bir hidrojen/oksijen alevinde yanma yoluyla sülfür içeren bileşiklerden kükürt monoksit oluşumuna dayanmaktadır. Kemilüminesans, kimyasal reaksiyonlar sayesinde ışık yayılmasıdır. Kimyasal bir reaksiyonda yüksek düzeyde enerjiye sahip bir tür üretilir. Reaksiyon sonrası oluşan ışığın şiddeti kükürt

derişimi ile orantılıdır. Dedektör özelinde kükürt kirleticilerin, örneğin merkaptanların tayininde yararlıdır.

2.6.2.9 Atomik emisyon dedektörü

Plazmalar, atomik emisyon spektroskopisinde yaygın olarak kullanılan uyarma kaynaklarıdır. Tipik olarak bir plazma, bir gazın doğru akım veya yüksek frekanslı elektromanyetik alanlar aracılığıyla enerjilendirildiği bir elektrik deşarjdır. Elektriksel deşarj, destekleyici gazın farklı türlerini (örneğin, serbest atomlar, moleküller, iyonlar) içeren yüksek enerjili bir gazın bileşimidir. Üç ana plazma kaynağı vardır: indüktif olarak bağlanmış plazma (ICP), doğru akım plazması (DCP) ve mikrodalga kaynaklı plazma (MIP). Plazma kaynakları yüksek atomlaştırma verimliliği ve yüksek derecede uyarım sağlar. Bu enerjinin bir kısmı, plazmaya girdikten sonra numuneye aktarılır ve atomlaştırma ve uyarmanın gerçekleşmesine izin verir. Gaz kromatografide en yaygın olarak kullanılan plazma kaynağı, ticari bir gaz kromatografisi dedektörüne dönüşen MIP'dir. MIP'nin çalışma prensibi atomik emisyon spektroskopisi olduğundan, dedektör atomik emisyon dedektörü (AED) olarak adlandırılmıştır.

Dedektörlerin seçicilik, alt tayin sınırı ve doğrusal çalışma aralığına dair bilgiler **çizelge 2.1'de** yer almaktadır.

Çizelge 2.1 Yaygın kullanılan gaz kromatografisi dedektörleri için seçicilik, LOD ve doğrusal aralık özetleri

Dedektör	Seçicilik	LOD	Lineer aralık
Termal iletkenlik dedektörü (TCD)	Termal iletkenlik taşıyıcı gazdan farklıysa yanıt verir	1 ng/mL	10 ⁵
Alev iyonizasyon dedektörü (FID)	Organik bileşikler	1 pg(C)/s	10 ⁷
Elektron yakalama dedektörü (ECD)	Halojenler gibi elektron yakalayıcı bileşikler	10 fg/s	10 ⁴

Çizelge 2.1 Yaygın kullanılan gaz kromatografî dedektörleri için seçicilik, LOD ve doğrusal aralık özetleri (devam)

Dedektör	Seçicilik	LOD	Lineer aralık
Azot - fosfor dedektörü (NPD) veya termiyonik dedektör	N- ve P-içeren bileşikler	1 pg N/s 0,5 pg P/s	10^4
Alev fotometrik dedektör (FPD)	P- ve S-içeren bileşikler	50 pg S/s 2 pg P/s	10^3 10^4
Fotoiyonizasyon dedektörü (PID)	Aromatikler	5 pg C/s	10^7
Atomik emisyon dedektörü (AED)	Elemente göre seçici	0,1–50 pg/s	10^4

2.7 Gaz kromatografisinde kullanılan temel parametreler

2.7.1 Alıkonma zamanı

Kromatografide alıkonma zamanı, bir bileşiğin kromatografik sistemde enjeksiyon noktasından dedektöre ulaşana kadar geçen süredir. Gaz veya sıvı kromatografisi gibi tekniklerde, bir bileşik, taşıyıcı faz (gaz veya sıvı) içinde sabit fazdan geçerken hareket eder. Bu süreçte bileşiğin sabit fazla etkileşimi, bileşiğin alıkonma süresini belirler. Alıkonma zamanı, bileşiğin kimyasal yapısına ve kromatografik sistemdeki diğer faktörlere bağlıdır.

Alıkonma zamanı bir bileşiğin kromatografik kolondan geçip dedektöre ulaşma süresini gösterir ve analiz edilen maddelerin tanımlanmasında önemli bir parametredir. Farklı maddeler farklı alıkonma zamanlarına sahiptir ve bu zamanlar maddeyi ayırt etmede kullanılır.

Kromatografide alıkonma zamanının direkt bir matematiksel formülü yoktur, çünkü bu süre, çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin bir kombinasyonu ile belirlenir. Ancak, alıkonma süresi, gaz veya sıvı kromatografi sistemindeki koşullara bağlı olarak gözlemlenen deneysel bir değerdir.

2.7.2 Teorik plaka sayısı

Teorik plaka sayısı bir kolonun ayırma verimliliğini ölçen bir parametredir. Yüksek teorik plaka sayısı, kolonun iki bileşeni birbirinden daha iyi ayırabileceğini gösterir. Teorik olarak, bir kromatografik kolon, birçok küçük plaka veya denge adımına bölünmüş gibi düşünülebilir ve her plaka, bir bileşiğin sabit faz ve hareketli faz arasında dengelendiği bir noktayı temsil eder.

Teorik plaka sayısının formülü aşağıdaki gibidir:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

N: Teorik plaka sayısı

t_R : Alıkonma zamanı (bileşiğin kolonda kalma süresi)

W: Pik genişliği (bileşiğin kromatogramdaki tepe pikinin tam genişliği, genellikle pik genişliğinin yarısında ölçülür)

Bu formül, bir bileşiğin piki ne kadar dar ve alıkonma zamanı ne kadar uzun olursa, teorik plaka sayısının o kadar büyük olacağını gösterir. Pik genişliği küçüldükçe, kolon daha verimli hale gelir ve iki bileşen daha iyi ayrılabilir.

Teorik plaka sayısı, kolonun etkinliği ve verimliliği hakkında bilgi verir ve genellikle farklı kromatografik sistemlerin karşılaştırılmasında kullanılır.

2.7.3 Kuyruklanma faktörü

Kuyruklanma faktörü, kromatografide bir pik şeklini değerlendirmek için kullanılan bir parametredir. İdeal bir kromatografik pik, simetrik bir Gauss eğrisi şeklinde olmalıdır. Ancak pratikte, çeşitli nedenlerden dolayı pikin kuyruğu uzayabilir, yani pik şekli asimetrik hale gelebilir. Bu duruma "kuyruklanma" (tailing) denir. Kuyruklanma faktörü, bir pikin ne kadar simetrik olduğunu veya kuyruklanmanın derecesini ölçmek için kullanılır.

Kuyruklanma faktörünün formülü aşağıdaki gibidir:

$$T = \left(\frac{W_{0.05}}{2.f} \right)$$

T: Kuyruklanma faktörü

$W_{0.05}$: Pik yüksekliğinin %5'inde ölçülen pik genişliği (pik tabanının genişliği)

f : Pik merkezinden (en yüksek noktadan) %5 yüksekliğine kadar olan uzaklık (pik genişliği, merkezden pik genişliğinin yarısı)

Bu formül, pikin ne kadar simetrik olduğunu ölçer. İdeal bir kromatografik pik için kuyruklanma faktörü yaklaşık 1 olmalıdır. Ancak gerçek dünyada kuyruklanma faktörü genellikle 1'den büyük olur.

Kuyruklanma faktörünü yorumlanırken;

- $T \approx 1$: Pik simetriktir, ideal bir Gauss dağılımına yakın bir şekildedir.
- $T > 1$: Pik kuyruklanmış, pik şekli sağa doğru uzamıştır.
- $T < 1$: Pik önceden kesilmiş (fronting) bir yapıya sahiptir, pik şekli sola doğru uzamıştır.

Kuyruklanma genellikle kolon içindeki düzensiz etkileşimlerden, sabit fazdaki aktif bölgelerden veya sistemdeki bozulmalardan kaynaklanır. Yüksek kuyruklanma faktörü, ayırımın verimsiz olduğunu gösterir ve sonuçların doğruluğunu etkileyebilir. Bu nedenle kuyruklanma faktörü, kromatografik sistemin performansını değerlendirmede önemli bir parametredir.

2.7.4 Ayırma gücü (Rezolüsyon)

Kromatografide ayırma gücü (rezolüsyon), iki bileşiğin kromatografik sistemde ne kadar iyi ayrıldığını gösteren bir parametredir. Ayırma gücü, iki pik arasındaki mesafe ve pik genişlikleri ile hesaplanır. Bu parametre, bir kolonun iki bileşiği birbirinden ne kadar net bir şekilde ayırabileceğini değerlendirmeye yarar.

Ayrırma gücünün formülü şu şekildedir:

$$R_s = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{W_1 + W_2}$$

R_s : Ayrırma gücü

t_{R1} : İkinci bileşiğin alıkonma zamanı

t_{R2} : Birinci bileşiğin alıkonma zamanı

W_1 : Birinci pikin genişliği

W_2 : İkinci pikin genişliği

Bu formül, iki bileşik arasındaki alıkonma zamanı farkını (yani piklerin ne kadar ayrı olduğunu) ve pik genişliklerinin toplamını kullanarak ayırma gücünü hesaplar.

Ayrırma gücü değerlerinin yorumu:

- $R_s \geq 1,5$: İki bileşik tam olarak ayrılmıştır. Pikler arasında yeterli boşluk vardır.
- $R_s = 1,0$: İki bileşik kısmen ayrılmıştır. Piklerin zirveleri ayrılmış olabilir, ancak tabanları örtüşebilir.
- $R_s < 1,0$: İki bileşik yeterince ayrılmamıştır. Pikler birbirine karışmış veya üst üste binmiş olabilir.

Genel olarak, bir kromatografik sistemin iki bileşiği etkili bir şekilde ayırabilmesi için ayırma gücünün 1.5 veya daha büyük olması istenir. Daha düşük ayırma gücü, bileşiklerin birbirine karışma olasılığını artırır ve analizlerin doğruluğunu olumsuz etkiler. Ayrırma gücü, kolon uzunluğu, mobil faz kompozisyonu, akış hızı gibi parametrelerin optimize edilmesiyle iyileştirilebilir.

2.8 Laboratuvar İçi Analitik Metot Validasyonu

Uluslararası Uyum Konseyi (ICH), kılavuzuna göre validasyon, bir analitik prosedürün belirlenen amaca uygun olup olmadığını kanıtlamak amacıyla yapılan bir değerlendirme sürecidir. Validasyon, bir analitik prosedürün belirli performans özelliklerini karşılayıp karşılamadığını doğrulamak için gerekli olan deneysel çalışmaları ve önceden elde edilen bilgilerin değerlendirilmesini içerir. Bu süreç, analitik prosedürün kullanım amacına uygun olduğunu gösteren yeterli kanıt sağlamayı amaçlar (Step, 2023).

2.8.1 Miktar tayini yöntemi validasyonu

Miktar tayini yöntemini valide etmek (geçerli kılmak) için **çizelge 2.2**'de belirtilen parametreler incelenir.

Çizelge 2.2 Miktar tayini için validasyon parametreleri

Yöntem Adı	Parametreler
Miktar Tayini Yöntem Validasyonu	1. Seçicilik / Spesifiklik
	2. Sistem Uygunluğu
	3. Kesinlik
	3.1. Metot Tekrarlanabilirliği
	3.2. Laboratuvar İçi Tekrarlanabilirlik
	4. Doğrusallık
	5. Doğruluk (% Geri kazanım)
	6. Çalışma Aralığı
	7. Sağlamlık
	8. Çözelti Stabilitesi

2.8.2 Analitik metot validasyon parametreleri

2.8.2.1 Seçicilik

Bir analitik prosedürün özgünlüğü veya seçiciliği, girişimin olmaması veya sonuçların alternatif bir prosedürle karşılaştırılması yoluyla gösterilebilir. Analizi yapılacak bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneği olarak tanımlar. Herhangi bir analitik metot validasyonunda ilgili parametre çalışılırken seçiciliğin gösterilmesi, ilgili yöntemde safsızlıkların, yardımcı maddelerin veya çözücülerin varlığından etkilenmediğinin, herhangi bir girişim oluşmadığının gösterilmesini gerektirir. Bu nedenle, seçicilik kriterleri, bileşenlerin ve çözücülerin analiz edilen maddenin nihai karışımından başarıyla ayrılmasını sağlamak için kritik öneme sahiptir. ICH'ye göre kromatografik prosedürler kullanıldığında, seçicilik derecesini göstermek için temsili kromatogramların sunulması ve piklerin uygun şekilde etiketlenmesi gerektiğini belirtmektedir (Step, 2023).

2.8.2.2 Sistem uygunluğu

Sistem uygunluk testleri, ölçüm sisteminin ve analitik prosedürle ilişkili analitik işlemlerin öngörülen amaca uygun olduğunu doğrulamak ve kabul edilemeyen performansın saptanabilirliğini artırmak için geliştirilir ve kullanılır. Sistem ve metot seçiminin uygun olduğunu ispatlamak için yapılır. Bu amaçla standart çözeltisi hazırlanarak ardışık enjeksiyonları yapılır. Analiz edilen maddeye ait pikin kuyruklanma faktörü 0,8 – 2,0 arasında olması ve teorik plaka sayısının 2000’den yüksek olması, ardışık enjeksiyonlarına ait pik alanları arasındaki bağıl standart sapmanın ise %5’den küçük olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.3 Kesinlik

Homojen bir karışımdan alınan numunenin analiz sonuçlarının uyumlu olması, analiz yönteminin kesinliğinin bir ölçüsüdür. Bu kapsamda kesinlik parametresi analiz sonuçlarının bağıl standart sapma değeri ile ölçülür (Step, 2023).

ICH’ye göre analitik bir prosedürün kesinliği, homojen bir numune ya da standardın birden fazla kez ardışık enjekte edilmesi ile test sonuçları arasındaki uyum derecesidir. Analitik bir prosedürün kesinliği genellikle bir dizi ölçümün standart sapması veya bağıl standart sapması (varyasyon katsayısı) olarak ifade edilir. İlgili yöntemin kesinliği, sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi kesinlik testleri ile değerlendirilir (Step, 2023).

2.8.2.4 Sistem kesinliği

Standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarındaki veriler ile kullanılan sistemin kesinliğin test edilir. Pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapmanın sistem kesinliğinde maksimum %5 olması beklenir.

Sistem kesinliğinin uygun olduğunu kanıtlamak amacıyla laboratuvar içi kesinlik çalışması sırasında ikinci gün sistem kesinliği çalışması yapılır. Ardışık enjeksiyonlar için

beklenen pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapma maksimum %5'tir.

2.8.2.5 Yöntem kesinliği (Tekrarlanabilirlik)

Bir analitik metodun yöntem kesinliği, analiz metodunda belirtilen numune çözeltilerinin analiz sonuçlarına göre değerlendirilir. Tekrarlanabilirlik, analitik prosedürün bir laboratuvar da aynı analizci ve aynı ekipman kullanılarak kısa bir süre boyunca kullanılmasını ifade eder.

Tekrarlanabilirlik parametresine ait numune sonuçları arasındaki bağıl standart sapma maksimum %5 olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.6 Laboratuvar içi kesinlik

Bir diğer kesinlik parametresi olan laboratuvar için kesinlik parametresinde ise taze hazırlanmış hareketli faz, farklı marka reaktif ve cihaz, farklı analizci ve farklı zaman aralıklarında aynı seri numaralı numuneler tekrar analizlenir. Miktar tayini metodunda belirtildiği gibi hazırlanan numune çözeltileri sisteme enjekte edilir. Analiz sonuçları arasındaki farkın $\pm$ %5 olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.7 Doğrusallık

Yöntemin, çalışılan maddenin belirli konsantrasyonlardaki çözeltilerinde, konsantrasyon ile doğru orantılı sonuçlar vermesidir. Bu amaçla etkin maddenin en az 5 noktada çalışma konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri hazırlanır. Hesaplanan konsantrasyona göre hazırlanan her bir doğrusallık çözeltilerinin ardışık enjeksiyonları yapılarak ve gelen sonuçlara göre standart eğrisi çizilir.

Grafikten elde edilen doğrunun denkleminde yararlanılarak doğruya ait eğim, kesim değeri ve korelasyon katsayısı hesaplanır.

Doğrusallık, konsantrasyona karşılık gelen alanlar arasında çizilen grafikte en küçük kareler yöntemine göre geçirilen regresyon doğru denklemi ve bunun korelasyon katsayısı (R^2) ile değerlendirilmektedir. $R^2 > 0,990$ genel olarak regresyon doğrusunun uyumunun iyi olduğunun kanıtıdır ve R^2 değerinin 0,990'den büyük olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.8 Doğruluk (%Geri kazanım)

Doğruluk, ölçülen değer ile kabul edilen doğru veya referans değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Yüksek doğruluk, bir analitik prosedürün, gerçek değeri doğru bir şekilde belirleyebildiği anlamına gelir. Analitik prosedür, bilinen bir saflığa sahip referans madde kullanılarak test edilir. Ölçülen sonuçlar, teorik veya bilinen doğru değerlerle karşılaştırılır. Analit, numuneye bilinen bir miktarda eklenir (spiking) ve analiz sonucunda geri kazanılan miktar (recovery) hesaplanır. Geri kazanım yüzdesi, prosedürün doğruluğunu gösterir.

Hesaplanan konsantrasyonlarda en az 3 doğruluk çözeltisi hazırlanır ve sisteme ardışık olarak enjekte edilir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan geri kazanım değerinin % 90,0 - % 110,0 arasında olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.9 Çalışma aralığı

Çalışma aralığı, analitik prosedürün belirli bir performans seviyesinde (örneğin doğruluk, kesinlik, doğrusal cevap) sonuç verebildiği en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar arasındaki aralıktır. Analitik prosedür, çalışma aralığı dışında güvenilir sonuçlar vermeyebilir; bu nedenle, çalışma aralığının iyi tanımlanmış olması, analitik prosedürün uygulanabilirliği ve geçerliliği açısından kritik öneme sahiptir. Alt limit, genellikle minimum tespit edilebilir veya kantitatif edilebilir miktarı temsil ederken, üst limit maksimum miktarı temsil eder. Bir analitik prosedürün hangi konsantrasyon veya miktar aralığında güvenilir sonuçlar verdiğini tanımlayan kritik bir parametredir. Analitik prosedürlerin geçerliliği ve güvenilirliği için bu aralığın doğru bir şekilde belirlenmesi ve doğrulanması gerekir (Step, 2023).

Alt Tayin Sınırı (LOQ), bir analitik yöntemle güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde kantitatif olarak belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder. LOQ, bir analitin miktarının doğruluk ve kesinlik kriterlerini karşılayacak şekilde ölçülebileceği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. LOQ, genellikle S/N (sinyal/gürültü) oranı kullanılarak belirlenir ve genellikle bir yöntem doğrulama sürecinin bir parçası olarak hesaplanır (Lister 2005).

Gözlenebilme Sınırı (LOD), bir analitik yöntemin güvenilir bir şekilde tespit edebileceği en düşük analit miktarını ifade eder. LOD, ölçülen sinyalin gürültüye oranının belirli bir değeri (genellikle 3:1 veya 2:1) aştığı en düşük konsantrasyon seviyesidir. LOD, bir yöntemin hassasiyetini belirlemek için kullanılır ve genellikle metot geliştirme ve validasyon çalışmalarında önemli bir parametredir. LOD, bir analitin varlığını belirleyebilir, ancak bu düzeyde kesin bir miktar ölçümü sağlanamaz (Lister 2005).

2.8.2.10 Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, sistem şartlarında bilerek yapılan küçük fakat önemli değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve yöntemin normal şartlarda kullanıldığı sürece güvenilir olduğunun göstergesidir. Her metotta, yeterince dikkatle yapılmadığında, metot performansı üzerinde önemli etki yapacak ve hatta metodun çalışmamasına neden olabilecek belirli aşamalar vardır. Bu aşamalar, genellikle metot geliştirilmesinin bir parçası olarak belirlenmeli ve mümkünse metot performansı üzerindeki etkileri sağlamlık parametresi ile incelenmelidir.

Analitik koşullarda yapılan değişiklikler ölçümleri etkileyebiliyorsa, bu koşullar dikkatle kontrol edilmeli veya prosedürde bir uyarı olarak belirtilmelidir. Sağlamlık değerlendirmesinden elde edilen sonuçlar, analitik prosedürün geçerliliğinin korunmasını sağlamak amacıyla bir dizi sistem uygunluğu parametresinin belirlenmesini gerektirebilir.

Örneğin gaz kromatografisinde sağlamlık parametreleri

- Farklı kolonlar (farklı partiler ve / veya tedarikçiler),
- Sıcaklık,

- Akış hızı için değişiklik yapılarak validasyon çalışması gerçekleştirilebilir.

Enjeksiyonlara ait bağıl standart sapmanın %5'in altında olması, sağlamlık için seçilen parametrelere ait analiz sonuçları ortalaması ile normal şartlardaki analiz sonuçları ortalaması arasındaki farkın ise maksimum % ± 5 olması beklenir (Step, 2023).

2.8.2.11 Çözelti stabilitesi

Uluslararası Uyum Konseyi tarafından stabilite, analitik metot validasyonunda incelenen numunenin zamanla kimyasal, fiziksel, mikrobiyolojik, terapötik veya toksikolojik olarak uygunluğunu koruma kabiliyeti olarak tanımlanır. Uluslararası Uyum Konseyi kılavuzlarına göre stabilite çalışmaları, analit kalitesini garanti altına almak için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmalar, ürünün ya da çözeltinin raf ömrü boyunca ve önerilen depolama koşulları altında stabil kalıp kalmadığını belirlemek amacıyla yapılır.

Bazı çalışmalarda gerek iş yoğunluğu ve gerekse analiz süresinden kaynaklanan nedenlerden dolayı analizler geceye ya da bir sonraki güne sarkabilmektedir. Bu gibi durumlarda otomatik enjeksiyon kullanılmakta ve test çözeltisi, laboratuvar koşullarında, test tamamlanmadan önce saatlerce kalabilmektedir. Eğer analiz edilecek madde herhangi bir değişime (örneğin; hidroliz, fotoliz ile bozunma, cam malzemeye yapışma özelliği, vb.) uğrayacak ise bu önemlidir. Bu amaçla hazırlanan numune çözeltilerinin uzun süreli analizlerde bozunmadan kaldığı kanıtlamak için standart ve numune çözeltisi oda sıcaklığında bekletilir. Başlangıç stabilite sonucu ile her bir stabilite periyodundaki analiz sonuçları arasındaki değişim maksimum % ± 10 olması beklenir (Step, 2023).

2.9 Kaynak Özetleri

Paolini vd., (2022) alkollü içecekler ve şaraplardaki temel uçucu bileşiklerin analizi için hızlı bir FID dedektörünün kullanıldığı bir GC yöntemi geliştirmiştir. Geliştirilen yöntem optimize edilmiş ve alkollü içeceklerin karakteristik on altı uçucu bileşiği ((1,1-dietoksietan veya asetal), aldehytler (asetaldehit), alkoller (metanol, 1-heksanol, 2-metilbutan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2 feniletanol, 3-metilbutan-1-ol, bütan-1-ol, bütan-

2-ol ve propan-1-ol) ve etil esterler (etil asetat, etil format ve etil laktat) 8 dakika içinde analiz edilmiştir. Agilent Intuvo 9000 GC Sistemi ve CP-Wax 57 CB kolon (25 m × 0,25 mm × 0,2 µm) kullanılarak kromatografik yöntem ile elde edilen sonuçlara dayanarak, geliştirilen GC-FID yöntemi, endüstriye sunulabilecek hızlı bir kalite kontrol prosedürü olarak önerilmektedir. Bu prosedürün teknolojik seçimleri desteklemek ve şarap üretim uygulamalarını ve alkollü içki üretimini geliştirmek amacıyla endüstriye yardımcı olabileceği vurgulanmıştır.

Rahman ve Kim, (2014) sıkça kullanılan ev sprej ürünlerinden salınan tehlikeli uçucu kirleticilerin maruziyet seviyelerini değerlendirmek için, altı vücut spreji ve dört hava spreji ürününden oluşan toplam 10 sprej ürünü incelenmiştir. Vücut spreji ürünleri arasında böcek kovucular (iki farklı ürün), ilaçlı bant, deodorant, saç spreji ve nemlendirici yer alırken, hava spreji ürünleri arasında iki farklı böcek ilacı (sivrisinek ve/veya hamamböceği), antibakteriyel sprej ve oda spreji yer almıştır. Shimadzu GC-2010 ve Shimadzu GCMS-QP2010 sistemlerini kullanarak 15 farklı uçucu organik bileşiğin miktarları tayin edilmiştir. Bu çalışmaya göre, benzen, toluen ve metil etil keton neredeyse tüm sprej ürünlerinde sırasıyla ortalama 43,4; 77,7 ve 53,7 mg/L konsantrasyonlarda bulunmuştur. Stiren ve bütil asetat, böcek kovucu, saç spreji ve nemlendirici gibi ürünlerde sırasıyla ortalama yaklaşık 25 ve 11 mg/L konsantrasyonlarda bulunmuştur. Çalışma, sprej ürünlerinin benzen, toluen, stiren, metil etil keton, bütil asetat gibi kapalı mekanlarda en yaygın ve bol miktarda bulunan kirleticileri içerdiğini doğrulamıştır.

Yarita vd., (2002) alkollü içeceklerdeki etanolün belirlenmesinde FID dedektörün kullanıldığı GC ve HPLC yöntemi kullanmıştır. Çalışmada FID sistemi, hareketli faz olarak saf su kullanan bir HPLC sistemine doğrudan bağlanmaktadır. Triakontil silan (C₃₀)-silika jel sabit faz kullanılarak 96 saat boyunca yapılan dayanıklılık testinde, dört alkol bileşiğinin alıkonma süresinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Böylece alkollü içeceklerin HPLC ayrımı C₃₀-silika jel sabit faz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Altı çeşit alkollü içeceğin analizine uygulandığında, etanol önerilen yöntemle doğru bir şekilde belirlenebilmiştir.

Savchuk vd., (2007) votka, rektifiye edilmiş gıda alkölü, konyaklar, konyak alkölleri ve diğér güçlü alkölölü içeceklerin bileşimini kromatografik olarak incelemiş ve endüstriyel (sentetik ve hidroliz) etil alkölün, sahte konyakların ve yasadışı piyasadan elde edilen ev yapımı alkölölü içkilerin (samogon) bileşimi ile karşılaştırmıştır. Analiz, alev iyonlaşma dedektörlü (FID) bir Hewlett-Packard 5890A gaz kromatografında gerçekleştirilmiştir. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 240 ve 220°C olarak ayarlanmıştır. Test edilen alköl içeren sıvıların çoğunun, kimyasal bileşim ve toksik özellikler açısından ticari alkölölü içeceklere yakın olduğu bulunmuştur.

Destanoğlu ve Ateş, (2019) yasal ve yasadışı olarak üretilen alkölölü örneklerin etanol, metanol ve daha yüksek alköl içeriklerini incelemiştir. Yüksek alköl içeren maddelerin kalitatif analizi için HS-GC-MS sistemi etanol ve metanol konsantrasyonlarının belirlenmesi için ise HS-GC-FID sistemi kullanılmıştır. Alkölölü içeceklerin kalitatif analizleri, Clarus SQ8T kütle spektrometresi ve HS40 headspace (HS) otomatik örnekleme cihaz donanımlı Perkin Elmer Clarus 680 gaz kromatografı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 96 adet rakı örneğinin 7'sinin uygun olduğu, kalan 89 örneğın metanol konsantrasyon seviyelerinin ve denatüran içeriklerinin tebliğ ve yönetmeliklere uygun olmadığı belirtilmiştir. Bira ve şarap örneklerinin tümü ise yönetmeliğe uygun bulunmuştur. 101 adet yüksek alkölölü içecek örneğinin sadece 11'inin tebliğe uygun bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonda etanol içeren iki farklı numune de rapor edilmiştir; bu numunelerin her ikisi de t-butil alköl içermektedir, dolayısıyla büyük ihtimalle yasadışı alkölölü içecek üretiminde kullanılmaktadırlar.

Bucci vd. (2006) tarafından İtalya'daki denatüre edilmiş alköl örneklerinin bileşenlerinin tanımlanması ve miktarlarının tayini için basit, hızlı ve nispeten ucuz bir spektrofotometrik yöntem önerilmiştir. Genel denatürasyon maddesinin tüm bileşenleri (denatonyum benzoat, tiyofen, metil etil keton ve C.I. Reaktif Kırmızı 24 boyası) ve derişik bir standart denatürasyon karışımı (kullanılmadan önce uygun hacimde MEK (metil etil keton) ile ön seyreltme gerektiren) Roma'daki Gümrük Ajansı Kimya Laboratuvarı tarafından hazırlanmıştır. Her bir bileşenin stok standart çözeltileri doğrudan tartılarak (veya MEK durumunda hacimsel olarak) ve %90 etil alköl ile bilinen bir hacme seyreltilerek hazırlanmıştır.

Kim vd., (2017) alkollü içeceklerdeki uçucu organik bileşiklerin tayini için basit ve hızlı bir yöntem geliştirmiştir. Alkollü içeceklerdeki 11 uçucu organik bileşik (asetaldehit, metanol, 2-propanol, t-butanol, 1-propanol, etil asetat, 2-butanol, izobutanol, butan-1-ol, 3-metil-1-butanol ve 2-metil-1-butanol), GC-FID kullanılarak basit bir doğrudan enjeksiyon yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntemin çok yönlülüğünü doğrulamak için dört tür alkollü içecek (biral, meyve şarapları, pirinç şarapları ve alkollü içkiler) yöntemin validasyonu yapılmıştır. Doğrusallık 0,9986 ile 0,9995 arasında R^2 değerleri göstermiş ve LOD değerleri 0,010 ile 1,000 mg/L arasında değişmiştir. Kesinlik ve doğruluk parametreleri kabul edilebilir sonuçlar göstererek yöntemin etkinliğini kanıtlamıştır. Geliştirilen yöntem, dört alkollü içecek türünü temsil eden 40 ticari örneğe uygulanmış ve alkollü içecek türüne bağlı olarak uçucu organik bileşiklerin profillerini belirlemek için temel bileşen analizi yapılmıştır. Bu yöntem, diğer mevcut yöntemlerle karşılaştırıldığında karmaşık ekstraksiyon yöntemlerine ve pahalı cihazlara (örneğin, bir kütle spektrometresi) ihtiyaç duyulmadığını göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez kapsamında, denatüre edilmiş etil alkol içindeki metil alkol ve t-butil alkolün tayininde kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firma ve saflık dereceleri ile alfabetik olarak **çizelge 3.1**'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firmalar ve saflık dereceleri

Kullanılan Kimyasal Madde	Temin Edildiği Firma	Saflık Derecesi
Etil Alkol	Merck	%98
Metil Alkol	Merck	%98
t-Butil Alkol	Merck	%98

Çalışmada, gümrükten gelen 3 farklı ticari etil alkol numunesi, piyasadan satın alınan esanslı kolonya (Kolonya-1) ve bebek kolonyası (Kolonya-2) numune olarak kullanılmıştır. Gümrükten gelen numunelerin geliş tarihleri **çizelge 3.2**'de, kolonya numunelerinin üretim tarihleri ise **çizelge 3.3**'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Gümrükten gelen ticari etil alkol numuneleri

Numune	Geliş Tarihi
Gümrük Numunesi-1	05.02.2024
Gümrük Numunesi-2	14.03.2024
Gümrük Numunesi-3	22.01.2024

Çizelge 3.3 Piyasada alınarak analiz edilen numune örnekleri

Numune	Üretim Tarihi
Kolonya-1	24.01.2024
Kolonya-2	19.12.2023

3.2 Yöntem

Etil alkol içindeki metil alkol ve t-butil alkolün nicel analizleri için Shimadzu (Tokyo, Japonya) marka GC 2010 QP Plus cihazı, FID dedektör ve Teknokroma TRB-WAX (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kolon kullanılmıştır.

Kullanılan Teknokroma markası kapiler TRB-WAX (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kolonu %100 polietilen glikol (PEG) yapıya sahip olup yüksek polariteli kolondur. Sıcaklık olarak geniş çalışma aralığına ve yüksek termal kararlılığa sahiptir (270 °C). Alkollerin, aldehitlerin, ketonların ve aromatik izomerlerin ayrıştırılması için idealdir.

Shimadzu marka GC 2010 QP Plus cihazı içerisindeki LabSolution Versiyon01 yazılımı kullanılarak tüm validasyon hesaplamaları yapılmıştır. Validasyon parametrelerine ait sonuçlar cihaz kütüphanesinde var olan ve cihazın kendi hesaplandığı değerler ile raporlandırılmıştır. Temel alınan formüller aşağıda belirtilmiştir.

Ortalama:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- $\bar{x}$: Aritmetik ortalama
- $\sum x_i$: Veri setindeki tüm elemanların toplamı (her
- n : Veri setindeki eleman sayısı

Standart Sapma:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- s : Örneklem standart sapması
- x_i : Her bir veri noktası
- $\bar{x}$: Örneklemin aritmetik ortalaması
- n : Veri setindeki eleman sayısı

Bağıl Standart Sapma:

$$RSD(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

- RSD(%): Bağıl standart sapma, genellikle yüzde olarak ifade edilir.
- s: Örneklem standart sapması
- $\bar{x}$: Örneklemin aritmetik ortalaması

Teorik Plaka Sayısı:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

- N: Teorik plaka sayısı
- t_R : Alıkonma zamanı (bileşiğin kolonda kalma süresi)
- W: Pik genişliği

Kuyruklanma Faktörü:

$$T = \left(\frac{W_{0.05}}{2.f} \right)$$

- T: Kuyruklanma faktörü
- $W_{0.05}$: Pik yüksekliğinin %5'inde ölçülen pik genişliği (pik tabanının genişliği)
- f: Pik merkezinden (en yüksek noktadan) %5 yüksekliğine kadar olan uzaklık (pik genişliği, merkezden pik genişliğinin yarısı)

Ayırma Gücü:

$$RS = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{W_1 + W_2}$$

- Rs: Ayırma gücü
- t_{R1} : İkinci bileşiğin alıkonma zamanı
- t_{R2} : Birinci bileşiğin alıkonma zamanı
- W_1 : Birinci pikin genişliği
- W_2 : İkinci pikin genişliği

Korelasyon Katsayısı

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

- r: Korelasyon katsayısı
- x: İlk değişkenin değerleri
- y: İkinci değişkenin değerleri
- n: Veri setindeki gözlem sayısı
- $\sum xy$: İki değişkenin çarpımlarının toplamı
- $\sum x$ ve $\sum y$: Değişkenlerin toplamaları
- $\sum x^2$ ve $\sum y^2$: Değişkenlerin karelerinin toplamı

Analizde kullanılan GC cihazının görünümü **şekil 3.1**'de verilmiştir.



şekil 3.1 Analizde kullanılan GC cihazı

Literatür verileri doğrultusunda metil alkol ve t-butil alkol analiz yönteminin optimum koşullarını belirlemek için farklı denemeler yapılmıştır. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı, akış hızı, kolon sıcaklık programı şartları değiştirilerek metil alkol ve t-butil alkol pikleri arasındaki ayırma gücü (rezolüsyon), pik şiddetleri ve alıkonma zamanları incelenmiştir.

11 farklı denemeye ait enjeksiyon bloğu sıcaklığı, akış hızı, basınç, dedektör sıcaklığı, fırın sıcaklığı ve kolon sıcaklık programları değerleri **çizelge 3.4**'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Denemelere ait kromatografik şartlardaki değişen veriler

Deneme 1	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 2,57 mL/dk. Basınç: 60 kPa Dedektör Sıcaklığı: 240 °C Fırın Sıcaklığı: 55 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>55</td><td>-</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	55	-	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	55	-									
10	200	1									
Deneme 2	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 2,57 mL/dk. Basınç: 60 kPa Dedektör Sıcaklığı: 240 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									
Deneme 3	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 160 °C Akış: 2,57 mL/dk. Basınç: 60 kPa Dedektör Sıcaklığı: 250 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									
Deneme 4	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 160 °C Akış: 0,46 mL/dk. Basınç: 72,2 kPa Dedektör Sıcaklığı: 200 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>50</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	50	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
50	200	1									
Deneme 5	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 160 °C Akış: 0,46 mL/dk. Basınç: 72,2 kPa Dedektör Sıcaklığı: 180 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									
Deneme 7	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 0,37 mL/dk. Basınç: 60 kPa Dedektör Sıcaklığı: 250 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									
Deneme 8	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 0,33 mL/dk. Basınç: 53,5 kPa Dedektör Sıcaklığı: 250 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									
Deneme 9	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 0,30 mL/dk. Basınç: 51,1 kPa Dedektör Sıcaklığı: 250 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı: <table> <tr> <th>Oran (°C/dk.)</th><th>Sıcaklık (°C)</th><th>Bekleme Süresi (dk.)</th></tr> <tr> <td>-</td><td>30</td><td>7</td></tr> <tr> <td>10</td><td>200</td><td>1</td></tr> </table>	Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)	-	30	7	10	200	1
Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)									
-	30	7									
10	200	1									

Çizelge 3.4 Denemelere ait kromatografik şartlardaki değişen veriler (devam)

Deneme 10	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 0,30 mL/dk. Basınç: 56,1 kPa Dedektör Sıcaklığı: 300 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı:		
		Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)
		-	30	7
Deneme 11	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C Akış: 0,37 mL/dk. Basınç: 60,7 kPa Dedektör Sıcaklığı: 300 °C Fırın Sıcaklığı: 30 °C	Kolon Sıcaklık Programı:		
		Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)
		-	30	7
		Kolon Sıcaklık Programı:		
		Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)
		10	200	1

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

Etil alkol ve metil alkolün üretimi ile iç ve dış ticaretine ilişkin usul ve esaslar hakkındaki yönetmeliğin 22.maddesinde yer alan ifadeye göre 100 L denatüre etil alkol içerisine 78 gram t-butil alkol yer almaktadır.

Yapılan analitik metot validasyon çalışmasında doğrusalılık ve doğruluk parametrelerinin orta noktası ve numune çözeltileri, ilgili yönetmeliğe istinaden 1 mL içerisinde 78 ppm t-butil alkol olmasına göre hesap yapılarak hazırlandı.

Doğrusallık ve doğruluk çalışması için **çizelge 3.1’de** verilen metil alkol ve t-butil alkol standartlardan belirlenen miktarlarda alınarak ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlandı.

3.3.1 Metil alkol stok çözeltisi

1,8704 g metil alkol tartılarak 25 mL’ye saf su ile seyreltildi. Bu çözeltiden 100 mL’lik balon jöjeye 1 mL alınarak saf su ile son hacmine seyreltildi. (Stok metil alkol konsantrasyonu: 748,16 ppm)

Doğrusallık çalışması için, hazırlanan metil alkol stok çözeltisinden 5 farklı konsantrasyonda **çizelge 3.5’te** belirtilen doğrusalılık çözeltileri hazırlandı.

Çizelge 3.5 Metil alkol doğrusallık çözeltileri

Çözelti	Konsantrasyon (ppm)
Stok Metil Alkol	748,16
1:20	37,41
1:13	56,12
1:10	74,82
1:6,7	112,23
1:5	149,64

3.3.2 t-Butil alkol stok çözeltisi

1,9390 g t-butil alkol tartılarak 25 mL'ye saf su ile seyreltildi. Bu çözeltiden 100 mL'lik balon jöjeye 1 mL alınarak saf su ile son hacmine seyreltildi. (Stok t-butil alkol konsantrasyonu: 775,56 ppm)

Doğrusallık çalışması için, hazırlanan t-butil alkol stok çözeltisinden 5 farklı konsantrasyonda **çizelge 3.6'da** belirtilen doğrusallık çözeltileri hazırlandı.

Çizelge 3.6 t-Butil alkol doğrusallık çözeltileri

Çözelti	Konsantrasyon (ppm)
Stok t-butil Alkol	775,56
1:20	38,78
1:13	58,17
1:10	77,56
1:6,7	116,34
1:5	155,12

Metil alkol ve t-butil alkol doğrusallık çalışması için ayrı ayrı hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin ardışık enjeksiyonları yapıldı.

3.3.3 Etil alkol çözeltisi

1,9410 g etil alkol tartılarak 25 mL'ye saf su ile seyreltildi. Bu çözeltiden 100 mL'lik balon jojeye 1 mL alınarak saf su ile son hacmine seyreltildi. (Etil alkol konsantrasyonu: 776,40 ppm)

3.3.4 Numune çözeltileri

3 farklı seriye ait gümrükten gelen ve ticari amaçla kullanılacak olan etil alkol numunesi, 2 farklı firmaya ait kolonya numunelerinin her birinden 1'er mL alınarak saf su ile 10 mL'ye seyreltildi.

3.3.5 Doğruluk çözeltileri

Metil alkol ve t-butil alkol için doğruluk parametresini çalışmak üzere plasebo ortamı yaratmak amacıyla ilk olarak %96'lık etil alkol çözeltisi hazırlandı. Merck firmasına ait etil alkol çözeltisinden 96 mL alınarak 100 mL'ye seyreltildi.

Doğruluk parametresinde kullanılmak üzere hazırlanan %96'lık etil alkol çözeltisinden 1:20, 1:10 ve 1:5 oranında olacak şekilde **çizelge 3.7'de** belirtildiği gibi ayrı ayrı stok metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinin eklenmesiyle 3 farklı konsantrasyonda geri kazanım çalışması yapıldı.

Çizelge 3.7 Metil alkol ve t-butil alkol doğruluk çözeltileri

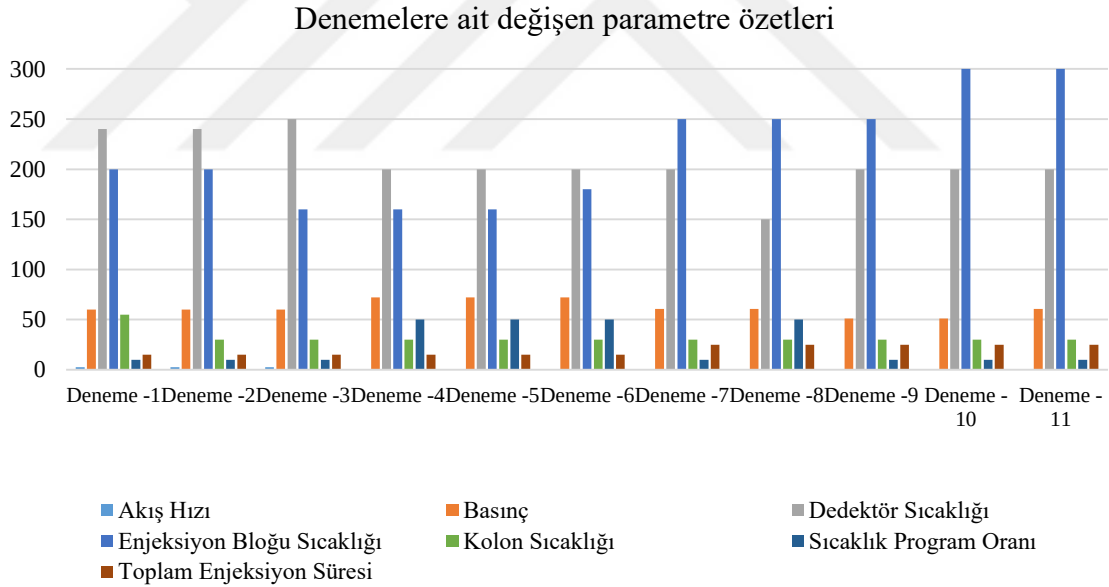
Çözelti	İlave edilen metil alkol konsantrasyonu (ppm)	İlave edilen t-butil alkol konsantrasyonu (ppm)
1:20	37,41	38,78
1:10	74,82	77,56
1:5	149,64	155,12

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada optimize metodu bulmak amacıyla kromatografik koşulları değiştirerek 11 farklı deneme yapılmıştır. Bu denemelerde metil alkol ve t-butil alkol piklerinin şiddeti, piklere ait teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve ayırma gücü (rezolüsyon) dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır.

En uygun kromatografik şartı bulmak amacıyla sistem üzerinde akış hızı, basınç, dedektör sıcaklığı, fırın sıcaklığı, enjeksiyon bloğu sıcaklığı, kolon sıcaklığı ve sıcaklık programı oranları değiştirilerek metil alkol ve t-butil alkol pikleri incelenmiştir.

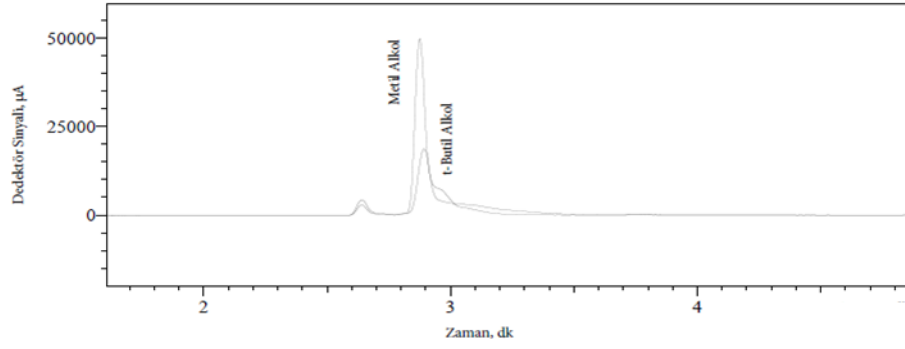
Tüm denemeler ve geliştirilen yeni yöntem için kromatografik şartlar özet olarak **şekil 4.1** içerisinde belirtilmiştir.



Şekil 4.1 Yapılan tüm kromatografik denemelere ait değişen parametre özetleri

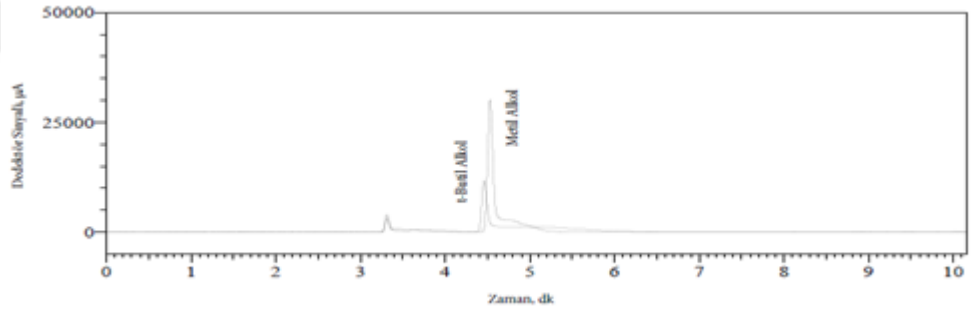
Denemelere ait elde edilen örnek kromatogramlar **şekil 4.2 – 4.12**'de verilmiştir.

Literatür verileri doğrultusunda ilk deneme çizelge 3.1 içerisinde verilen Deneme 1'e ait kromatografik şartlar ile başlatılmıştır.



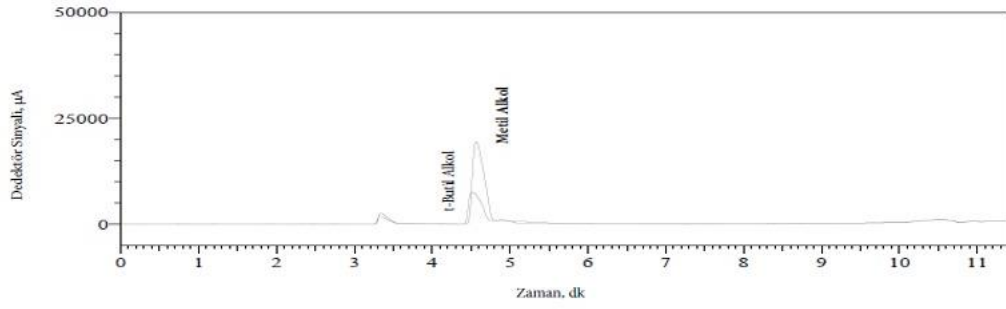
Şekil 4.2 Deneme-1'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 1'de edilen piklerin üst üste gelmesi ile Deneme 2'ye geçilerek ilk olarak kolon sıcaklığı düşürülerek metot içerisine bekleme süresi eklenmiştir. 30 °C kolon sıcaklığı ile Deneme 2'ye ait kromatogramda Deneme 1'e göre metil alkol ve t-butil alkol piklerinde daha iyi bir ayırım gözlenmiş ve piklere ait genişlikleri azalarak daha keskin pikler elde edilmiştir.



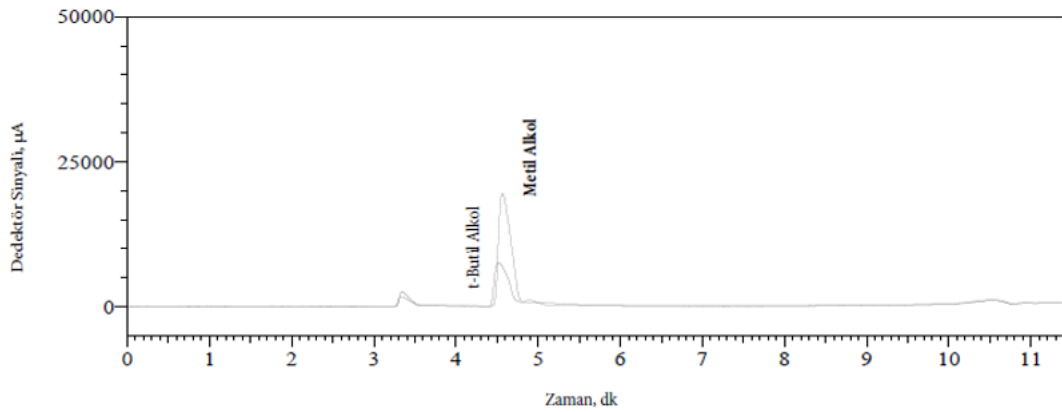
Şekil 4.3 Deneme-2'ye ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 2'de gözlenen kromatogram sonrası metil alkol ve t-butil alkol piki arasındaki ayırımı gözlemek amacıyla enjeksiyon bloğu sıcaklığı düşürülerek diğer değerler sabit tutulmuştur. Deneme 3'de elde edilen kromatograma göre pik şiddetleri azalmış olup ayırımı bir iyileşme gözlenmemiştir.



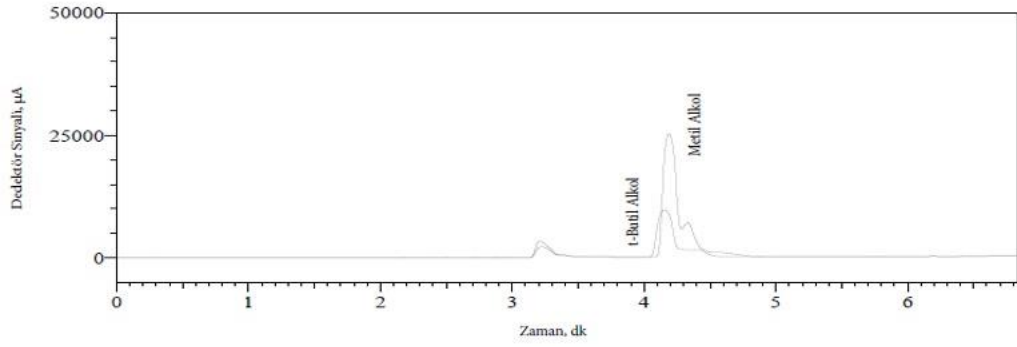
Şekil 4.4 Deneme-3'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 4 için akış hızı ve dedektör sıcaklığı azaltılmış olup kolon fırını sıcaklık programı değiştirilmiştir ancak metil alkol ve t-butil alkol piklerine ait değişim gözlenmiştir. Azalan akış hızı ile hem pikler arası ayırım azalmış hem de bant genişliklerinde artış gözlenmiştir.



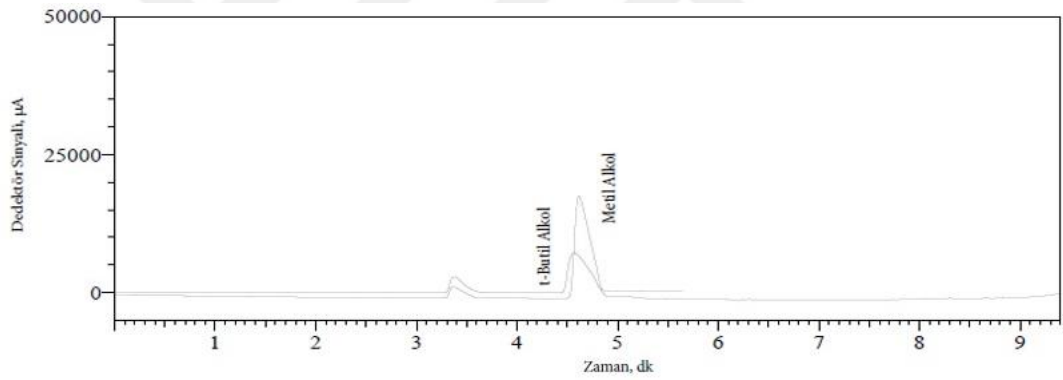
Şekil 4.5 Deneme-4'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 5'te ise dedektör sıcaklığı düşürülerek kolon sıcaklık programı tekrar başlangıç değerine getirilmiştir. Metil alkol pikinde omuz gözlenmiş olup piklerin bant genişlikleri yüksektir. Metil alkol ve t-butil alkol pikleri arasında da ayırım beklenen düzeyde gözlenmemiştir.



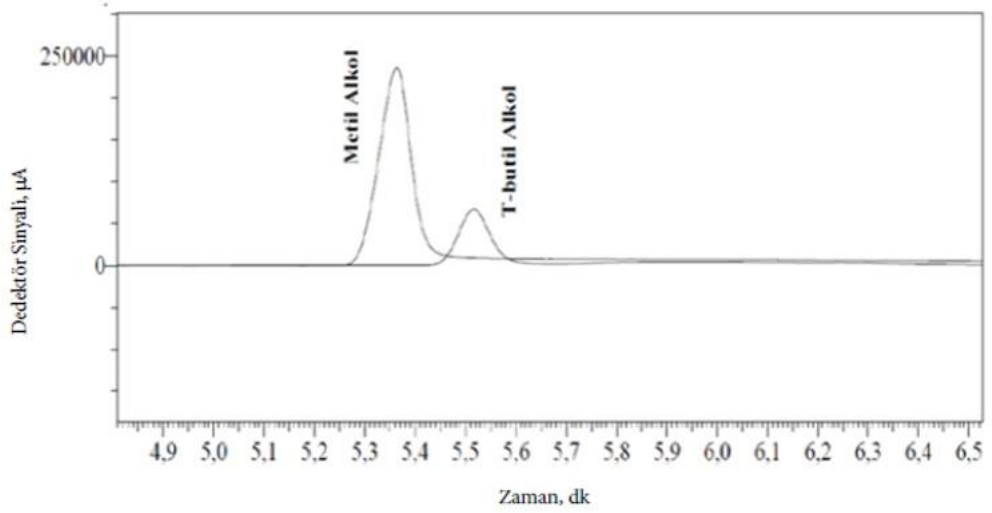
Şekil 4.6 Deneme-5'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Piklere ait bant genişliklerinin artmasıyla Deneme 6 için enjeksiyon bloğu sıcaklığı ve dedektör sıcaklığı geri yükseltilmiştir. Buna ek olarak kolon sıcaklık programındaki oran değiştirilmiştir. Ancak metil alkol ve t-butil alkol pikleri arasındaki ayırmda bir iyileşme olmamıştır.



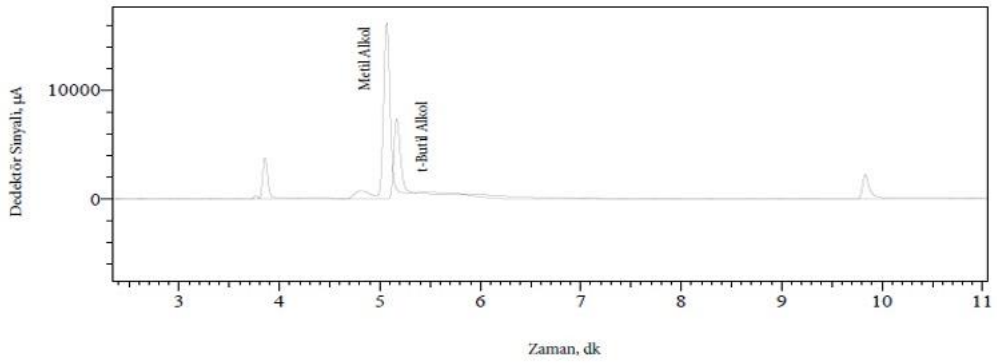
Şekil 4.7 Deneme-6'ya ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 7 için ilk olarak kolon sıcaklık programı oranı başlangıç koşuluna geri getirilmiştir. Buna ek olarak akış hızı düşürülmüştür. Metil alkol ve t-butil alkol pikleri şiddetli gelerek iki pik arasındaki kabul edilebilir bir ayırım gözlenmiştir.



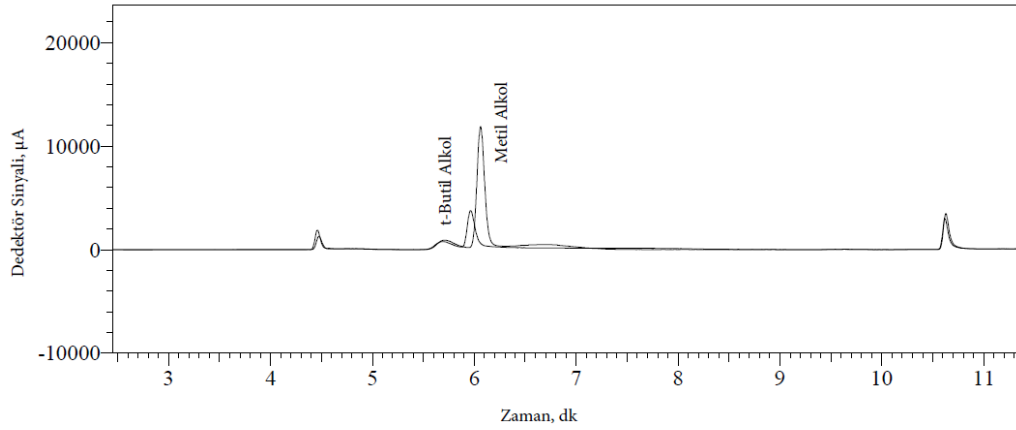
Şekil 4.8 Deneme-7'ye ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 7 için elde edilen ayrımı iyileştirmek amacıyla Deneme 7 şartları baz alınarak sadece akış hızı azaltılmıştır. Elden edilen bu ayrımı daha da iyileştirmek amacıyla Deneme 8 için pikler daha keskin ancak düşük şiddette gelmiş olup metil alkol ve t-butil alkol arasındaki ayrım azalmıştır.



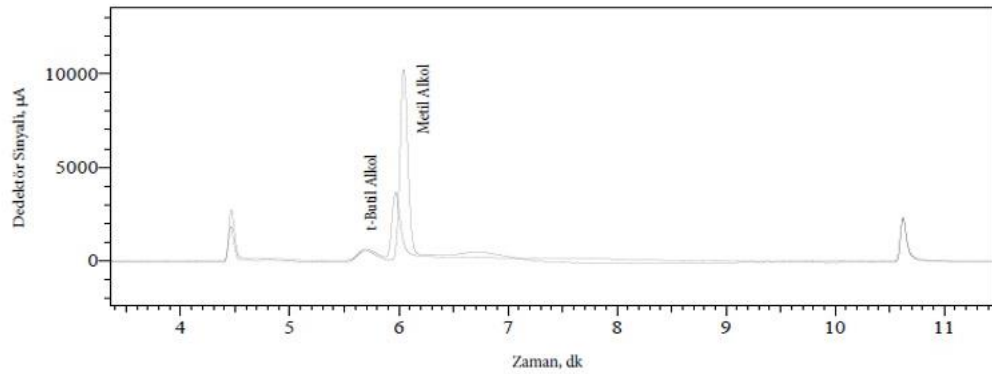
Şekil 4.9 Deneme-8'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Metil alkol ve t-butil alkol pikleri arasındaki ayrımı gözlemlemek amacıyla Deneme 9 için akış hızı Deneme 8 şartları üzerinden tekrar azaltılmıştır.



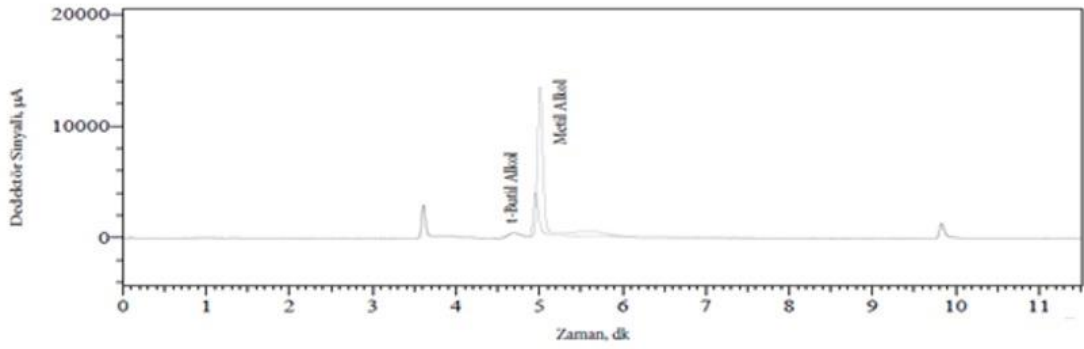
Şekil 4.10 Deneme-9'a ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Dedektör sıcaklığının etkisini ölçmek amacıyla Deneme 9 şartları ile devam edilerek sadece dedektör sıcaklığı artırılmıştır. Ancak Deneme 10 ve Deneme 9 arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.11 Deneme-10'a ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Deneme 11 için ise akış hızındaki değişimi gözlemlemek amacıyla Deneme 10 şartları baz alınarak sadece akış hızı arttırılmıştır. Her ne kadar pikler keskin olsa da metil alkol ve t-butil alkol arasındaki ayırım Deneme 7'deki kadar yüksek bulunmamıştır.



Şekil 4.12 Deneme-11'e ait metil alkol ve t-butil alkol kromatogram

Kromatografik koşulların optimizasyonu sırasında yapılan 11 farklı deneme arasından Deneme-7'ye ait kromatografik şartlar metil alkol ve t-butil alkol arasındaki ayırma gücünün en yüksek, pik şiddetlerinin en iyi olduğu koşul analiz yöntemi olarak seçilmiştir.

Valide Edilen Analitik Metot

Kromatografik Şartlar;

Cihaz: GC 2010 QP Plus

Dedektör: FID

Kolon: Teknokroma TRB-WAX 60 m × 0,25 mm × 0,25µm

Kromatografik Şartlar

- Enjeksiyon Bloğu Türü: SPL
- Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200 °C
- Enjeksiyon Modu: Splitless
- Akış: 0,37 mL/dk.
- Basınç: 60 kPa
- Hız: 40 cm/s
- Dedektör Sıcaklığı: 250 °C
- Fırın Sıcaklığı: 30 °C
- Enjeksiyon Süresi: 40 dk.
- Kolon Sıcaklık Programı: **çizelge 4.1'de** verilmiştir.
-

Çizelge 4.1 Optimum koşullarda belirlenen kolon sıcaklığı programı

Oran (°C/dk.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme Süresi (dk.)
-	30	7
10	200	1

4.1 Validasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

4.1.1 Seçicilik/Spesifiklik

Optimize edilen metot ile metot seçiciliğini göstermek amacıyla sırasıyla stok metil alkol, stok t-butil alkol, etil alkol ve gümrük numunesi-1 çözeltileri enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlarda piklere ait alıkonma zamanı, alan, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Seçicilik parametresine ait özet sonuçlar **çizelge 4.2’de** yer almaktadır. Seçicilik parametresinde enjekte edilen örnek numuneye ait özet sonuçlar ise **çizelge 4.3’te** verilmiştir.

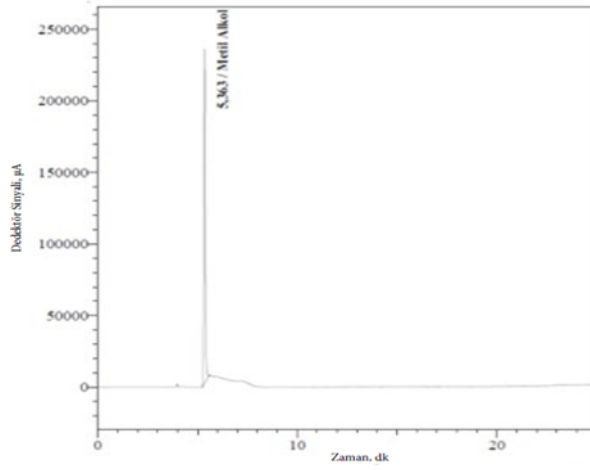
Çizelge 4.2 Seçicilik parametresine ait özet sonuçlar

Analit	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μ V)	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
Metil Alkol	5,363	1065684	33326	1,000
t-Butil Alkol	5,516	292707	36531	1,104
Etil Alkol	6,478	252515	41911	1,195

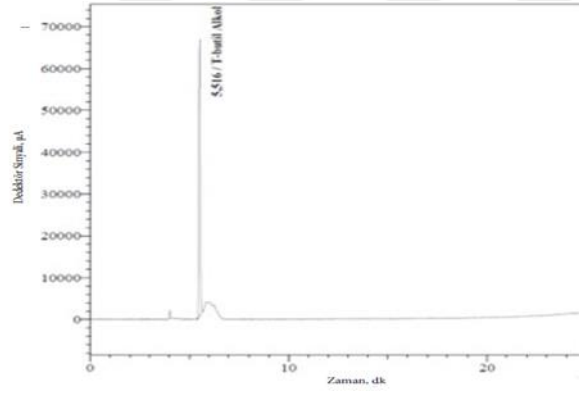
Çizelge 4.3 Seçicilik parametresine ait gümrük numunesi-1 özet sonuçları

Örnek Numune	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μ V)	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
t-Butil Alkol	5,570	9040	31761	1,047
Etil Alkol	6,684	23797006	9815	3,308

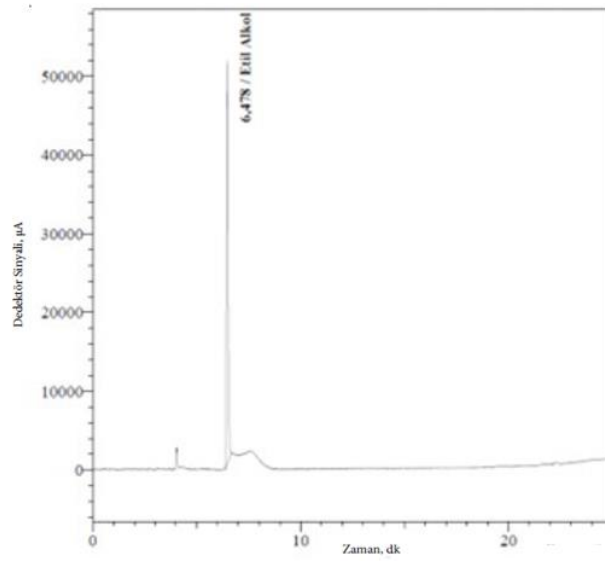
Seçicilik parametresinden elde edilen kromatogramlar **şekil 4.13 – 4.17’de** verilmiştir.



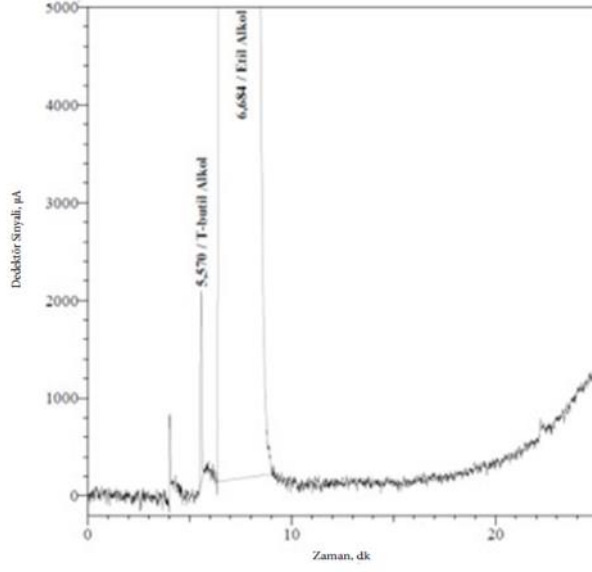
Şekil 4.13 748,16 ppm metil alkol'e ait seçicilik kromatogramı



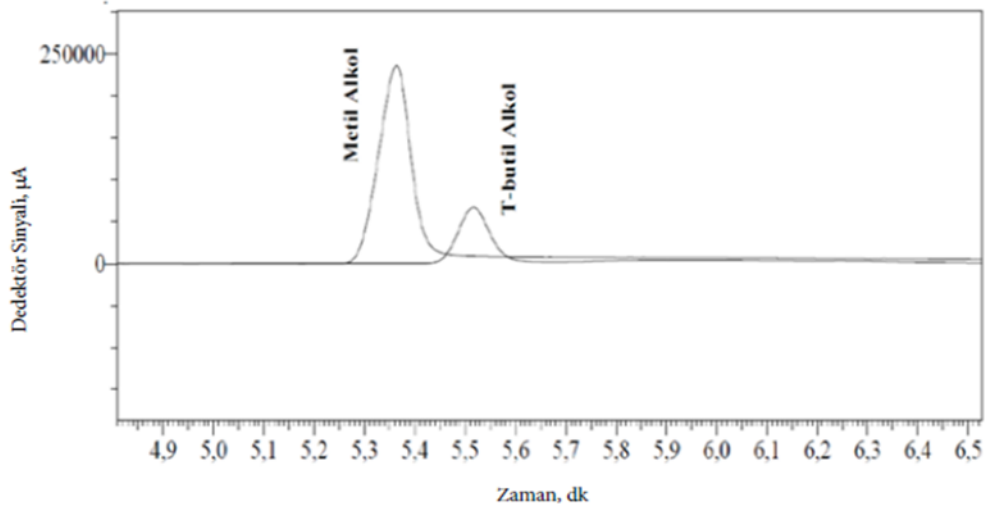
Şekil 4.14 775,56 ppm t-butil alkol'e ait seçicilik kromatogramı



Şekil 4.15 776,40 ppm etil alkol'e ait seçicilik kromatogramı



Şekil 4.16 Gümrük numunesi-1'e ait seçicilik kromatogramı



Şekil 4.17 Seçicilik parametresi için metil alkol ve t-butil alkol kromatogram karşılaştırması

4.1.2 Sistem uygunluğu

Stok metil alkol ve stok t-butil alkol çözeltilerinin 1:10 oranında hazırlanan metil alkol ve t-butil alkol standart çözeltileri ardışık olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait bağıl standart sapmalar sırasıyla %5'in altında bulunmuş olup, tüm enjeksiyonlarda teorik plaka sayısı 2000'den fazla ve alkol piklerine ait kuyruklanma faktörü beklenen aralıkta bulunmuştur.

Paralel hazırlanan ikişer metil alkol ve t-butil alkol standartları için ardışık enjekte elde edilen sistem uygunluk parametre sonuçları **çizelge 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’de** yer almaktadır.

Çizelge 4.4 1:10 oranında hazırlanan metil alkol standart-1 sistem uygunluk sonuçları

Metil Alkol Standart-1	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μV)
Ortalama	5,51	97618
SD	0,019	3652
%RSD	0,340	3,741
(n=4)		

Çizelge 4.5 1:10 oranında hazırlanan metil alkol standart-2 sistem uygunluk sonuçları

Metil Alkol Standart-2	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μV)
Ortalama	5,54	105348
SD	0,000	2298,80
%RSD	0,000	2,182
(n=4)		

Çizelge 4.6 1:10 oranında hazırlanan t-butil alkol standart-1 sistem uygunluk sonuçları

t-Butil Alkol Standart-1	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μV)
Ortalama	5,65	25562
SD	0,004	1211,58
%RSD	0,007	4,740
(n=4)		

Çizelge 4.7 1:10 oranında hazırlanan t-butil alkol standart-2 sistem uygunluk sonuçları

t-Butil Alkol Standart-2	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan (μV)
Ortalama	5,64	24026
SD	0,004	678,04
%RSD	0,063	2,822
(n=4)		

Her iki metil alkol ve t-butil alkol standartlarına ait % benzerlik değerleri elde edilen ortalama konsantrasyon ve alana göre hesaplanmış olup **çizelge 4.8’ ve 4.9’da** verilmiştir.

Çizelge 4.8 1:10 oranında hazırlanan standart-1 ve 2 metil alkol çözeltilerine ait % benzerlik sonucu

Metil Alkol	Konsantrasyon (ppm)	Alan (μV)	% Benzerlik
Standart1	74,82	97618	98,96
Standart2	79,90	105348	

Çizelge 4.9 1:10 oranında hazırlanan standart-1 ve 2 t-butil alkol çözeltilerine ait % benzerlik sonucu

t-Butil Alkol	Konsantrasyon (ppm)	Alan (μV)	% Benzerlik
Standart1	77,56	25562	102,99
Standart2	75,07	24026	

4.1.3 Doğrusallık

Stok metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinden 1:20, 1:13, 1:10, 1:6,7 ve 1:5 oranında olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda metil alkol için sırasıyla 37,41 ppm, 56,12 ppm, 74,82 ppm, 112,23 ppm, 149,64 ppm t-butil alkol için sırasıyla 38,78 ppm, 58,17 ppm, 77,56 ppm, 116,34 ppm ve 155,12 ppm olacak şekilde hazırlanan doğrusallık çözeltileri ardışık olarak sisteme enjekte edilmiştir. Ardışık enjeksiyonlara ait bağıl standart sapmaları sırasıyla %5'in altında bulunmuş olup, teorik plaka sayısı 2000'den fazla ve alkol piklerine ait kuyruklanma faktörü beklenen aralıkta bulunmuştur.

Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan metil alkol ve t-butil alkol doğrusallık çözeltilerinin ortalama alanları ile konsantrasyona karşı doğrusallık grafikleri çizilmiştir.

4.2 Metil Alkol Doğrusallık Sonuçları

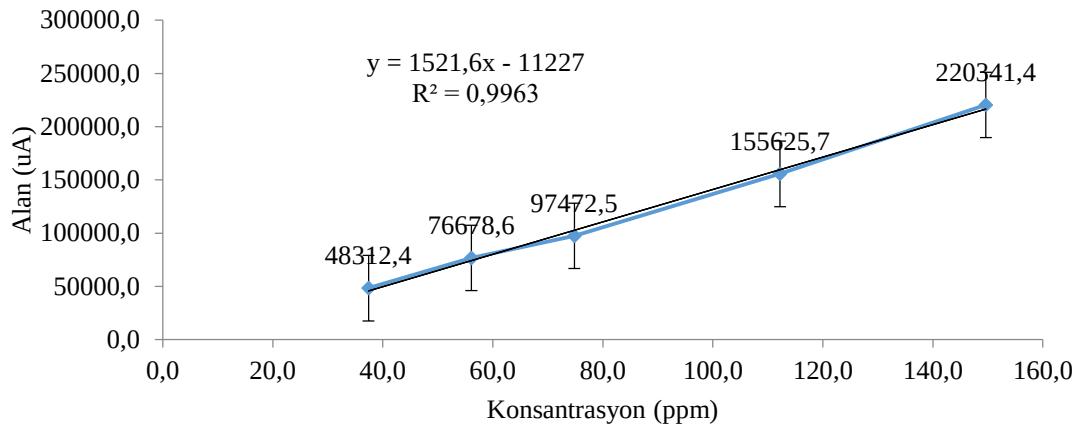
Optimum koşullar belirlendikten sonra ana stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 5 farklı metil alkol standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarına ait ortalama alanları çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 Metil alkol doğrusallık çözeltileri ve ortalama pik alanları

Çalışılan Konsantrasyon (ppm)	Ortalama Pik Alan (µA)
37,41	48312,4
56,12	76678,6
74,82	97472,5
112,23	155625,7
149,64	220341,4

(n=4)

Ortalama pik alanları ve konsantrasyona karşı çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.18’de yer almakta olup korelasyon katsayısı 0,9963 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.18 Metil alkol için çizilen doğrusallık grafiği

4.3 t-Butil Alkol Doğrusallık Sonuçları

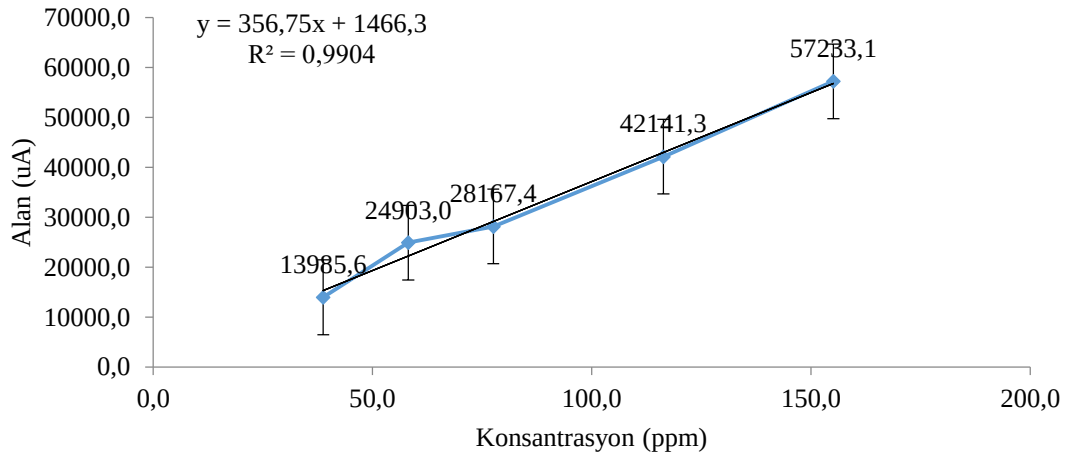
Optimum koşullar belirlendikten sonra ana stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 5 farklı t-butil alkol standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarına ait ortalama alanları çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 t-Butil alkol doğrusallık çözeltileri ve ortalama pik alanları

Çalışılan Konsantrasyon (ppm)	Ortalama Pik Alan (μA)
38,78	13986
58,17	24903
77,56	28167
116,34	42141
155,12	57233

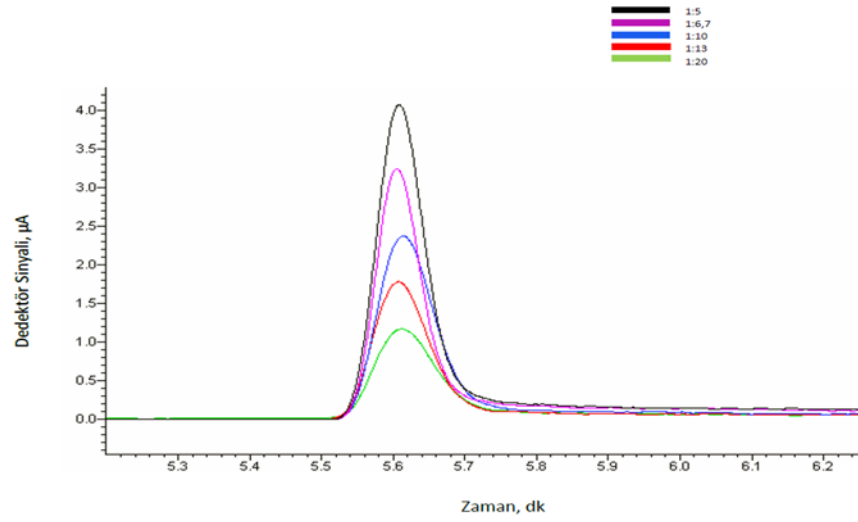
(n=4)

Ortalama pik alanları ve konsantrasyona karşı çizilen kalibrasyon grafiği **şekil 4.19'da** yer almakta olup korelasyon katsayısı 0,9904 olarak bulunmuştur.

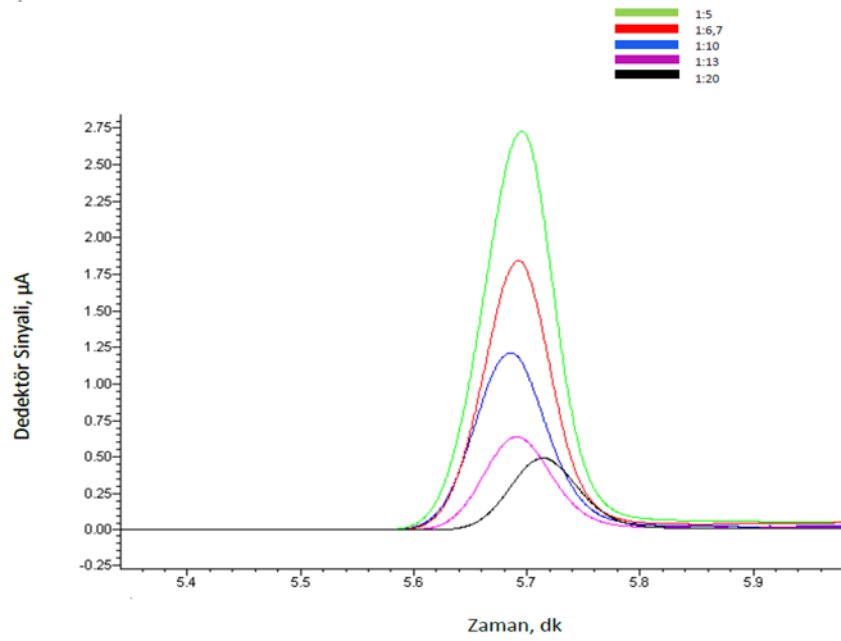


Şekil 4.19 t-Butil alkol için çizilen doğrusallık grafiği

Metil alkol ve t-butil için ayrı ayrı hazırlanan 5 farklı konsantrasyona ait doğrusallık çözeltilerinden elde edilen kromatogramların karşılaştırmalı görüntüsü **şekil 4.20 ve 4.21'de** yer almaktadır.



Şekil 4.20 Doğrusallık parametresi için hazırlanan metil alkol çözeltileri kromatogram çıkartması



Şekil 4.21 Doğrusallık parametresi için hazırlanan t-butil alkol çözeltileri kromatogram çıkartması

4.4 Doğruluk

% Geri kazanım değerlerinin ortalaması kabul kriterlerinin içinde ve her seviyedeki geri kazanım çalışmalarının ortalamaları da %95 güven sınırları içinde bulunmuştur.

Metil alkol ve t-butil alkole ait geri kazanım çalışmaları çizelge 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.12 Metil alkol için yapılan geri kazanım sonuçları

Doğruluk Çözeltileri	Eklenen konsantrasyon (ppm)	Hesaplanan konsantrasyon (ppm)	% Geri kazanım
1:20	37,41	37,16	99,33
1:10	74,82	72,32	96,66
1:5	149,63	147,93	98,86
Ortalama % Geri Kazanım			98,28
Standart Sapma			1,17
%95 Güven Aralığı			98,28±0,88

(n=4)

Çizelge 4.13 t-Butil alkol için yapılan geri kazanım sonuçları

Doğruluk Çözeltileri	Eklenen konsantrasyon (ppm)	Hesaplanan konsantrasyon (ppm)	% Geri kazanım
1:20	38,78	35,68	92,02
1:10	77,56	75,26	97,03
1:5	155,12	153,97	99,26
Ortalama % Geri Kazanım			96,10
Standart Sapma			3,03
%95 Güven Aralığı			96,10±2,28

(n=4)

4.5 Alt Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bu çalışmada, Uluslararası Uyum Konseyinin Q2(R1) kılavuzunu takip ederek alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı sinyal/gürültü yaklaşımına göre hesaplanmıştır.

1:10 oranında hazırlanan metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinin sinyal/gürültü hesaplanarak bu oranın 10:1 olacak şekilde uygun seyreltme işlemleri yapılarak alt tayin sınırları tespit edilmiştir.

Gözlenebilme sınırının belirlenmesi için ise genellikle 3:1 veya 2:1 arasındaki bir sinyal-gürültü oranı kabul edilebilir olarak değerlendirilir. Bu nedenle, gözlenebilme sınırı hesaplamalarında ise alt tayin sınırı çözeltilerinde 3,3 mL alınarak saf su ile 10 mL'ye seyreltilmiştir.

Alt tayin sınırı LOQ ve LOD parametrelerine ait sonuçlar **çizelge 4.14'te** yer almaktadır.

Çizelge 4.14 Metil alkol ve t-butil alkol için LOQ ve LOD sonuçları

Metil Alkol		t-Butil Alkol	
Alt Tayin Sınırı (LOQ)		Alt Tayin Sınırı (LOQ)	
Konsantrasyon (ppm)	14,81	Konsantrasyon (ppm)	15,49
Alan (μ A)	19430	Alan (μ A)	7622
S/N	11,20	S/N	12,28
Gözlenebilme Sınırı (LOD)		Gözlenebilme Sınırı (LOD)	
Konsantrasyon (ppm)	4,89	Konsantrasyon (ppm)	5,11
Alan (μ A)	6411	Alan (μ A)	2518
S/N	3,71	S/N	3,22

(n=4)

4.6 Kesinlik

Kesinlik parametresini kanıtlamak amacıyla metot tekrarlanabilirliği ve laboratuvar içi tekrarlanabilirlik parametreleri sırasıyla çalışılmıştır. Bu kapsamda numune çözeltileri

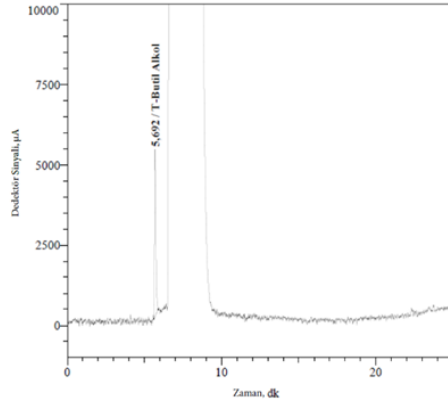
ardışık olarak sisteme enjekte edilmiştir. Numune çözeltilerinin ardışık enjeksiyonlarına ait sonuçları **çizelge 4.15'te** yer almaktadır.

Çizelge 4.15 Tekrarlanabilirlik parametre sonuçları

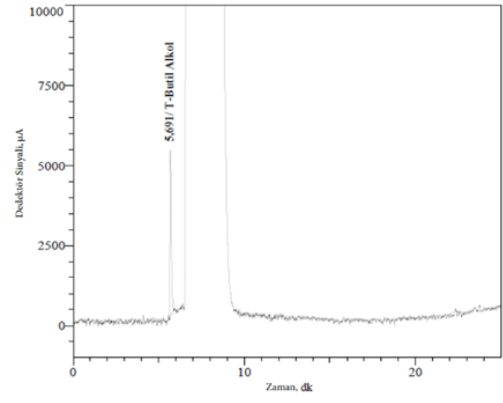
Numune	Analit	Ortalama Alınma Zamanı (dk)	Ortalama Alan (μV)	Numunedeki t-butil Alkol ve Metil Alkol Miktarı (ppm)
Gümrük Numunesi 1	t-Butil Alkol	5,672	26890	71,67
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 2	t-Butil Alkol	5,697	27292	72,80
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 3	t-Butil Alkol	5,715	26097	69,43
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 1	t-Butil Alkol	5,692	20811	54,53
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 2	t-Butil Alkol	5,670	22742	59,97
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi

(n=4)

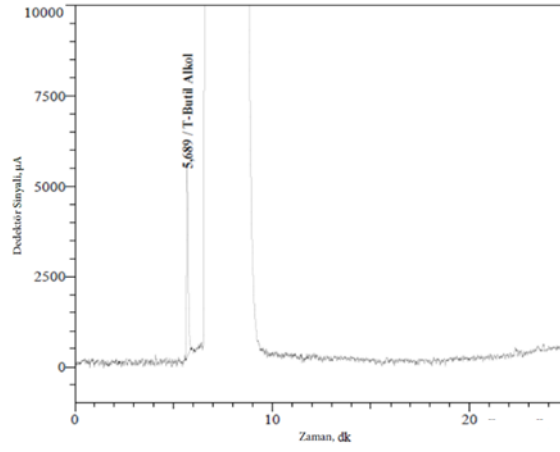
Tekrarlanabilirlik parametresinden elde edilen numune kromatogramları **şekil 4.21 ve 4.23'te** verilmiştir.



(a)

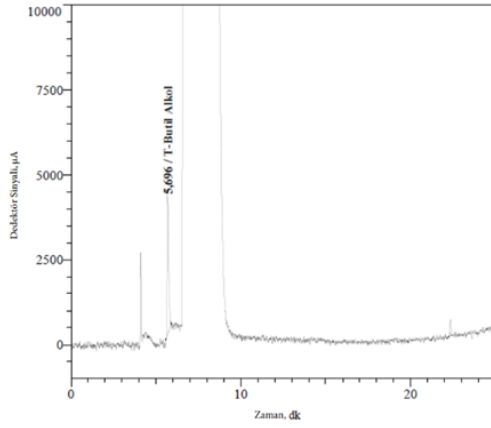


(b)

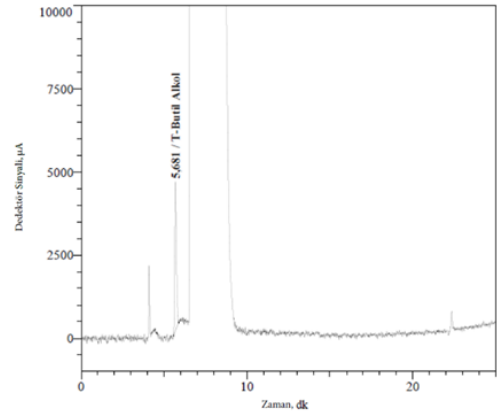


(c)

Şekil 4.22 (a) Gümrük-1, (b) Gümrük-2 ve (c) Gümrük-3 numuneleri için tekrarlanabilirlik parametresi örnek kromatogramları



(a)



(b)

Şekil 4.23 (a) Kolonya-1 ve (b) Kolonya-2 numuneleri için tekrarlanabilirlik parametresi örnek kromatogramları

Laboratuvar içi kesinlik parametresi için farklı günde hazırlanan numune çözeltilerinin ardışık enjeksiyonlarına ait sonuçlar **çizelge 4.16**'da yer almaktadır.

Çizelge 4.16 Laboratuvar içi kesinlik parametre sonuçları

Numune	Analit	Ortalama Alınma Zamanı (dk)	Ortalama Alan (µV)	Numunedeki t-butil Alkol ve Metil Alkol Miktarı (ppm)
Gümrük Numunesi 1	t-Butil Alkol	5,702	26843	71,53
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 2	t-Butil Alkol	5,716	26858	71,58
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 3	t-Butil Alkol	5,728	25910	68,90
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 1	t-Butil Alkol	5,701	21015	55,11
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 2	t-Butil Alkol	5,711	21781	57,26
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi

(n=4)

Tekrarlanabilirlik (1.gün) ve laboratuvar içi kesinlik (2.gün) parametreleri arasındaki % fark hesaplanmış olup sonuçlar **çizelge 4.17’de** yer almaktadır.

Çizelge 4.17 Tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi kesinlik sonuçları arasındaki % fark

Numune	Analit	1.gün sonuçları	2.gün sonuçları	% Fark
Gümrük Numunesi 1	t-Butil Alkol	71,67	71,53	-0,20
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 2	t-Butil Alkol	72,80	71,58	-1,68
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Gümrük Numunesi 3	t-Butil Alkol	69,43	68,90	-0,76
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 1	t-Butil Alkol	54,53	55,11	1,06
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
Kolonya 2	t-Butil Alkol	59,97	57,26	-4,52
	Metil Alkol	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi

Yapılan tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi kesinlik parametresine ait sonuçlar incelendiğinde farklı günlere ait hesaplanan miktar tayini sonuçları arasındaki % fark küçük olup kabul kriteri içerisinde gelmiştir.

4.7 Sağlamlık

Sağlamlık parametresi için mevcut yöntem üzerinde bilinen ve ufak değişiklikler yapılarak metil alkol ve t-butil alkol standart çözeltilerinin tekrarlı enjeksiyonları yapılmıştır. Sistem uygunluk parametresinde enjekte edilen metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinden elde edilen sonuçlar mevcut yönteme ait sonuçlar olarak kabul edilerek sağlamlık parametresinden elde edilen piklerin alıkonma zamanları, pik şiddetleri, teorik plaka sayıları ve kuyruklanma faktörü değerleri seçicilik sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

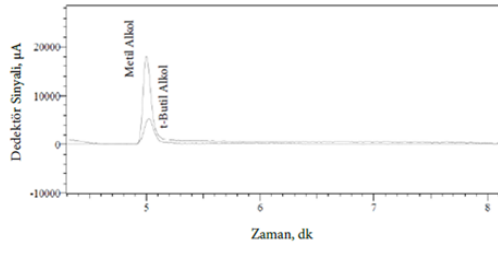
Paralel hazırlanan metil alkol ve t- butil alkol standartları için ardışık enjeksiyonlar ile elde edilen sağlamlık parametresinde çalışılan kolon sıcaklığı, akış hızı ve SPL sıcaklığı değişimleri **çizelge 4.18’de** yer almaktadır.

Çizelge 4.18 Sağlamlık parametre sonuçları-1

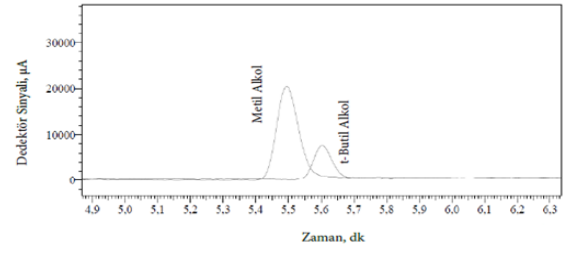
Kolon Sıcaklığı Değişimi						
Analit	25 °C Kolon Sıcaklığı		Mevcut Yöntem 30 °C Kolon Sıcaklığı		35 °C Kolon Sıcaklığı	
	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol
Alikonma Zamanı	5,00	5,02	5,51	5,65	5,49	5,60
Alan	85197	32511	97618	25562	97318	31968
Teorik Plaka Sayısı	24939	16370	25120	32144	31487	44156
Kuyruklanma Faktörü	1,57	1,18	1,12	1,09	1,21	1,17
Akış Hızı Değişimi						
Analit	0,30 mL/dk. Akış Hızı		Mevcut Yöntem 0,37 mL/dk. Akış Hızı		0,44 mL/dk. Akış Hızı	
	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol
Alikonma Zamanı	6,56	6,67	5,51	5,65	5,57	5,68
Alan	86987	22126	97618	25562	91317	35899
Teorik Plaka Sayısı	32588	40035	25120	32144	32910	37360
Kuyruklanma Faktörü	1,25	1,08	1,12	1,09	1,24	1,17
SPL Sıcaklığı Değişimi						
Analit	180 °C SPL		Mevcut Yöntem 200 °C SPL		220 °C SPL	
	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol
Alikonma Zamanı	5,64	5,75	5,51	5,65	5,57	5,71
Alan	125469	42780	97618	25562	95392	20659
Teorik Plaka Sayısı	22265	31566	25120	32144	37248	39672
Kuyruklanma Faktörü	1,30	1,17	1,12	1,09	1,26	1,13

(n=4)

Sağlamlık parametresine ait kromatogramlar **şekil 4.24-4.26’te** gösterilmiştir.

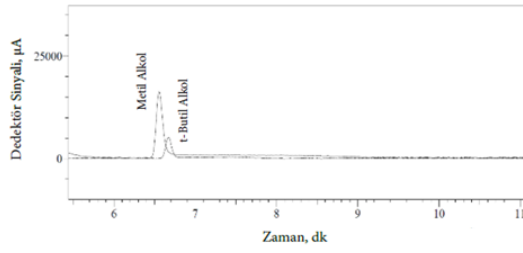


(a)

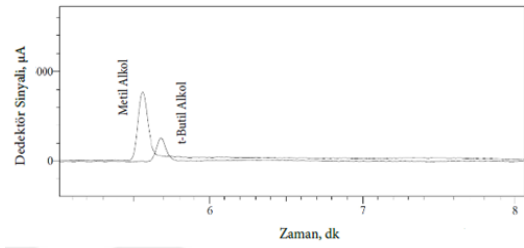


(b)

Şekil 4.24 25 °C kolon sıcaklığı (a) ve 35 °C kolon sıcaklığına (b) ait örnek 74,82 ppm v metil alkol ve 77,56 ppm t-butil alkol kromatogramları

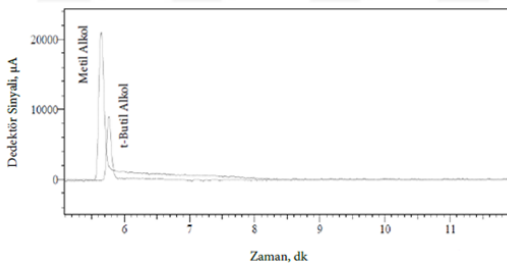


(a)

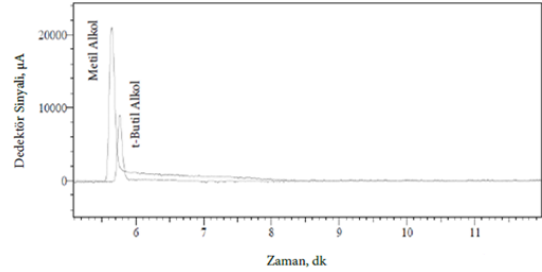


(b)

Şekil 4.25 0,30 mL/dk. akış hızı (a) ve 0,44 mL/dk. akış hızına ait örnek 74,82 ppm metil alkol ve 77,56 ppm t-butil alkol kromatogramları



(a)



(b)

Şekil 4.26 180 °C SPL (a) ve 220 °C SPL sıcaklığına ait örnek 74,82 ppm metil alkol ve 77,56 ppm t-butil alkol kromatogramları

Sağlamlık parametresinden elde edilen metil alkol ve t-butil alkole ait alıkonma zamanlarındaki % fark hesaplamaları çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.19 Sağlamlık parametre sonuçları-2

Kolon Sıcaklığı	25 °C	Mevcut Yöntem 30 °C	% Fark	35 °C	Mevcut Yöntem 30 °C	% Fark
Metil Alkol	5,00	5,51	-9,26	5,49	5,51	-0,36
t-Butil Alkol	5,02	5,65	-11,15	5,60	5,65	-0,88
Akış Hızı	0,30 mL/dk.	Mevcut Yöntem 0,37 mL/dk.	% Fark	0,44 mL/dk.	Mevcut Yöntem 0,37 mL/dk.	% Fark
Metil Alkol	6,56	5,51	19,06	5,57	5,51	1,09
t-Butil Alkol	6,67	5,65	18,05	5,68	5,65	0,53
SPL Sıcaklığı	180 °C	Mevcut Yöntem 200 °C	% Fark	220 °C	Mevcut Yöntem 200 °C	% Fark
Metil Alkol	5,64	5,51	2,36	5,57	5,51	1,09
t-Butil Alkol	5,75	5,65	1,77	5,71	5,65	1,06

4.8 Stabilité

Metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinin stabilitesini gözlemlemek amacıyla çözeltiler oda koşullarında bekletilerek başlangıç, 24. saat ve 48. saate karşılık gelen enjeksiyonları sırayla sisteme verildi.

Enjekte edilen çözeltiler için çalışılan stabilite periyodu içerisindeki alıkonma zamanı, alan, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörüne ait elde edilen değerler **çizelge 4.20'de** yer almaktadır.

Çizelge 4.20 Stabilite parametre sonuçları-1

Analit	Başlangıç		24 Saat		48 Saat	
	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol	Metil Alkol	t-Butil Alkol
Alıkonma Zamanı	5,51	5,65	5,50	5,71	5,49	5,77
Alan	97618	25562	92144	24910	93744	25611
Teorik Plaka Sayısı	25120	32144	28125	30741	26952	29017
Kuyruklanma Faktörü	1,12	1,09	1,74	1,25	1,01	1,64

Başlangıç, 24. saat ve 48. saate ait metil alkol ve t-butil alkol standartlarına ait elde edilen alanların % fark sonuçları **çizelge 4.21’de** verilmiştir.

Çizelge 4.21 Stabilite parametre sonuçları-2

Zaman	Metil Alkol Alanı (µA)	% Fark	t-Butil Alkol Alanı (µA)	% Fark
Başlangıç	97618	-	25562	---
24.saat	92144	-5,61	24910	-2,55
48.saat	93744	-3,97	25611	0,19

5. SONUÇ

Yapılan 11 farklı deneme sonrası literatürde olmayan denatüre alkol içerisindeki metil alkol ve t-butil alkol tayin yöntemi kromatografik olarak geliştirilmiştir.

Her ne kadar alkol piklerinin alıkonma zamanı kısa olsa bile kolon fırın sıcaklığındaki gradient değişiminin baseline üzerine etkisi ve özellikle kolonya numunelerinden plasebo etkisi ile başka bir pik gelme ihtimali göz önünde tutularak enjeksiyon süresi 40 dakika olacak şekilde analitik metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bilinen bir konsantrasyonda sırasıyla enjekte edilen metil alkol, t-butil alkol, etil alkol ve numune çözeltileri farklı alıkonma zamanlarında dedekte edilmiş olup, ilgili alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olmadığı ve yöntemdeki seçiciliğin üstünlüğü ve analiz edilecek alkollere karşı spesifik bir metot olduğunu kanıtlamıştır.

Sistem uygunluk parametresi dikkate alındığında enjeksiyonlara ait bağıl standart sapmaların düşük olması, teorik plaka sayılarının yüksek olması ve kuyruklanma faktörünün beklenen aralıkta olması geliştirilen metoda ait sistemin uygun çalıştığını kanıtlamaktadır. Paralel hazırlanan ikişer metil alkol ve t-butil alkol standart çözeltileri için % benzerlik sonuçları sırasıyla %98,96 ve %102,99 olarak bulunmuştur. Metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerine ait % benzerlik kendi içlerinde uyumlu ve yüksektir. % Benzerliğin yüksek olması, aynı örneklerin farklı enjeksiyonlarının ya da tekrar analizlerinin birbirine çok yakın sonuçlar verdiğini ve yöntemin tutarlı bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

Sistem kesinliği değerlendirildiğinde ise standart çözeltilerinden yapılan ardışık enjeksiyonlarında elde edilen piklerin alıkonma zamanları ve alanları arasındaki bağıl standart sapma değeri %5'in altında olduğundan sistemin kesinliği bu çalışma için uygundur. Art arda verilen standart enjeksiyonlarına ait alıkonma zamanı sonuçlarına ait RSD değerleri metil alkol ve t-butil alkol için sırasıyla %0,340 ve %0,007 bulunmuştur. Bağıl standart sapmanın düşük olması sistem uygunluk parametresinde kesinliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen teorik plaka sayısının büyük olması da keskin ve

dar piklerin gözlenmesini destekleyici niteliktedir. Ardışık enjeksiyonlardan elde edilen piklere ait kuyruklanma faktörünün küçük olması da pik simetrilerinin iyi olduğunu kanıtlamaktadır.

Doğrusallık parametresi için konsantrasyona karşı ortama pik alanına göre metil alkol ve t-butil alkol doğrusallık grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafikler için en küçük kareler yöntemine göre seçilen regresyon doğru denklemi ve bunun korelasyon katsayısı değerlendirilmiştir. Geliştirilen metot ile metil alkol ve t-butil alkol doğrusallık çalışmalarına ait korelasyon katsayısı sırasıyla 0,9963 ve 0,9904 olarak bulunmuştur. Doğrusallık çalışmalarındaki korelasyon katsayısının yüksek olması ise yöntemin güvenilirliğini kanıtlar niteliktedir. Her iki değer de doğrusal ilişkinin güçlü olduğunu ve analitik yöntemin bu açıdan geçerli olduğunu kanıtlamıştır.

Metil alkol ve t-butil alkol için yapılan geri kazanım çalışması 3 noktada yapılarak ortalama değerler sırasıyla %98,28 ve %96,10 olarak bulunmuştur. Her iki geri kazanım oranı da kabul edilebilir aralıkta olduğundan, analitik yöntemin doğruluğu yüksek olarak kabul edilebilir. Sinyal/gürültü yaklaşımına göre metil alkol için alt tayin sınırı 14,81 ppm, gözlenebilme sınırı ise 4,89 ppm olarak bulunurken, t-butil alkol için alt tayin sınırı 15,49 ppm, gözlenebilme sınırı ise 5,11 ppm olarak hesaplanmıştır.

Valide edilen yöntemde çalışma aralığı metil alkol için 14,81 ppm – 149,63 ppm, t-butil alkol için ise 15,49 ppm – 155,12 ppm olarak raporlandırılmıştır. Bu aralıklar, kalibrasyon eğrisinde kullanılan konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar dikkate alınarak valide edilmiştir. Bu, yöntemin her iki analit için bu konsantrasyonlar arasında güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmada, gümrükten gelen 3 farklı ticari etil alkol numunesi, piyasadan satın alınan Kolonya 1 ve Kolonya 2 numune olarak kullanılmış olup, analitik metot validasyonu kapsamında ayrı günlerde tekrarlanabilirlik ve laboratuvar için kesinlik parametreleri çalışılmıştır. Tekrarlanabilirlik parametresi kapsamında gümrük ve kolonya numuneleri için elde edilen sonuçlar sırasıyla, 71,67 ppm, 72,80 ppm, 69,43 ppm, 54,53 ppm ve 59,97 ppm olarak bulunmuştur. Laboratuvar içi kesinlik parametresi ayrı bir gün aynı cihaz ve

aynı analist ile gerçekleştirilmiştir. Gümrük ve kolonya numuneleri için elde edilen sonuçlar sırasıyla, 71,53 ppm, 71,58 ppm 68,90 ppm, 55,11 ppm ve 57,26 ppm olarak bulunmuştur.

Numune enjeksiyonlarına ait analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma değerinin %5 altında olması yöntem kesinliğinin uygun olduğunu göstermektedir. Analiz sonuçları arasındaki RSD değerinin %5'in altında çıkması ve farklı bir günde aynı numuneler için yapılan analiz sonuçları arasındaki % değişimin 5'in altında olması analitik yöntemin farklı bir günde farklı bir analiz tarafından uygulanabilirliğini göstermektedir.

Sağlamlık parametresi kapsamında mevcut yöntem üzerinde kolon sıcaklığı, kolon akış hızı ve SPL sıcaklık değerlerine ait ufak değişimler yapılarak metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinin ardışık enjeksiyonları değerlendirilmiştir. Azalan sağlamlık parametreleri ile elde edilen kromatogramlar incelendiğinde metil alkol ve t-butil alkol arasındaki rezolüsyonun düştüğü ve mevcut yöntem ile alıkonma zamanları kıyaslandığında farkın %5'den yüksek olduğu görülmektedir. Artan sağlamlık parametreleri ile mevcut yönteme ait alıkonma zamanları arasındaki fark ise %5'den küçüktür. Ancak elde edilen kromatogramlara göre metil alkol ve t-butil alkol arasındaki rezolüsyonun en yüksek olduğu kromatografik mevcut yönteme aittir.

48 saat boyunca bekletilen metil alkol ve t-butil alkol çözeltilerinin başlangıç, 24.saat ve 48.saat enjeksiyonlarına ait elde edilen alıkonma zamanı ve alanları arasındaki değişime ait bağıl standart sapma değerinin %5'in altında olması, hazırlanan çözeltilerin 48 saat boyunca stabil kaldığını kanıtlamıştır.

Bu çalışmada seçicilik, sistem uygunluk, doğrusalılık, doğruluk, sağlamlık ve stabilite için validasyon parametreleri çalışılmış olup ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir. Literatüre katkı sağlayacak olan bu çalışma ile valide edilen yeni metodun bundan sonra yapılacak metil alkol ve t-butil alkol'ün GC/FID analizlerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Andersen, F. A. 2008. Final report of the safety assessment of Alcohol Denat., including SD Alcohol 3-A, SD Alcohol 30, SD Alcohol 39, SD Alcohol 39-B, SD Alcohol 39-C, SD Alcohol 40, SD Alcohol 40-B, and SD Alcohol 40-C, and the denaturants, Quassin, Brucine Sulfate/Brucine, and Denatonium Benzoate. İçinde International Journal of Toxicology (C. 27, Sayı SUPPL. 1, ss. 1-43). Taylor and Francis Ltd.
- Anonim. 2011. Etil Alkol Ve Metanolün Üretimi İle İç Ve Dış Ticaretine İlişkin Usul Ve Esaslar Hakkında Yönetmelik. Web Sitesi: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=15462&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5> Erişim Tarihi: 10.05.2024
- Anonymous. 1997. Methanol Health and Safety Guide. World Health Organization. Health and Safety Guide No:105.
- Anonymous. 2008. Denatured Alcohol Not For Human Consumption - European Commission. Web sitesi: https://taxation-customs.ec.europa.eu/denatured-alcohol-not-human-consumption_en Erişim Tarihi: 10.05.2024
- Anonymous. 2016. Report From The Commission to the Council, on the evaluation of Council Directive 92/83/EEC on the structures of excise duties on alcohol and alcoholic beverages. Web sitesi: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=COM%3A2016%3A676%3AFIN> Erişim Tarihi: 10.05.2024
- Bartle, K. D., & Myers, P. 2002. History of gas chromatography. Trends in Analytical Chemistry, 21; 9-10.
- Başıoğlu, F., N., Karaali, A., Pala, M., Magden, H., 1992. Damıtma Ürünleri ve Rakının Metanol ve Yüksek Alkol İçerikleri. Gıda Sanayi, 6(3), 20-28.
- Bekatorou, A. 2015. Alcohol: Properties and Determination. İçinde Encyclopedia of Food and Health ; 88-96. Elsevier Inc.
- Bucci, R., Balestrieri, F., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Marini, F. 2006. UV-vis spectrophotometric method for the quantitation of all the components of Italian general denaturant and its application to check the conformity of alcohol samples. Talanta, 68(3); 781-790.
- Destanoğlu, O., & Ateş, İ. 2019. Determination and evaluation of methanol, ethanol and higher alcohols in legally and illegally produced alcoholic beverages. Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry, 6(1), 21-32.
- Dietler, M. 2006. Alcohol: Anthropological/archaeological perspectives. Annual Review of Anthropology, 35; 229-249.

- Fidan, I., ve Şahin, İ., 1983. Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi. A.Ü.Z.F. Yayınları, Yayın No: 863, (304)s.
- Grob, R. Lee., & Barry, E. F. 2004. Modern practice of gas chromatography. Wiley-Interscience. Chapter Six. Detectors in Modern Gas Chromatography, 278-337.
- Guasch-Jané, M. R., Andrés-Lacueva, C., Jáuregui, O., & Lamuela-Raventós, R. M. 2006. First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb. *Journal of Archaeological Science*, 33(8), 1075-1080.
- Kim, H. M., Yang, G., Kim, J. Y., Yoon, S. J., Shin, B. K., Lee, J., Park, J. H., & Kwon, S. W. 2017. Simultaneous determination of volatile organic compounds in commercial alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of AOAC International*, 100(5), 1492-1499.
- Lister, A.S. 2005. Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis, 7; 203-208.
- Logsdon, J.E. 2000. Etanol. *Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Mahdissan, S. 1980. Chinese Origin of the Word Alcohol *American Journal of Chinese Medicine*, Vol. VIII, No. 3, 239-244.
- Mahler, J. 1997. National Toxicology Program Toxicity Report Series Number 53 NTP Technical Report on Toxicity Studies of Administered by Inhalation to F344/N Rats and B6C3F 1 Mice.
- Mcgonigle, F., & Ciullo, P. A. 1996. *Four Paints & Coatings*.
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., & Lordkipanidze, D. 2017. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), E10309-E10318.
- Paolini, M., Tonidandel, L., & Larcher, R. 2022. Development, validation and application of a fast GC-FID method for the analysis of volatile compounds in spirit drinks and wine. *Food Control*, 136.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6.th edition. 19, 217, 230-231.
- Postlewaite, J., & Taraban, L. 2015. 70% Ethanol Percentage Level in a Denatured Alcohol Solution by a Specific Gravity Test Method. 14(15); 1-2.
- Rahman, M. M., & Kim, K. H. 2014. Potential hazard of volatile organic compounds contained in household spray products. *Atmospheric Environment*, 85, 266-274.

- Rehm, J., Kailasapillai, S., Larsen, E., Rehm, M. X., Samokhvalov, A. V., Shield, K. D., Roerecke, M., & Lachenmeier, D. W. 2014. A systematic review of the epidemiology of unrecorded alcohol consumption and the chemical composition of unrecorded alcohol. *Addiction*, 109(6); 880-893.
- Savchuk, S. A., Kolesov, G. M., & Nuzhnyi, V. P. 2007. Chromatographic study of the chemical composition and potential toxicity of spirits and alcoholic beverages. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(6), 575-582.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*, 705-711.
- Step. 2023. Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures.
- Yarita, T., Nakajima, R., Otsuka, s., Ihara, T., Takatsu, A., Shibukawa, M. 2002 Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages by High-Performance Liquid Chromatography-Flame Ionization Detection Using Pure Water as Mobile Phase. *Journal of Chromatography A*, 387-391.
- Wang, Z., Pare, J.R.J. 1997. *Gas Chromatography (GC): Principles and Applications*.
- Zeece, M. 2020. *Flavors. Introduction to the Chemistry of Food* 213-250.