

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MODİFİYE GAZ KROMATOĞRAFİSİ-
HEADSPACE YÖNTEMİ İLE İNSAN PLAZMASINDA
TOLUEN, BENZEN, KSİLEN VE STİRENİN TAYİN
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Ayşe GÜVEN

**DİSİPLİNERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “modifiye gaz kromatografisi - headspace yöntemi ile insan plazmasında toluen, benzen, ksilen ve stirenin tayin yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli BilimlerAnabilim Dalında
Ayşe GÜVEN tarafından hazırlanan “MODİFİYE GAZ
KROMATOĞRAFİSİ-HEADSPACE YÖNTEMİ İLE İNSAN PLAZMASINDA
TOLUEN, BENZEN, KSİLEN VE STİRENİN TAYİN YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Oğuzhan YILDIZ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Tıp Fakültesi

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi Adli Bilimler
Enstitüsü

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
GİRİŞ	1
1.1. Toluenin Kimyası	3
1.1.1. Toluen Maruziyeti	5
1.2. Benzenin Kimyası	6
1.2.1. Benzen maruziyeti	8
1.2.1.1. Benzenin Nörotoksitesitesi	9
1.2.1.2. Benzenin Hematolojik Etkileri	10
1.2.1.3. Benzenin Genotoksik Etkileri	10
1.3. Ksilenin Kimyası	10
1.3.1. Ksilen Maruziyeti	12
1.4. Stirenin Kimyası	13
1.4.1. Stiren Maruziyeti	14
1.5. Toluen, Benzen, Ksilen ve Stirenin Toksikokinetiği	16
1.5.1. Absorbsiyon	16
1.5.2. Dağılım	17
1.5.3. Metabolizma	18
1.5.4. Atılım	20
1.6. Kromatografi	22
1.6.1. Gaz Kromatografisi	22
1.6.2. Dedektör	26
1.6.2.1. Alev İyonlaştırıcı Dedektör (FID-Flame Ionization Detector)	27
1.6.3. Numunenin zenginleştirilmesinde kullanılan yöntemler	27
1.6.3.1. Atılma ve Tutulma (Purge and Trap)	27
1.6.3.2. Soğuk Tuzaklama	28
1.6.3.3. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon	28
1.6.3.4. Headspace (Stass-Otto yöntemi)	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereçler	30
2.1.1. Kimyasal Maddele	30
2.1.2. Cihazlar ve Araçlar	30

2.2.Yöntem	31
2.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	31
2.2.1.1.Numunelerin Hazırlanmasında Kullanılan Plazma	31
2.2.1.2.İç Standart	31
2.2.1.3.Stok Çözeltilerin Hazırlanması	31
2.2.2.Gaz Kromatografisi Yöntemi	33
2.2.2.1.Gaz Kromatografisi	33
2.2.3.Verilerin İşlenmesi ve Analiz	34
2.2.4.Metod Geliştirme Çalışmaları	35
2.2.4.1.Headspace Şartlarının Optimizasyonu	35
2.2.4.2.Denge Zamanının Optimizasyonu	35
2.2.4.3.Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi	36
2.2.4.4.Tuz Bileşeni Etkisi	36
2.2.5. Analitik Metod Validasyonu	36
2.2.5.1.Doğrusallık	36
2.2.5.2.Tekrarlanabilirlik	37
2.2.5.3.Geri Kazanım	37
2.2.5.4.Hassasiyet	37
3. BULGULAR	38
3.1. Metod Geliştirme Safhasındaki Bulgular	38
3.1.1. Denge Zamanının Optimizasyonu	38
3.1.2. Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi	38
3.1.3. Tuz Bileşeni Etkisi	39
3.2. Metot Validasyonu	40
3.2.1. Doğrusallık	40
3.2.2. Tekrarlanabilirlik	43
3.2.3. Geri Kazanım	46
3.2.4. Hassasiyet	50
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	69

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimde gaz kromatografisi-head space yöntemi kullanılarak toluen, benzen, ksilen ve stiren'in insan plazmasında belirlenme yöntemi kurulmaya çalışılmıştır.

Büyük bilgi birikimi ve deneyimi ile yüksek lisans ve tez çalışmalarında yol göstericiliğini ve desteğini hiç eksik etmeyen, bilimsel araştırmaya karşı heyecanını, motivasyonunu ve titizliğini örnek almaya çalıştığım değerli hocam, Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN'e;

Deneylerin uygulamasındaki çok değerli katkılarını ve desteğini esirgemeyen Doç.Dr. Enis MACİT'e;

Sabrı, sevgisi ve desteği ile yanımda olan eşim Furkan Yesari GÜVEN'e;

Küçük yaşına rağmen yüksek lisans eğitimim boyunca büyük fedakârlıklarda bulunan kızım Asude GÜVEN'e;

Eğitimimin son döneminde aramıza katılan oğlum Faruk GÜVEN'e;

Teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACGIH	The American Conference of Governmental Hygienist
CAS	Chemical Abstract Service
CYP	Sitokrom P-450
DH	Dehidrojenaz
Enj	Enjeksiyon
EPA	Environmental Protection Agency
FID	(Flame Ionization Detector) Alev İyonlaştırıcı Dedektör
G.A.	Güven Aralığı
GC	(Gas Chromatography) Gaz Kromatografi
GSH	Glutasyon
HS	Headspace
IDLH	Immediately Dangerous to Life or Health
ISTD	İç Standart
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği
Kc	Dağılma Katsayısı
Kons	Konsantrasyon
LOD	(Limit of Detection) Tespit (Teşhis) Limiti
LOQ	(Limit of Quantitation) Tayin Limiti
MS	(Mass Spectrometer) Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
Ort	Ortalama
PID	(Photo Ionization Detector) Fotoiyonizasyon Dedektörü
RRF	(Relative Response Factor) Bağlı Cevap Faktörü
RSD	(Relative Standard Deviation) Bağlı Standart Sapma
SPME	(Solid Phase Micro Extraction) Katı Mikro Ekstraksiyon
St	Standart
TLV	(Threshold Limit Value) Eşik Değer
TWA	(Time Weighted Average) Zaman Ağırlıklı Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Toluen	4
Şekil 1.2. Toluen metabolizması	6
Şekil 1.3. Benzen Metabolizması	8
Şekil 1.4. Ksilen (-orto, -meta, -para)	11
Şekil 1.5. Ksilenin metabolizması	12
Şekil 1.6. Stiren	13
Şekil 1.7. Stiren Kimyası	13
Şekil 1.8. Stiren Metabolizması	15
Şekil 1.9. Gaz Kromatografisi Şeması	23
Şekil 1.10. Gaz Kromatografisi-Headspace Sistemi	24
Şekil 1.11. FID (Alev İyonizasyon dedektör)	26
Şekil 1.12. Headspace Tekniği	28
Şekil 3.1. Ekstraksiyon Süresinin Bağlı Pik Alanı Üzerindeki Etkisi	37
Şekil 3.2. Ekstraksiyon Sıcaklığının Bağlı Pik Alanı Üzerindeki Etkisi	38
Şekil 3.3. NaCl İlavesinin Pik Alanlarına Etkisi	39
Şekil 3.4. Toluene Ait Doğrusallık Grafiği	40
Şekil 3.5. Benzene Ait Doğrusallık Grafiği	40
Şekil 3.6. Ksilene Ait Doğrusallık Grafiği	41
Şekil 3.7. Stirene Ait Doğrusallık Grafiği	41

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1: Headspace ile Toluen, Ksilen, Stiren ve Benzen Ölçümü ve Enjeksiyon Programı	33
Çizelge 3.1.: Toluene Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	42
Çizelge 3.2.: Benzene Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	43
Çizelge 3.3.: Stirene Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	44
Çizelge 3.4.: Ksilene Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	45
Çizelge 3.5.: Toluene Ait Geri Kazanım Çalışması	46
Çizelge 3.6.: Benzene Ait Geri Kazanım Çalışması	47
Çizelge 3.7.: Ksilene Ait Geri Kazanım Çalışması	48
Çizelge 3.8.: Stirene Ait Geri Kazanım Çalışması	49
Çizelge 3.9.: Toluene Ait LOD ve LOQ Değerleri	50
Çizelge 3.10.: Benzene Ait LOD ve LOQ Değerleri	50
Çizelge 3.11.: Ksilene Ait LOD ve LOQ Değerleri	51
Çizelge 3.12.: Stirene Ait LOD ve LOQ Değerleri	51

1.GİRİŞ

Toluen, benzen, ksilen ve stiren olarak bilinen kimyasallar yapıştırıcılar, boyaların çözücüler ve bileşenleri için yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu nedenle bazen kimyasal ürün imalat fabrikalarında bu ürünlerin gazlarını solumakla zehirlenme olayları meydana gelebilmektedir.

Toluen, benzen ve ksilen içeren çözücülerin kötüye kullanılması günümüzde özellikle gençler için sosyal bir sorun haline gelmektedir. Son zamanlarda, yeni yapı malzemelerinden sızan stirenin hasta ev sendromuna neden olduğu gibi ilgi çekici bir konu belirtilmiştir.

Yukarıda belirtilen dört çözücü, inhalasyon yoluyla, ağız yolu ve deri yoluyla hızlı bir şekilde insan vücudunda emilir ve merkezi sinir sisteminin baskılanması gibi çeşitli rahatsızlıklara neden olur. Ek olarak, benzen ve stiren kanserojen bileşikler olarak kabul edilmektedir.

Gerek uçucu çözücü bağımlılarının kullandıkları çözücülerin içeriğinin büyük bir kısmını oluşturması, gerekse değişik alanlardaki işyerlerinde maruz kalınma sonucu ortaya çıkabilecek toksik etkiler nedeniyle bu maddelerin analizi adli toksikolojinin ilgi alanında yer almaktadır.

Toluen için Threshold Limit Value (maruz kalındığında sağlık üzerinde olumsuz etki görülmeyecek eşik değer) değeri 8 saat maruz kalınan hava için 100 mg/l'dir (Dossing ve ark., 1984) Toluen akciğerler tarafından kolayca absorblanır, inhale edilen doz %40'la %80 arasında alveollere geçer (Carlsson ve Ljungquist, 1982). Absorblanan toluenin %20'si akciğerlerden değişmeden atılır, kalanı ise öncelikle

hippürik asit şeklinde metabolize olur, daha küçük oranda da kresola metabolize olur. Toluen maruziyetinin düzeyinin belirlenmesi amacıyla idrarda metabolitlerinin ölçülmesi genelde uygulanan yöntemken idrarda toluenin kendisinin belirlenmesinin daha uygun olduğunu ileri süren araştırmacılar da bulunmaktadır (Kawai ve ark.,1996).

Benzen, aromatik hidrokarbonların ilklerindendir. Kan hücrelerinde kanser yapabilme etkisi bulunmaktadır. Benzen buharı için önerilen çalışma alanı sınırı (ACGIH TLV-TWA) 8 saatlik bir maruziyette ortalama olarak 0,5 ppm olarak belirtilmiştir. Tek bir dozda 7500–20000 ppm'ye maruz kalmak ölümcül olabilmektedir. Koku eşiğinin (2 ppm) hemen altındaki hava konsantrasyonlarına kronik olarak benzene maruz kalmak hematopoetik toksisite ile ilişkilendirilmiştir (Poisoning And Drug Overdose 4th Ed).

Ksilen için önerilen çalışma alanı sınırı (ACGIH TLV-TWA) 8 saatlik bir maruziyette ortalama olarak 50 ppm'dir (188 mg/m³). Yaşam için akut tehlike olarak kabul edilen hava seviyeleri limiti (IDLH) ksilen için 900 ppm'dir (Poisoning And Drug Overdose 4th Ed). Stiren akut etkilenim sonucu, 100 ppm (420 mg/m³) de muköz membranları, gözü ve üst solunum yollarını irrite eder. Göz bulguları yeterli dekontaminasyonla hızla düzelir; ancak direkt temas ve yanık varsa kalıcı körlüğe kadar ilerleyebilir. Stiren 200 ppm'de (840 mg/m³) göz ve burun, santral sinir sistemi irritasyonu, bulantı, koordinasyon bozukluğu reaksiyon verme zamanında azalma yapar. Stiren 350 ppm'de (1488 mg/m³) de belirgin santral etki ve motor fonksiyonlarda kayba yol açar. Fareler ve tavşanlar üzerinde yapılan deneylerde epoksit-diöl yolunun etkilendiği ve metabolitlerinin stirenden daha az toksik olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen bu bilgilerin ışığında gaz kromatografisi-headspace yöntemi kullanılarak toluen, benzen, ksilen ve stiren'in insan plazmasında belirlenme yöntemi kurulmuştur.

1.1. Toluen Kimyası

Tinere karakteristik kokusunu veren toluen, suda pratik olarak çözünmez ve renksizdir. Polarite yönünden zayıf olsa da organik çözücüler içinde sıkça kullanılmaktadır. Benzen gibi düşük konsantrasyonlarda kanserojen özellik taşımadığından dolayı sanayide organik çözücü olarak sıkça kullanılmasının en büyük sebebidir. Taşıdığı metil grubu sayesinde benzene göre çok daha reaktiftir ve asitlerle şiddetli tepkimeye yol açma özelliği vardır. Fosil yakıt kaynaklarından bol miktarda elde edilebildiğinden dolayı üretim maliyeti de düşüktür.

Toluen, (metilbenzen) organik sentezler için çözücü ve başlangıç maddesi olarak birçok önemli ticari ve endüstriyel uygulamaya sahip olan aromatik bir petrol hidrokarbondur.

Kimyasal ve fiziksel özellikleri şu şekildedir (EPA, 2005).

CAS numarası: 108-88-3

Yapısal formülü: $C_6H_5CH_3$

Molekül ağırlığı: 92,14 g

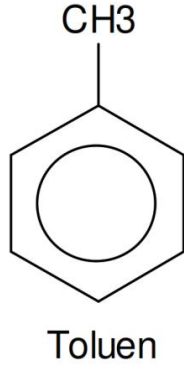
Yoğunluk: 0,867 g/mL

Buhar basıncı: 28,4 mm Hg (25°C)

Sudaki çözünürlüğü: 0,59 mg/mL (25°C)

Dağılma katsayısı; Log Kow: 2,72

Dönüşüm faktörü: 1 ppm = 3,77 mg/m³, 1 mg/m³ = 0,265 ppm (25°C, 760 mmHg)



Şekil 1.1 Toluen

Kimyasal yapıştırıcılarda sıkça kullanılan toluen uçucu madde bağımlısı kişiler tarafından sıkça inhale edilir. Sanayi ve diğer üretim sektörlerinde sıkça kullanılması ve ulaşımı kolay olması nedeni ile gelişim çağındaki çocuklar arasında sıkça kullanılmakta ve ciddi bir sağlık sorunu haline gelmektedir. (Ulakoğlu ve ark. 1998).

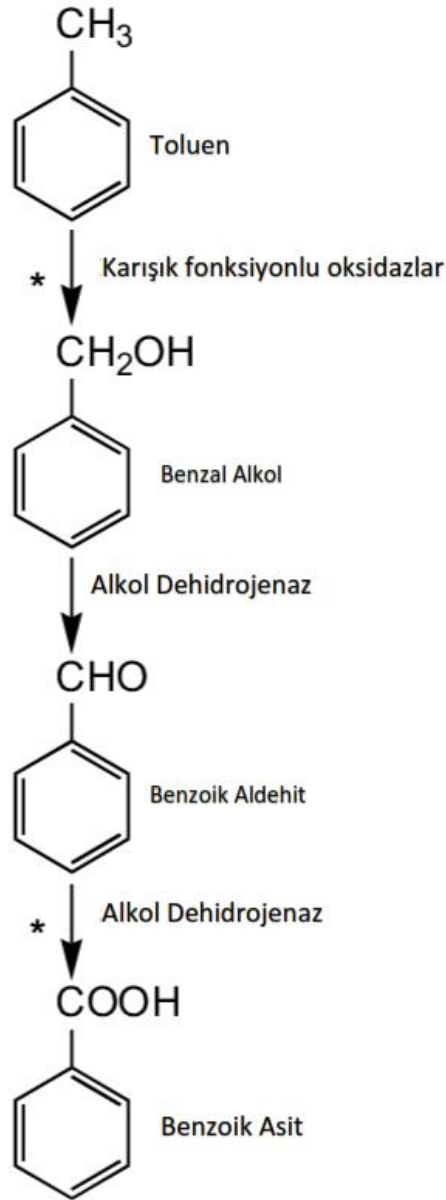
Toluenin akut narkotik etkileri benzeninkine benzer, ancak kronik toksisite çok daha az problemdir. Atmosferik toluen için geçerli eşik sınır değeri 100 ppm'dir (375 mg/m³). Endüstriyel maruz kalma genellikle buharın solunması veya sıvı ile dermal teması yoluyla oluşur (Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man).

Toluenin iritasyon yapıcı etkileri yüksektir. Bu sebepten dolayı lokal ve sistemik olarak göz, solunum yollarından ve ciltte hasar meydana getirebilir. Kısa süreli ve uzun süreli maruziyette doza bağlı olarak santral sinir sisteminde baskı, bellekte hasar meydana getirebilir. Meydana gelen belirtiler karın ağrısı, yürümede bozukluk, baş ağrısı ve dönmesi gibi genel rahatsızlıklar olabildiği gibi daha ileri seviyede böbreklerde asidoz, kollaps ve koma şeklinde de görülebilir (Kamijima ve ark., 1994, Streicher ve ark., 1981).

1.1.1 Toluen Maruziyeti

Toluen veya ilgili madde üretiminde veya toluen içeren maddelerin kullanıldığı iş alanlarında çalışanlar genel popülasyondan belirgin şekilde yüksek seviyelere maruz kalmaktadırlar. Endüstriyel alanlara veya petrol istasyonlarına yakın bölgelerde havada toluen varlığı çalışanlara ve bölge sakinlerine ek bir maruziyet nedenidir (Meek ve Chan, 1994, Angerer ve ark., 1997, Bieniek ve ark., 2004, Ana-Lilia ve ark., 2005).

Toluen derişimi büyük oranda değişken olmakla birlikte tütün dumanının başlıca bileşenlerindendir. Sigara başına derişim, yan dumanda tipik olarak ana dumandan fazladır. Filtresiz sigaranın ana dumanındaki toluen miktarı 100-200 µg aralığında ve yan duman/ana duman oranı 1,3 olarak belirlenmektedir. Sigara içicilerinin kandaki toluen seviyeleri içmeyenlere kıyasla belirgin olarak yüksektir. Bu seviye içme miktarından çok en son sigara içilmesinden sonra geçen süreye bağlıdır (Wang ve ark., 1993).



Şekil 1.2. Toluen metabolizması

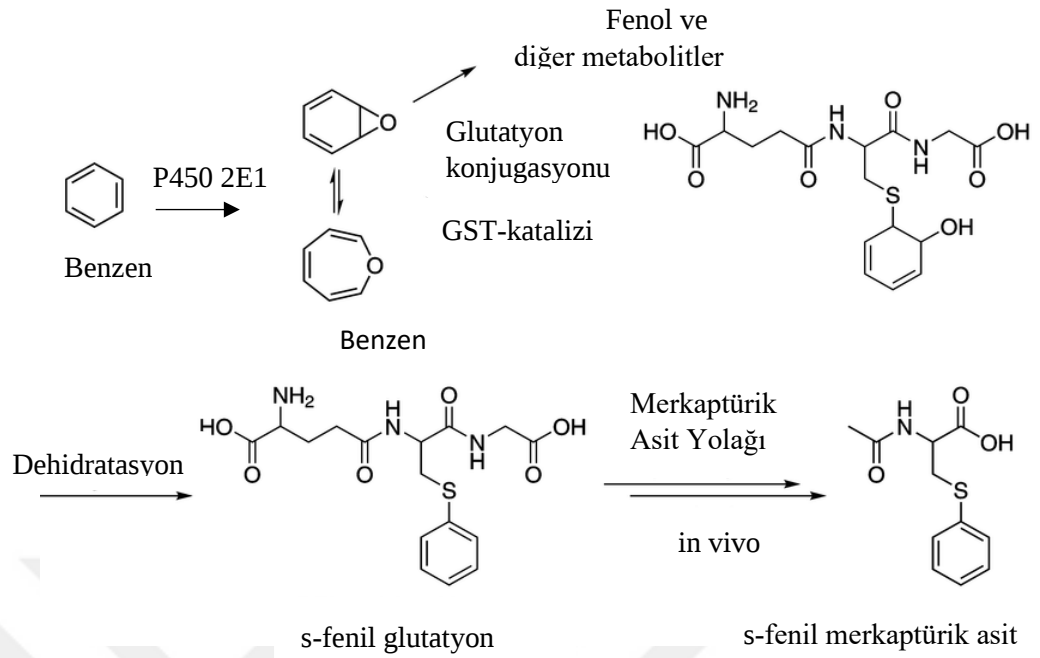
1.2. Benzen'in Kimyası

Aromatik bileşiklerinden olan benzen bilinen en eski bileşiklerden de biri olma özelliğine sahiptir. Benzen %92,3 C ve %7,7 H ihtiva eder ve kapalı formülü C_6H_6 dır.

Benzenin kullanılan halkalı olan iki yapı formülünden birisi Kekule diğeri ise Dewar formülüdür.

Benzen, etilbenzen (stiren sentezinde kullanılır), nitrobenzen (anilin sentezinde kullanılır), kümen (fenol sentezinde ve fenolik reçinelerin ve naylon ara maddelerin imalatında kullanılır), sikloheksan dahil olmak üzere birçok kimyasal maddenin üretiminde ara madde olarak kullanılır. Benzen ayrıca üretan, klorobenzen ve maleik anhidrit üretiminde bir öncüdür. Benzen daha önce bir çözücü olarak yaygın şekilde kullanılmıştır ancak birçok ülkede kanserojen etkiler konusundaki endişelerden dolayı bu kullanım azalmıştır. Benzen, doğal olarak oluşan bir petrol bileşenidir ve benzinde bulunur (ATSDR, 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde benzen, benzinde hacimce %2'den daha az ortalamaya sahiptir ve Avrupa'da konsantrasyon, hacimce %4 ila 5 arasındadır ve bu konsantrasyonları belirli karışımlarla aşılabilmektedir. Benzenden çevresel kirlenme otomobil egzozundan, kimyasal tesislerden, benzin dökülmelerinden ve kok fırınlarından çıkan emisyonlardan kaynaklanmaktadır (Haley, 1977). Bazı ülkelerde, benzen bir ev temizleyicisi olarak kullanılmaya devam etmektedir. Benzen'in ayrıca koklama ile kötüye kullanıldığı bildirilmiştir (Wineck ve ark., 1967)

Oda sıcaklığında renksiz ve hoş kokuya sahip bir sıvıdır. Yüksek yanıcı özelliğe sahiptir. Organik çözücüler arasında sıkça kullanılır. Kan hücrelerine zararından dolayı kanserojen bir maddedir. Pek çok organik çözücüde çözünebilir fakat suda çözünürlüğü nispeten düşüktür. Kömür katranı naftası diğer isimlerindendir.



Şekil 1.3. Benzen metabolizması

Benzen ucuz olmasından dolayı endüstride çok sık kullanılan organik çözücülerden biri olmaktadır (Bilir N 1997, Akdur R, 2005). Ayakkabı, çanta yapımı gibi tüketimi çok olan malzemelerin imalatında sıkça kullanıldığından dolayı maruziyeti de yüksek olmaktadır. Bunların dışında film sektöründe, kauçuk imalatında ara ürün olarak yüksek miktarda kullanılmaktadır (Velicangil S., 1980).

1.2.1. Benzen Maruziyeti

Benzene maruziyet en fazla solunum ile meydana gelmektedir. Alınan benzenin yaklaşık yarısı vücut tarafından absorbe olurken diğer kısmı atılmaktadır. Buna nazaran gıda yolu ve su ile alınan benzen miktarı çok düşük seviyelerdedir. Cilt teması ile vücuda alınan benzen zarar oluşturabilecek kan konsantrasyonlarına ulaşamamaktadır.

Vücuda alınan benzen tıpkı alkolde olduğu gibi vücutta tüm dokularda dağılır. Metabolizma yoluyla karaciğerde bulunan CYP 2E1 aracılığı ile oksidasyon şeklindedir (Bilir N., 2004, Org.Kimya, 2008, Bilir N., 1997, WHO 2003, Klanas ve ark., 2000).

Benzenin karaciğer metabolizasyonunda fenol, hidrokinon ve reaktif oksijen türevleri meydana gelebilir. S-fenilmerkaptürük asit'in idrarda tayini benzen maruziyeti için biyomarker olarak kullanılmaktadır. İdrarda benzen ve metabolitlerinin tayininde geçerli bir metod olan SPME-GCMS (Katı faz mikroekstraksiyon-gaz kromatografisi kütle spektrometrisi) sıkça kullanılmaktadır (Yavuz Ö., 2008)

Dünya Sağlık Örgütü 2003 yılında hazırladığı kılavuzda hava yolu ile maruz kalınan benzen miktarı 10 ppm ve üzerinde ise idrar yoluyla atılan fenol ile benzen miktarı arasında bir korelasyon olduğunu belirtmiştir. Bu düzeyin altında kalan miktar için ise solunum ile atılan miktarın benzen düzeyini yansıttığını belirtmişlerdir (WHO, 2003).

1.2.1.1.Benzen Nörotoksisitesi

Akut benzen intoksikasyonu sık görülen bir tablo değildir. Meydana geldiğinde ise en çok etkilenen sistem merkezi sinir sistemidir. Yüksek dozda akut maruziyette solunum depresyonu sonucu ölüm meydana gelebilmektedir.

1.2.1.2. Benzenin Hematolojik Etkileri

Benzen zehirlenmesinde aplastik anemi meydana gelir. Benzen lökoid serisi bozduğunda ise lökopeni ve lenfopeni meydana gelebilir. Bunun devamında sıkça tekrarlayan enfeksiyonlar meydana gelir ve peteşiyal tarzda kanamalar görülebilmektedir (Aksoy M., 1989)

1.2.1.3. Benzenin Genotoksik Etkileri

Benzen kromozomal kırılmalara sebep olabilir. Bu etkiler benzenin 100 ppm ve üzeri maruziyet durumu söz konusu olduğunda görülebilir (WHO, 2003). Buna nazaran bazı çalışmalar bu yüksek konsantrasyona ulaşmadan da 10 ppm gibi maruziyet seviyelerinde bile aşırı kromozomal etkiler görülebileceğini belirtmişlerdir (Major ve ark., 1994, Karacić ve ark., 1995).

1.3. Ksilen'in Kimyası

Kimyasal ve fiziksel özellikleri (EPA 2005).

CAS no:1330-20-7

Kimyasal formülü: $C_6H_4(CH_3)_2$

Molekül ağırlığı: 106,16 g/mol

Fiziksel görünüm: Berrak, temiz, kokusuz

Kaynama derecesi: 138,5 °C

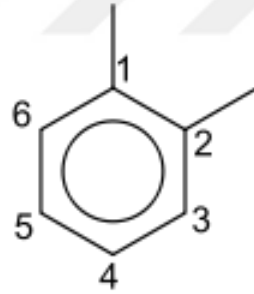
Yoğunluk: 0,864 g/mL

Ksilen, yüzey kaplamalarında buharlaşma derecelerinin düşük olmaları ve yüksek çözünürlüğe sahip olmalarından dolayı sıkça kullanılırlar. Organik çözücü

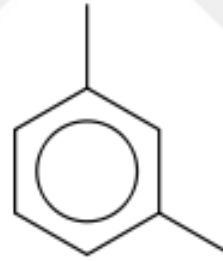
olarak genellikle oto ve mobilya sanayiinde sıkça kullanılırlar. Esas amaçları koruyucu tarzda yapılan kaplamalarda kullanımlarıdır.

Pek çok pestisit formülünde vasat olarak yer alırlar. Pestisitlerdeki varlıkları çözücü güçlerinden ve buharlaşma hızları gibi birtakım faktörlere bağlıdır. Ksilenler toluenle yakın kimyasal yapıya sahiptirler ve aynı zamanda zehirli kanserojen bileşikler içinde geçmektedirler.

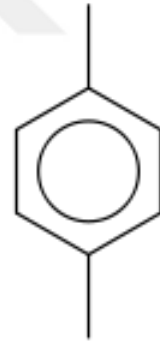
Organik çözücüler içinde ksilen üç izomer karışımı halinde bulunur (o-, m- ve p-). Bu izomerler içinde en çok meta izomeri (%50-60) bulunur. Bu nedenle işyeri ortamında ksilen maruziyetinin göstergesi olarak idrarda m-metilhippürik asit ölçülür (Carvalho ve ark., 1991)



1,2-dimetil benzen
(orto-ksilen)



1,3-dimetil benzen
(meta-ksilen)



1,4-dimetil benzen
(para-ksilen)

Şekil 1.4. Ksilen (-orto, -meta, -para)

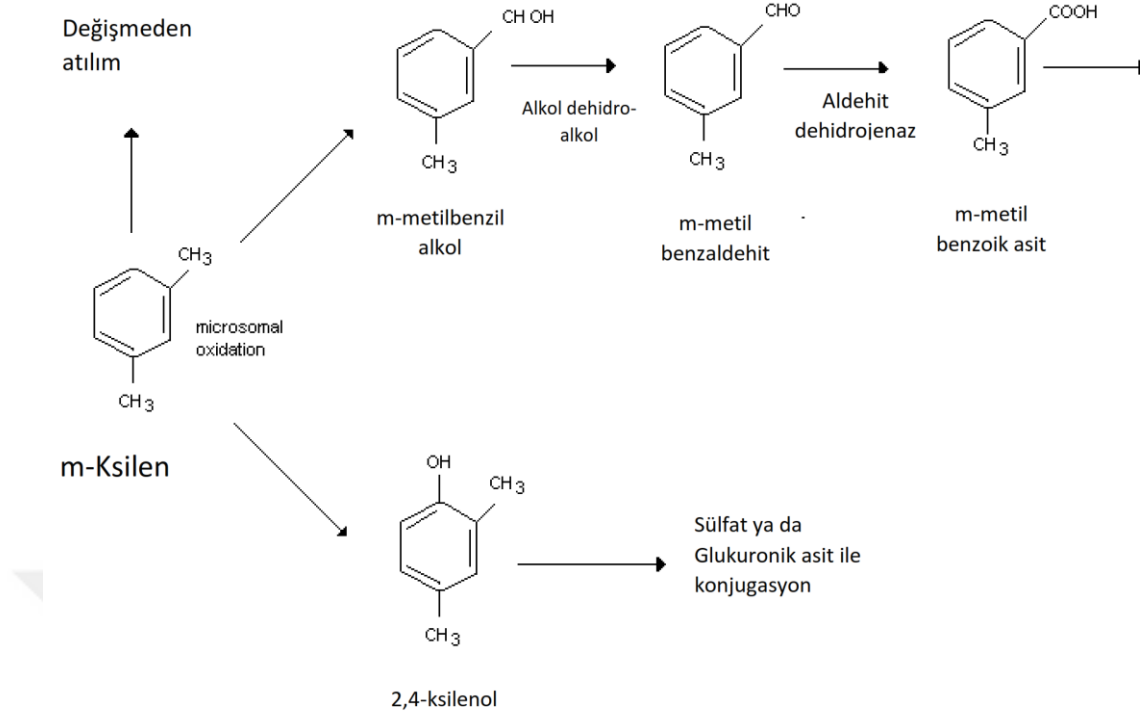
İnsan için havadaki zararlı o-ksilen düzeyi 100 ppm olarak belirtilmiştir. Tahriş edici özelliğinden dolayı soluk borusunda tahriş, solunum depresyonu, bulantı, kusma, baş dönmesi ve kansızlık belirtileri ortaya çıkabilir. Ksilen ile çalışılan ortamlarda

koruyucu tedbirler iş ve işçi güvenliği açısından alınmalıdır. Ksilen ile çalışan işçilerin periyodik sağlık muayeneleri karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının kontrolü açısından önem arz etmektedir.

1.3.1. Ksilen maruziyeti

Ksilenin deri ile meydana gelen hasarı maruz kalanlar için belki de en az dikkate alınan yolaktır. Fakat ksilen uzun süreli maruziyet sonucunda cilt altı yağ dokusunda birikerek ciddi rahatsızlıklara yol açabilmektedir. OSHA tarafından belirlenen değerler şu şekildedir TWA: 100 ppm, STEL: 15 dk için 150 ppm. Ksilen bazı koşullarda havada yanıcı karakter kazanabilmektedir. Gözle teması sonucu kalıcı veya geçici körlük oluşabilmektedir. Aynı zamanda teratojenik olduğu bildirilmiştir.

Yüksek dozda akut maruziyette solunum depresyonuna sebep olabilir. Düşük doz uzun süreli maruziyette iştah azalması, titreme, hipersalivasyon, vücut ısısında artış görülebilir. Kronik maruziyette mukozada kanamalar, santral sinir sistemi depresyonu, anemi, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulmalar bildirilmiştir.



Şekil 1.5. Ksilenin metabolizması

1.4.Stirenin Kimyası

Kimyasal ve fiziksel özellikleri (EPA 2005).

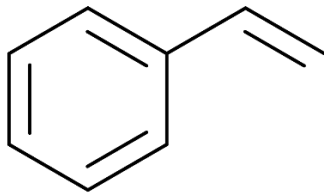
Kaynama Noktası: 145°C

Erime noktası: -30,6°C

Bağıl yoğunluk (su = 1): 0,91

Suda çözünürlük, g/100 mL 20°C de: 0,03

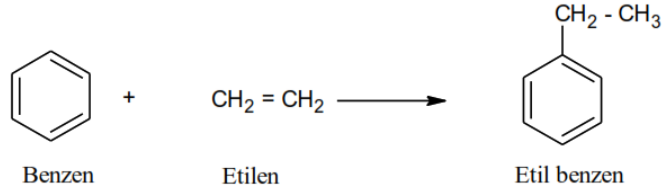
Molekül ağırlığı: 104,15 g/mol



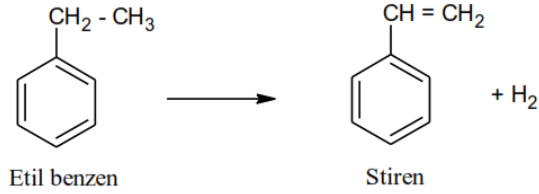
Şekil 1.6. Stiren

Stiren doymamış aromatiklerin en önemlisi sayılabilir. Pek çok poliesterin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır.

Alkilasyon;



Dehidrojenasyon;



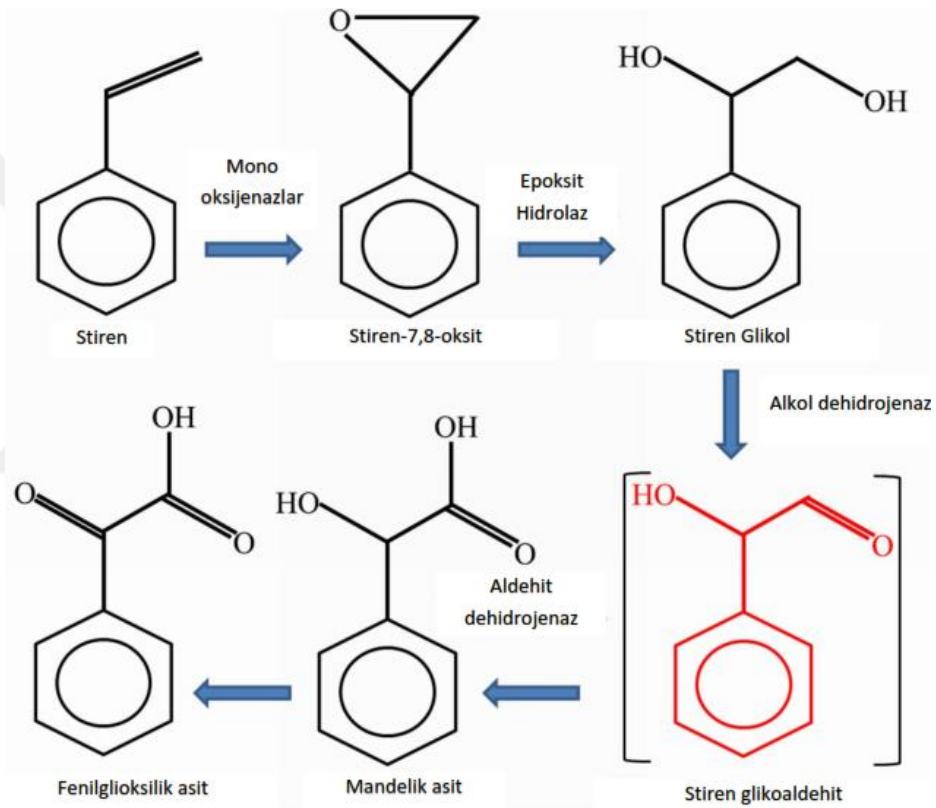
Şekil 1.7. Stiren kimyası

1.4.1. Stiren maruziyeti

Zehirlenme bulguları etil benzene benzer. Vücuda ağız yoluyla, akciğerlerden inhalasyon yoluyla veya sağlam deriden absorpsiyon yoluyla girebilir. Stiren, yanıcı, akut toksisitesi olan, göz iritanı, cilt iritanı, inhale edildiğinde akut akciğer ödemi, fazla miktarda maruz kalındığında santral sinir sistemi irritasyonu yapabilen sıvı özellikli bir maddedir. Stirenin uzun süreli maruziyeti sonrası geç dönem motor nöropati gelişebileceği bildirilmiştir. 25 derece üzerinde buharlaşabilir, suda çözünürlüğü azdır. Etanol, benzen, aseton ve eter ile çözülür.

Akut etkilenim sonucu, 100 ppm (420 mg/m³) de mukoz membranları, gözü ve üst solunum yollarını irrite eder. Göz bulguları yeterli dekontaminasyonla hızla düzelir; ancak direkt temas ve yanık varsa kalıcı körlüğe kadar ilerleyebilir. 200 ppm

(840 mg/m³) göz ve burun, santral sinir sistemi irritasyonu, bulantı, koordinasyon bozukluğu reaksiyon verme zamanında azalma yapar. 350 ppm (1488 mg/m³) de belirgin santral etki ve motor fonksiyonlarda kayba yol açar. Sinonimleri etenil benzen, styrolen, feniletilen, vinil benzendir. %70'i idrardan fenil asetik asit, α feniletil alkol, hippurik asit, mandelik asit ve benzoik asit olarak atılır. Fareler ve tavşanlar üzerinde yapılan deneylerde epoksit-diol yolunun etkilendiği ve metabolitlerinin stirenden daha az toksik olduğu gösterilmiştir (TATDTOX, 2019).



Şekil 1.8. Stiren metabolizması

1.5.Toluen, Benzen, Ksilen ve Stirenin Toksikokinetiği

1.5.1. Absorbsiyon

Toluenin oral absorpsiyonunu nicel olarak araştıran çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte tek doz oral maruziyet sonrasında yaklaşık %100 absorpsiyon gerçekleştiği gösterilmiştir. 3 saat boyunca gastrik bir tüp aracılığıyla 2 mg toluen/dak infüzyona maruz kalan gönüllülerde absorpsiyonun tam olduğu görülmüştür (Baelum ve ark., 1993, EPA, 2005). Toluen absorpsiyonu temel olarak solunum yoluyla gerçekleşmektedir. Alınma oranı maruziyet koşullarına bağlıdır ve 0,16-1,6 mg/dak olarak ölçülmüştür. Solunum sonrasında vücutta kalan toluen miktarının yüzdesi ortalama olarak 36-85 % olarak belirlenmektedir (Molhave ve ark., 1984, Pezzagno ve ark., 1988). Alıkonma maruziyet süresi arttıkça azalmaktadır. Fiziksel aktivite toplam alınmayı artırmakta ve alıkonmayı azaltmaktadır. Toluen insan derisinden oldukça yavaşca, 14-23 mg/cm² 2 saat arasında hızlarla absorbe edilmektedir (Dutkiewicz ve Tyras, 1968, Sato ve Nakajima, 1978). Perkütan absorpsiyonu solunuma kıyasla %1 civarındadır (EPA, 1990).

Benzenin insanlarda solunum yoluyla emilimi ilk 5 dakika içinde %70 ila 80 arasında değişmekte ve daha sonra yaklaşık %50'ye düşmektedir (Srbova ve ark., 1950). Kemirgenlerde solunan buhar konsantrasyonu 10 ila 1000 ppm'den daha fazla arttıkça benzen yüzdesi azaldığı bildirilmiştir (Sabourin ve ark., 1987). Benzen, hayvan modellerinde, örnek olarak tavşanlarda %90 civarında oral yolla iyi bir emilime sahiptir (Sabourin ve ark., 1987). İnsanlarda in vitro dermal absorpsiyon, 13,5 saatlik bir maruziyet süresinde %0,2 olarak bildirilmiştir (Loden, 1986). 1 ppm benzen bulunan bir ortamda, çözücü içinde %0,5 benzen kullanan korunmasız bir işçi teorik olarak solunum yoluyla 14 mg benzene maruz kalırken bu oran peruktan olarak değerlendirildiğinde 4 ila 8 mg benzene maruz kalabilmektedir (Susten ve ark., 1985).

Ksilen için oral yolla alımda barsaktan emilimin hızlı olduğu belirtilmiştir. Alımdan 1-2 saat sonra kanda maksimum konsantrasyonda ksilen tespit edilmiştir (Bergman K., 1979). İnhalasyon yolu maruziyet zamanı ve miktarına bağlı olarak bireyler arasında çok az bir farkla ksilen miktarı %63,6 olarak tespit edilmiştir (Sedivec ve Flek., 1976). Aynı zamanda inhalasyon yolu ile alımında 15-30 dakika arasında kan konsantrasyonları en yüksek seviyede bulunmuştur (Bergman K., 1979). Ağır dermal maruz kalma koşullarında, saf sıvı m-ksilen sağlam ciltte yaklaşık 2 g/cm²/dakika oranında maruziyete sebep olduğu bildirilmiştir (Engstrom K., 1977). Gönüllüler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada sıvı ksilenin ciltten 4.5-9,6 mg/cm²/saat emilim gösterdiği gösterilmiştir (Dutkiewicz., 1968).

Stiren buharlarının perkütan absorpsiyonu çok küçüktür (sadece yaklaşık %2). Sıvı stirenin deriden emilimi 9 ila 15 mg/cm²/s'dir. Stiren buharları akciğerlerden emilir. (Proctor, 1988). Dozun %59 ila 88'inin, 20 ila 200 ppm aralığındaki atmosferik konsantrasyonlarda stiren solunmasından sonra absorbe edildiği, ancak örnekleme sırasında artan havalandırma koşullarında daha yüksek değerlerde olduğu gösterilmiştir (Fielder ve ark., 1981).

1.5.2. Dağılım

Toluen maruziyeti ve ölüm arasındaki kısıtlı zaman toluenin çevresel vücut dokularına dağılımını sınırlamıştır. 625 mg/kg toluen ağız yoluyla alındıktan yarım saat sonra ölen bir kişide en yüksek toluen konsantrasyonu karaciğerde (433,5 µg/g), sonra sırasıyla pankreasta (88,2 µg/g), beyinde (85,3 µg/g), kalpte (27,6 µg/g), vücut yağlarında (12,2 µg/g) ve omurilik sıvısında (11,1 µg/g) tespit edilmiştir (Ameno ve ark., 1989). İnhalasyon ve oral maruziyet arasında beyindeki toluen dağılımı açısından benzerlik bulunmaktadır (Ameno ve ark., 1992). İnsanlarda ve hayvanlarda dermal maruziyet sonrası dağılımla ilgili bir çalışma tespit edilememiştir. Dermal maruziyet diğer maruziyet yollarına kıyasla çok küçük miktarlardadır. Alveolar hava ve kandaki

toluen seviyeleri arasında insanlarda bir ilişki vardır. İnsanda 4 saat boyunca 80 ppm toluen maruziyeti sonrasında kandaki toluen miktarı 2 saat süresince 6-7 µmol/L seviyesinde bulunmuştur (Hjelm ve ark., 1988).

Benzen solunumu izleyerek vücuda dağılmıştır ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda lipofilikliğinden dolayı yağ dokusunda iyi bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (Sato, 1975, Rickert ve ark., 1979). Maruziyetten kısa süre sonra ölen bireyler üzerindeki yapılan otopsilerinde, beyinde yüksek seviyelerde benzen bulunmuş buna nazaran yağda, kanda, böbreklerde ve karaciğerde daha düşük seviyelerde benzen tespit edilmiştir. (Tauber, 1970, Winek, 1971). İki saat boyunca 25 ppm benzene maruz kalma, ortalama 0,2 mg/L'lik bir maksimum kan benzen konsantrasyonu meydana getirmiştir (Sato, 1975). Oral veya dermal maruziyetten sonra dağılım ile ilgili insan çalışmaları mevcut değildir (USHSS, 2006.)

Ksilenin geniş bir doku dağılımı bulunmaktadır. Yaklaşık 1,7 ila 3,3 arasında değişen dağılım katsayısına sahip damar bakımından zengin parankimal organlar gibi nispeten iyi perfüze edilmiş dokular dakikalar içinde dengeye ulaşır; kaslar sadece birkaç saat sonra dengelenir. Adipoz doku dengesine ise büyük ölçüde artan doku afinitesi dolayısıyla kapasitenin ve birim hacim başına düşük perfüzyonun bir araya gelmesi nedeniyle sürekli maruz kalmadan birkaç iş günü sonrasında ulaşılmaktadır (Riihimaki ve Savolainen, 1980).

1.5.2. Metabolizma

Karaciğerin toluen metabolizmasında başlıca etkin organ olduğu düşünülmektedir (Wallen ve ark., 1985, Wilkins-Haug, 1997, Voss ve ark., 2005). Toluene ardışık hidroksilasyonla ve benzoik aside oksidasyonla metabolize olmaktadır. Glisinin benzoik asitle konjugasyonu sonucu hippürik asit oluşturması toluen

detoksifikasyonu ve atılımında ana yolak olmaktadır. Toluen metabolizmasında başlangıç adımı karaciğerde gerçekleşen sitokrom P-450 (CYP) enzimleriyle transformasyondur. Bunlardan en göze çarpanı metil grubunun hidroksilasyonu ile benzil alkol oluşumudur. Benzil alkol öncelikle benzoik aside okside olur ve sonra glisinle konjuge olarak hippürik asit oluşturur. Daha ikincil CYP ilişkili bir yolakta aromatik halkanın geçici epoksidasyonu ile orto- veya para-kresol oluşur. Kresoller çeşitli konjugasyon reaksiyonlarına girerek, başlıca ürün olarak sülfat ve glukuronidler oluştururlar. Glutatyon konjugasyonu da gerçekleşebilmekte ve S-benzilglutatyon ve S-benzilmerkapturik asit (benzil alkol konjugasyonu) veya S-p-toluolglutatyon ve S-p-toluolmerkapturik asit (epokside olmuş halka konjugasyonu) oluşturmaktadır. Toluene maruz kalmış bireylerle yapılmış idrar metabolit çalışmaları hippürik asitin ana metabolit olduğunu ortaya koymuştur (Andersen ve ark., 1983, Inoue ve ark., 1986, Angerer ve ark., 1998, Alvarez-Leite ve ark., 1999, Kongtip ve ark., 2001, Raikhlin-Eisenkraft ve ark., 2001, Pierce ve ark., 2002, Çok ve ark., 2003). İkincil idrar metabolitleri (azalan çokluk sıralamasına göre) benzoik asidin glukuronid konjugatı, orto- ve para-kresolün sülfat ve glukuronid konjugatları, s-benzilmerkapturik asit ve S-p-toluolmerkapturik asittir (Nakajima ve Wang, 1994, Tassaneeyakul ve ark., 1996, Nakajima ve ark., 1997, Dills ve ark., 1997, Angerer ve ark., 1998, Inoue ve ark., 2002, Inoue ve ark., 2004, Boatto ve ark., 2004, Fustinoni ve ark., 2005).

Benzen hem akciğerlerde değişmeden ekshale edilir hem de idrarda metabolit olarak atılmaktadır. Metabolizma öncelikle karaciğerde meydana gelmektedir. Benzen metabolizmasındaki ilk adım, sitokrom P-450'ye bağlı karışık fonksiyon oksidazlar tarafından bir epoksit olan benzen oksidin oluşmasıdır. Bu ara üründen ilerleyen en az iki metabolik yol vardır. Birincisi, epoksitin fenole hidroksilasyonunu içerir, bu daha sonra bir glukuronid veya sülfat konjugatı olarak salgılanır veya hidrokinon ve benzokinona dönüştürülür. Fenol, hidrokinon glukuronid ve hidrokinon sülfat bu enzimatik yol için biyomarker olarak yer alırlar. İkinci yolak ise bir NADPH aracılı işlemle benzen oksidin mukonik dialdehite dönüştürülmesini ve ayrıca mukonik aside dönüştürülmesini içerir. Katekol, bu yolak ile benzen glikolden üretilir ve bir glukuronid veya sülfat konjugatı olarak atılır (Henderson ve ark., 1989). Sıçan kemik

iliğinde, 500 ppm solunum yolu ile benzene maruz bırakıldıktan altı saat sonra, fenol başlangıçta ana metabolit ve bunu takip eden zamanlarda katekol ve hidrokinin meydana gelmiştir (Rickert., ve ark., 1979).

Ksilen de hippürik asitle aynı biyotransformasyon yolunu kullanarak insanlarda metilhippürik asit şeklinde atılır. Ksilen metabolizmasının %95'inden fazlası, metilbenzil alkole oksidasyon yolağı ve bunun devamında aldehit dehidrojenaz ile alkol dehidrojenaz yoluyla, sırasıyla metil benzaldehit ve metil benzoik (veya toluik) aside indirgeme içerir.

Stirenin insandaki absorbe edilen kısmının çoğunluğu (yaklaşık%90), vinil grubu tarafından stiren okside oksidasyon yoluyla karaciğerde metabolize edilir. Stiren oksit aktif metabolittir (Baselt ve Cravey, 1990). Ortaya çıkan ana metabolitler, mandelik asit (%60-80) ve fenilglisoksilik asittir (yaklaşık %30). Sadece çok küçük miktarlarda hippurik asit meydana gelmektedir.

1.5.3. Atılım

Toluenin gerek hayvanlarla yapılan çalışmalar gerek insanlarla yapılan çalışmalar vücuttaki toluenin çoğunluğunun idrarla, çoğunluğu metabolitler olmak kaydıyla atıldığını göstermektedir (EPA, 2005). Toluenin solunumla atılımı, maruziyet esnasında ve maruziyetten kısa bir süre sonrasında en fazla olup, süre geçtikçe hızla azalmaktadır (Benoit, 1985.). 34 mg/L maruziyet düzeyinde, maruziyetten 16 saat sonraki kan tolue seviyesi kandaki maksimum düzeyin %2'si olmuştur. İdrardaki hippürik asit seviyeleri tolue maruziyetinin bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Kısa ömrü nedeniyle, hippürik asit düzeyleri daha çok akut maruziyet durumlarında iyi bir

korelasyon sağlamaktadır (EPA, 2005). Kandaki toluen derişiminin toluen maruziyeti için en güvenilir göstergelerden biri olduğu rapor edilmiştir (Kawai, 1993).

47 ila 100 ppm'e iki-üç saatlik bir süre zarfında maruz kalınan bir insan çalışmasında, alınan benzenin %16,4 ila %41,6'sı maruziyetten sonraki beş ila yedi saat içinde akciğerler yoluyla elimine edildiği ve geri kalan benzenin sadece %0,07 ila 0,2'si değişmeden idrarla atıldığı bildirilmiştir (Srbova ve diğerleri, 1950). 1 ila 5 saat boyunca 63 ila 405 mg/m³ benzene maruz kalındıktan sonra, %51 ila 87 oranında 23 ila 50 saatlik bir süre içinde idrarda fenol olarak salınır benzen salınmaktadır (Hunter ve Blair, 1972). 340 ila 500 mg/kg benzen dozunun verilmesinden sonraki iki ila üç gün içinde tavşanlarda, benzenin nefes ile %43'ü değişmeden atıldığı, %23,5 idrarla fenol, %4,8 kuinol, %2,2 katekol ve bazı fenolik bileşiklerin de atıldığı bildirilmiştir (Parke ve Williams, 1953).

Solunum yoluyla alınan ksilenin sadece yaklaşık %5'i değişmeden ekshale edilir (Astrand ve diğerleri, 1978), yaklaşık %95'i idrar metabolitleri olarak atılır. Bugüne kadarki en önemli bileşik, ksilen'in ana metaboliti olan metilbenzoik (toluik) asidin glisin ile birleşimi ile oluşan metilhippürik (veya tolürik) asittir (Riihimaki ve ark., 1979). Emilen ksilenin %10 ila 20'si yağ dokusu (Riihimaki ve Savolainen, 1980) içine dağılmış ve yağ dokusunda yarı ömrü 58 saat olarak tespit edilmiştir (Engstrom ve Riihimaki, 1979). Sonuç olarak, yağ dokusunda bir miktar tekrarlanan günlük maruz kalmadan birkaç hafta sonra tekrar ortaya çıkabilmektedir. Yağ dokusunda ksilen, yüksek yağ/kan ayrılma katsayısı (yaklaşık 100) nedeniyle çok daha yavaş bir şekilde elimine edilir. Buna karşılık, çoğu dokudaki eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 0,5-1 saattir. 5 gün boyunca günde 6 saat 3,9 mmol/m³ civarında seviyelerde maruz kalma meydana geldiğinde bazı birikimler meydana gelir.

Stirenin ana metabolitleri, mandelik asit ve fenilglisoksilik asit, idrarla atılır. Hippürik asit ve 4-vinilfenol, stirenin daha küçük metabolitleridir. Bir dozun yaklaşık

%1 ila 2'si değişmeden ekshale edilir (Baselt RC, Cravey RH, 1990). Nefes stireni konsantrasyonları, sürekli maruz kalma sırasındaki karşılık gelen hava stiren konsantrasyonunun yaklaşık %25'ini temsil eder (Stewart ve ark., 1968).

1.6. Kromatografi

İlk olarak Mikhail Tsvett tarafından tanımlanan kromatografi, birbirine karışmayan biri hareketli diğeri ise sabit bir fazdan oluşan maddelerin saflaştırılması, ayrılması ve tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Ayrışması ya da tanımlanması istenilen maddenin hareket eden faz yardımı ile farklı hızlarda sabit fazın içinden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Kullanılan bu teknikte genel olarak 3 temel unsur yer almaktadır. Bunlar, katı ve katı bir desteğe bağlı sabit faz, gaz ya da sıvıdan meydana gelen mobil faz ve bu fazlar arasında oluşan etkileşim şekli ki bu da adsorbsiyon olarak anılabilir.

1.6.1. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisinde, buhar fazına geçen numune kapiler ya da dolgulu kolon içindeki sabit faz ile hareket eden bir gaz fazı arasında dağılma ve tutulma işlemleri ile birbirinden ayrılırlar.

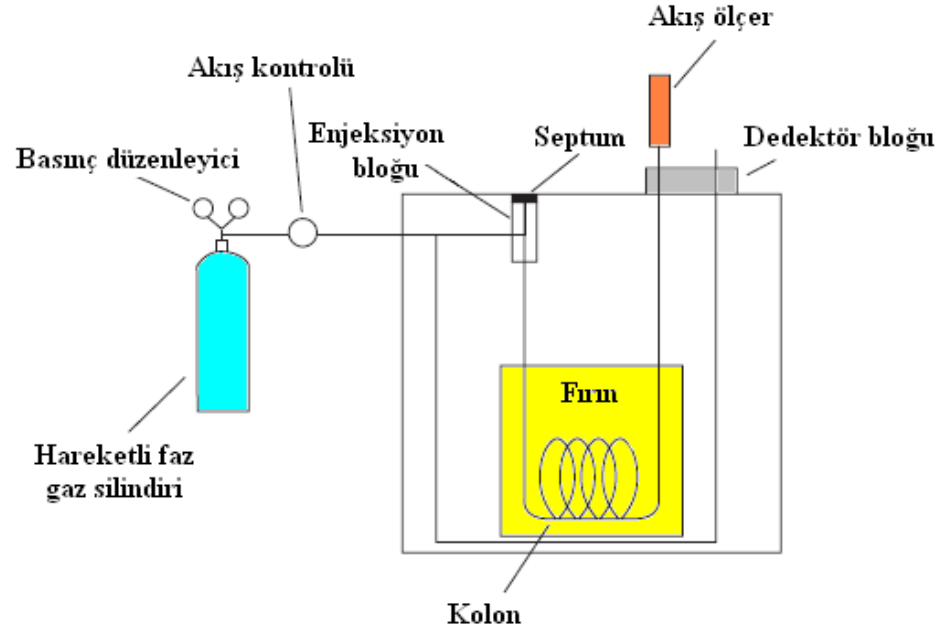
Bir bileşiğin kolonu geçmesi için geçen süre için kullanılan terim alıkonma zamanıdır ve enjeksiyondan pik maksimumuna kadar geçen süreyi ifade eder. Alıkonma zamanı taşıyıcı gaz hızı ve sabit faz derişiminin hareketli faz derişimine oranı olarak tanımlanan dağılma katsayısına (Kc) bağlıdır. Kc ne kadar büyükse

moleküllerin ortalama hızı o kadar küçüktür. Kolonda hiç tutunmadan ya da çok az tutunan maddenin alıkonma zamanı t_0 (hold-up) olarak adlandırılır. Bütün denge sabitleri gibi dağılım sabiti de sıcaklıkla değişir. Sıcaklık kontrol edilerek alıkonma zamanı kontrol edilir (Jennings ve ark., 1996).

Gaz kromatografisi kimyasal etmenlerde 2 yollu olarak değerlendirilmektedir. Genel olarak organik yapılı kimyasalların ayrışmasında iyi bir şekilde kullanılabilmekte fakat metalik ve karmaşık biyokimyasal yapılarda çok iyi değildir. Diğer bir kullanım alanı da hem kalitatif hem de kantitatif tayinlere geniş bir şekilde imkan tanınmasıdır.

Analitik işlemler bakımından gaz-sıvı kromatografisi belirtilen bazı kromatografik yöntemlere göre kısıtlı bir uygulama alanı bulduğundan, gaz-sıvı kromatografisi cihazının genel olarak NMR, kütle ve infrared gibi spektrometrelerle kombine edilerek kullanılması genelde tercih edilmektedir.

Geniş bir uygulama alanına sahip gaz kromatografisinde genellikle molekül ağırlığı 500-1500 dalton arası küçük kimyasallar için daha uygundur. Buhar basıncı düşük ve yüksek ısıda bozulabilen maddeler için ise uygun değildir. Örneğin; proteinler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip maddeler için genellikle kullanılamamaktadır. Şekerler, tuzlar, aminoasitler gibi oldukça iyonik ve polar bileşiklere de uygulanamaz.



Şekil 1.9. Gaz Kromatografisi Şeması

Taşıyıcı gazın fonksiyonu analizi yapılacak maddenin kolon boyunca sürüklenmesini sağlamaktır. En çok kullanılan taşıyıcı gazlar arasında hidrojen, helyum ve azot yer almaktadır. Azot helyumdan daha ucuz olmakla birlikte, helyum ile daha hızlı sonuçlar elde edilir.



Şekil 1.10. Gaz Kromatografisi-Headspace Sistemi

Sabit faz kapiler kolonun iç duvarında ya da dolgulu kolonlardaki katı destekleyici partiküllerin üzerinde ince bir film tabakası halinde bulunmaktadır. İdeal bir sabit faz düşük uçuculuk limitleri nedeni ile yüksek molekül ağırlıklı ve viskoz olmalıdır. En çok kullanılan sabit faz sıvıları polisiloksanlardır. Polietilen glikol fazlar ise polar sabit fazların en önemli serisidir. Çok kullanılmalarının nedeni, polar bileşikler için yüksek seçicilik sağlamalarıdır.

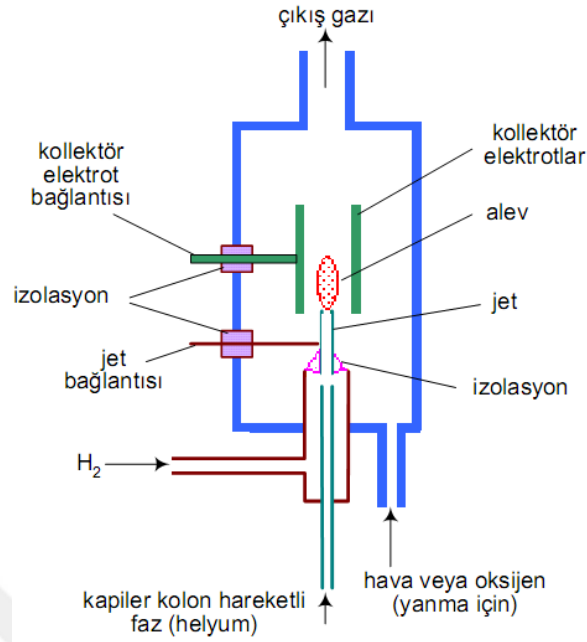
1.6.2. Dedektör

Dedeksiyon işlemini gerçekleştirecek kısım kolonu terkeden maddeyi hızlı bir şekilde algılayabilmelidir. Dedektör çok düşük konsantrasyonları tespit edebilecek nitelikte olmalıdır. Piklerin dedektörü geçtiği zaman 1 saniye ya da daha kısa bir süre olduğundan dedektör bu çok kısa sürede algı yeteneğini gösterebilmelidir.

Dedektör doğrusal ve kararlı tespitler yapabilmesi ve bunu uzun süre sabit olarak sağlaması gerekmektedir. Genellikle tek bir dedektör bu değerlerin hepsini bir arada sağlayamaz. Dedektörler iki sınıfta incelenebilir: Konsantrasyon hassasiyetli ve kütle hassasiyetli dedektörler. Konsantrasyon hassasiyetli dedektörün cevabı sadece analitin konsantrasyonuna bağlıdır. Kütle hassasiyetli dedektörler ise birim zamanda dedektöre giren analitin kütlesine karşılık bir cevap verir. Dedektörler seçici ve evrensel dedektörler olarak da sınıflandırılır. Evrensel olanlar hemen hemen bütün maddelere cevap verir (ör: termal iletkenlik dedektörü), seçici olanlar ise sadece belirli maddelere karşılık verir (ör: alev iyonlaştırıcı dedektör).

1.6.2.1. Alev İyonlaştırıcı Dedektör (FID-Flame Ionization Detector)

Hassasiyetinin yüksekliği açısından hidrojen alev dedektörleri sıkça kullanılmaktadır. Isıl iletkenlik dedektörlerine kıyasla daha karmaşık ve daha pahalıdır. Bunların doğrusal algılama aralığı daha geniştir. FID’de kolon çıkışında madde hidrojen ve hava akımında yakılır. C-H bağları iyonize olarak kolektör elektrota çarpar ve kütleyle oranlı bir sinyal üretirler. FID seçici bir dedektördür, C-H bağı içermeyen bileşenlere cevap vermez.



Şekil 1.11. FID (Alev İyonizasyon dedektör)

1.6.3. Numunenin Zenginleştirilmesinde Kullanılan Yöntemler

1.6.3.1. Atılma ve Tutulma (Purge and Trap)

Sulu örneklerdeki uçucu örneklerin analizini sağlayan bir tekniktir. Dinamik head space örnekleme tekniği ilk olarak Teranishi ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu teknikte analitlerin doğrudan termal uçucu hale getirilmesi ve matris bileşiklerinden ve SPE'den ayrılma avantajını sunmaktadır. Bu yöntemde uçucular bir adsorban ile tuzakta tutulur. Desorpsiyon fazında taşıyıcı gaz akışı olur. Tuzak hızla ısıtıldığında uçucular kromatografa sürüklenir.

1.6.3.2. Soğuk Tuzaklama

Gaz örneklerde bulunan eser miktarda maddeyi daha konsantre bir hale getirip analiz etmek için uygulanan bir tekniktir. Boş halde kapiler bir tüp kolonun önüne yerleştirilir. Bu tüpün bir bölümü sıvı azot ile -200°C ye kadar özel donanım ile soğutulur. Örnekteki eser miktardaki maddeler bu soğuk bölgede tutulur. Yeterli madde miktarı tutulduğunda örnek gaz akışı durdurulur ve hızlı bir şekilde ısıtma sağlanır. Buharların taşıyıcı gaz tarafından kolona sürüklenmesi sağlanır.

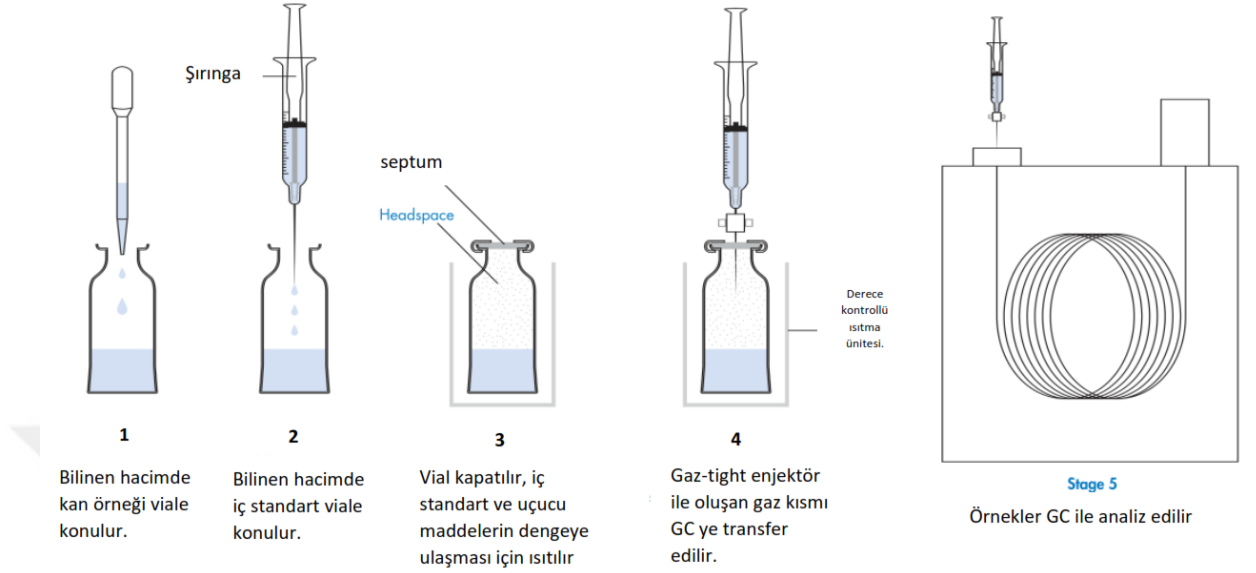
1.6.3.3. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME)

SPE (katı faz ekstraksiyon) nin bir başka özel versiyonu da katı faz mikroekstraksiyondur (SPME). İşlem içinden absorpsiyon özelliği yüksek bir fiber uç olan bir iğne ile gerçekleştirilir. İğnedeki fiber örnek bileşenlerini absorblayan sabit faz ile kaplıdır. Şırınga şişeden çıkarıldıktan sonra elyaf iğnedeki yerine geri döner. Cihaza enjeksiyon gerçekleştirilir. Elyaf yüksek sıcaklığa maruz kalınca örnek bileşenleri serbest kalır ve kolona sürüklenirler.

1.6.3.4. Headspace

Headspace tekniği sıvı ya da katı numuneleri çevreleyen havada bulunan molekülleri analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile ortamın termodinamik koşullarında sıvı veya katı fazıyla denge halinde olan gaz fazındaki uçucu moleküller gaz kromatografisi yöntemiyle birlikte analiz edilir. Bu şartlar

altında Headspace gazındaki uçucu bileşenlerin miktarı örnekteki konsantrasyonlarına karşılık gelir.



Şekil 1.12. Headspace tekniği

Biyolojik sıvılarda toluen, benzen, ksilen ve stirenin aynı anda belirlenmesinin adli toksikoloji açısından önemi şu başlıklar altında toplanabilir.

- İşyeri güvenliği ve çevre nedeniyle maruziyetin belirlenmesi
- Suistimal amacı ile kullanılan maddelerin belirlenmesi
- Kaza ya da kasıtlı madde kullanım sonucu oluşabilecek zehirlenmelerin kolay tespiti

Sonuç olarak bu maddelerin aynı anda ve hızlı bir şekilde headspace yöntemi ile ölçülüp valide edilmesi; klinik basamakta zehirlenme unsuruna karşı hızlı ve doğru cevap verebilmeyi sağlayacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Anilin	Sigma-Aldrich (Missouri, ABD)
Toluen	Merck (Darmstadt, Germany)
Benzen	Sigma-Aldrich (Missouri, ABD)
Ksilen	Merck (Darmstadt, Germany)
Stiren	Merck (Darmstadt, Germany)
Metanol	Merck (Darmstadt, Germany)
Sitrik asit	Merck (Darmstadt, Germany)
Sodyum Klorür	Merck (Darmstadt, Germany)
Sodyum Sitrat	Merck (Darmstadt, Germany)

2.1.2. Cihazlar ve Araçlar

Gaz Kromatografisi	Schimadzu 5010 sistemi
Oto Örnekleyici	Combi Pal Oto Headspace Sampler
Gc Kolonu	J&W HP-Innowax, 20 m, 0.18 mm, 0.18 µm
Hassas Terazı	Mettler Toledo Analytical Balance MS104TS/00
Vortex	WN-2800 Weightlab Instruments
Pipetler	Brand Transferpipette 10µL-1000µL
Cam Malzemeler	

2.2. Yöntem

2.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.1.1. Numunelerin Hazırlanmasında Kullanılan Plazma

İçinde herhangi bir ilaç etken maddesinin olmadığı bilinen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Toksikoloji laboratuvarında bulunan atık kanlar numune olarak kullanılmıştır. Katma işlemi yapılmadan önce kanlar karıştırılmıştır. Deney yapılacağı süreye kadar -20⁰C'de numuneler muhafaza edilmiştir.

2.2.1.2. İç Standart

10 mg/mL çözelti olacak şekilde yüksek saflıkta anilin metanolde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır.

2.2.1.3. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Yüksek saflıkta tolüenden 1153 µL (1 g) alınarak metanolle 100mL'ye tamamlandı. 10 mg/mL 0 stok çözeltisi hazırlandı.

0 stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 mg/mL'lik A stoğu hazırlandı.

A stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 100 µg/mL'lik B stoğu hazırlandı.

B stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 10 µg/mL'lik C stoğu hazırlandı.

C stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 µg/mL'lik D stoğu hazırlandı.

Yüksek saflıkta benzenden 1144 µL (1 g) alınarak metanolle 100 mL'ye tamamlandı. 10 mg/mL 0 stok çözeltisi hazırlandı.

0 stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 mg/mL'lik A₁ stoğu hazırlandı.

A₁ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 100 µg/mL'lik B₁ stoğu hazırlandı.

B₁ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 10 µg/mL'lik C₁ stoğu hazırlandı.

C₁ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 µg/mL'lik D₁ stoğu hazırlandı.

Yüksek saflıkta stirenden 1107 µL (1 g) alınarak metanolle 100 mL'ye tamamlandı. 10 mg/mL 0 stok çözeltisi hazırlandı.

0 stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 mg/mL'lik A₂ stoğu hazırlandı.

A₂ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 100 µg/mL'lik B₂ stoğu hazırlandı.

B₂ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 10 µg/mL'lik C₂ stoğu hazırlandı.

C₂ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 µg/mL'lik D₂ stoğu hazırlandı.

Yüksek saflıkta ksilenden 1136 µL (1 g) alınarak metanolle 100 mL'ye tamamlandı. 10 mg/mL 0 stok çözeltisi hazırlandı.

0 stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 mg/mL'lik A₃ stoğu hazırlandı.

A₃ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 100 µg/mL'lik B₃ stoğu hazırlandı.

B₃ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 10 µg/mL'lik C₃ stoğu hazırlandı.

C₃ stoğundan 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlandı. 1 µg/mL'lik D₃ stoğu hazırlandı.

Kalibrasyon ve test numuneleri hazırlanmasında 3 mL plazmaya belirtilen miktarlarda uygun stoklardan ilave edilmiştir. Aynı işlemler toluen, ksilen, stiren ve benzen maddeleri için tekrarlanmıştır.

2.2.2. Gaz Kromatografisi Yöntemi

2.2.2.1. Gaz Kromatografisi

Kapiler kolon kullanılarak Headspace ekstraksiyonu ile toluen, ksilen, stiren ve benzen düzeylerinin ölçümü yapıldı.

Çizelge 2.1: Headspace ile toluen, ksilen, stiren ve benzen ölçümü ve enjeksiyon programı

Headspace Oto Örnekleyici	
Enjektör sıcaklığı (°C)	70
Enjektör portu sıcaklığı (°C)	170
Ajitatör sıcaklığı (°C)	70
Ajitatör hızı (rpm)	500
Enjeksiyon hızı(mL/s)	0,1
Gaz Kromatografisi	
Fırın programı	40 °C→ 5 °C/dak→ 70 °C (5 dak)→ 20 °C/dak→ 280 °C
Enjeksiyon türü	Splitless
Gaz akışı	5 mL/dak
Gaz türü	Helyum (mobil faz)
Enjeksiyon miktarı	1 mL
Kolon tipi	J&W HP-Innowax, 20m, 0,18 mm, 0,18 µm
FID sıcaklığı (°C)	290 °C

2.2.3. Verilerin İşlenmesi ve Analiz

Tüm kromatografilere ait veriler “GCsolution Ver. 2 Workstation Software” programı ile incelenmiştir.

2.2.4. Metod Geliştirme Çalışmaları

2.2.4.1. Headspace Şartlarının Optimizasyonu

Statik Headspace yönteminin hassasiyeti içindeki uçucu organik bileşik konsantrasyonu ile sınırlıdır. Bu konsantrasyon, numunedeki başlangıç konsantrasyonuna, sıvı faz ve gaz fazı arasındaki faz oranına ve su/hava dağıtım sabitine bağlıdır. Headspacedeki analitin (C_g) konsantrasyonu, analitin partiyon katsayısına (K), başlangıçtaki analit konsantrasyonuna (C_o) ve gaz fazının sıvı fazına kadar olan gaz fazının hacim oranına (β) bağlıdır. Bunu şu denklemle tanımlamak mümkündür.

$$C_g = \frac{C_o}{K + \beta}$$

K sıcaklığa bağımlı olduğundan, dengeye ulaşmak için gereken sıcaklık GC-Headspace denge zamanını etkilemektedir.

2.2.4.2. Denge Zamanının Optimizasyonu

Ekstraksiyon süresinin etkisini belirlemek için GC-HS programı 1 ila 15 dakika arasında yapıldı. Denge süresinin etkisini incelemek için 1-5 dak arası farklı ısı değerleri uygulanarak her madde için alanlar hesaplandı.

2.2.4.3. Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi

Ekstraksiyon esnasında, numunenin ısıtılarak çözeltinin numune çözeltisinden gaz fazına buharlaşması gereklidir. Diğer yandan aşırı artan sıcaklık Headspace hacmini ve analitin örnek partiyon katsayısında artışa sebep olabilmektedir. Bu sebepten dolayı optimal ısı ayarlaması maddelerin buharlaşma dereceleri göz önüne alınarak yapılmıştır.

2.2.4.4. Tuz Bileşeni Etkisi

Uçucu organik bileşenlerin konsantrasyonu çözünme özelliklerine (buhar basıncı ve suda çözünürlük, sıcaklık, basınç, pH ve tuz konsantrasyonu) bağlıdır. Sulu numuneye tuz eklenmesi genellikle analitin ekstraksiyonunu iyileştirmek için yapılmaktadır. İlave sonrasında iyonik kuvvetteki artış, sulu çözeltideki hidrofobik analitlerin çözünürlüğünde bir azalma sağlayarak, analitlerin daha fazla headspace ve ekstraksiyon fazına geçişini sağlar. Bu amaçla tuz etkisi, farklı örnek konsantrasyonlarında pik alanlarındaki değişkenlik izlenerek incelenmiştir.

2.2.5. Analitik Metod Validasyonu

2.2.5.1. Doğrusallık

5 mL çözelti hazırlanarak 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 500 ng/mL derişimlerde üçer adet numune hazırlanmış ve enjeksiyonları otomatik örnekleyici ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

2.2.5.2. Tekrarlanabilirlik

Stok çözeltilerden 20, 50 ve 100 ng/mL derişimlerdeki beşer adet numune hazırlanarak enjeksiyon yapılmıştır. Herbir derişimdeki toluen, benzen, ksilen ve stiren pik alanlarının ortalamaları ve bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır.

2.2.5.3. Geri kazanım

Numune katma yöntemi ile 3 mL plazma numunelerine 50 ve 100 ng/mL derişimlerde üç numune hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrisine göre miktarları tespit edilmiştir. Buna göre geri kazanım ve %95 güven aralığında geri kazanım aralığı hesaplanmıştır.

2.2.5.4. Hassasiyet

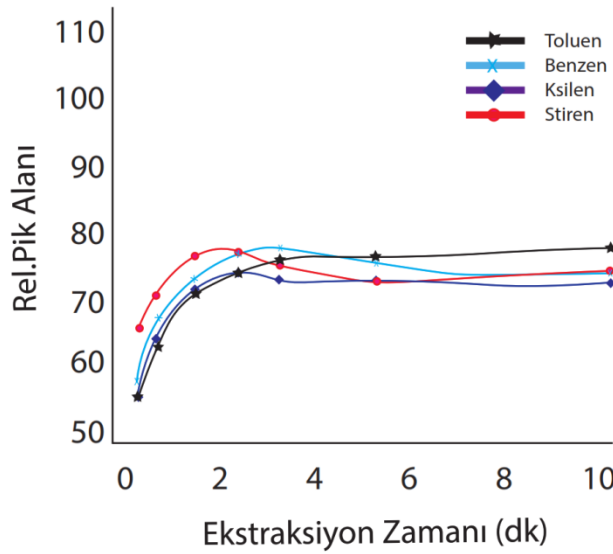
Çalışmada “Eurachem 2014 analitik metotların amaca uygunluğu “kılavuzu esasından analizler yapılmıştır. Çalışmada 10 ng/mL derişim seçilerek 10 aynı numune hazırlanarak enjeksiyonlar yapılmıştır. Sonuçların 3,3 katı LOD değeri ve 10 katı da LOQ olarak hesaplamalar yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Metod Geliştirme Safhasındaki Bulgular

3.1.1. Denge Zamanının Optimizasyonu

Her maddeye ait relatif pik alanlarının ekstraksiyon zamanlarına göre bulguları çizelgede verilmiştir. Her maddeye ait farklı ısı programı yapılarak 7'şer adet enjeksiyon yapılmıştır. 4 dakikadan sonra analitlerin dengeye ulaştığı görülmektedir.

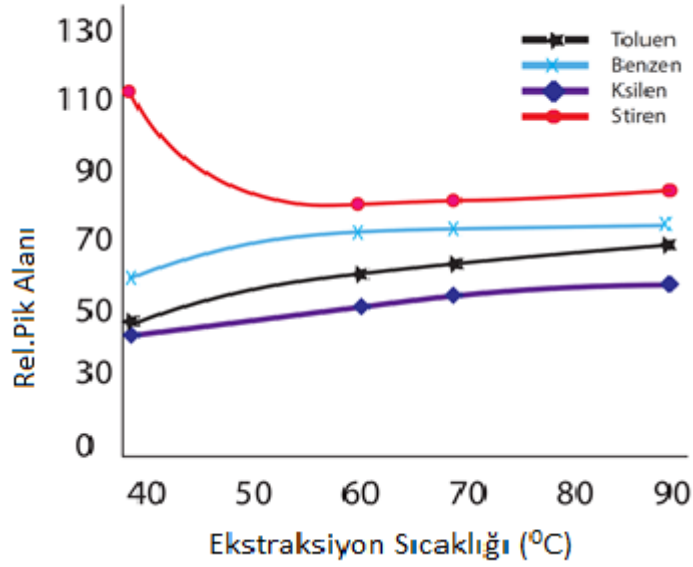


Şekil 3.1. Ekstraksiyon süresinin bağıl pik alanı üzerindeki etkisi.

3.1.2. Ekstraksiyon Sıcaklığının Etkisi

Optimum ekstraksiyon sıcaklığı 5 dakika boyunca numuneleri 40°C-70°C arası sıcaklıkta enjeksiyonlar yapılarak incelenmiştir. Isı ile birlikte ekstraksiyonun arttığı

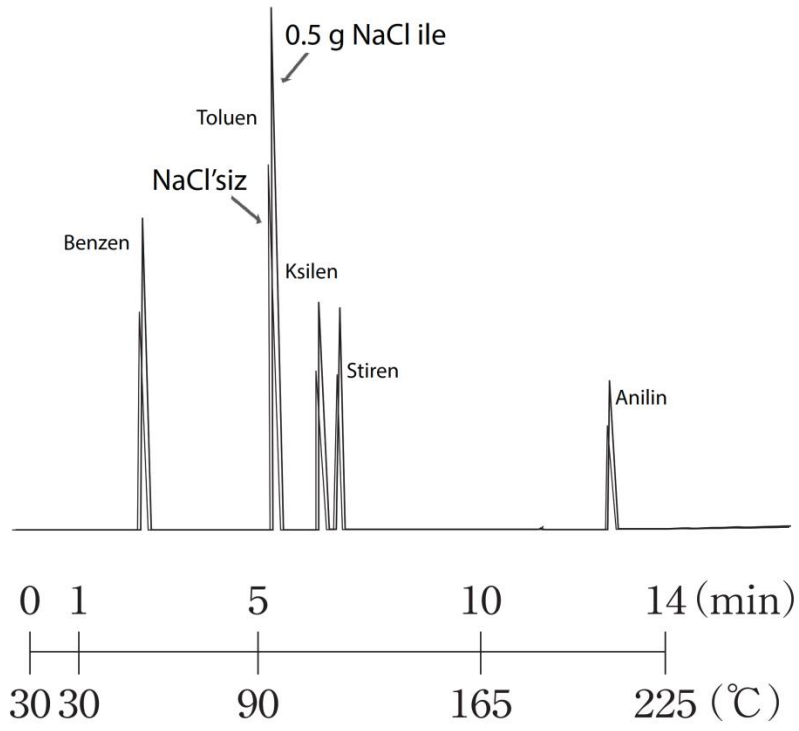
görülmüştür. Su buharı basıncını düşük tutmak için ekstraksiyon sıcaklığı 60°C başlangıç değeri olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Ekstraksiyon sıcaklığının bağıl pik alanı üzerindeki etkisi.

3.1.3. Tuz Bileşeni Etkisi

Konsantrasyonu 10 ng/mL olan toluen, benzen, ksilen ve stiren içeren çözelti ilk olarak enjekte edilmiştir. Daha sonra 0,5 NaCl ilave edilerek yapılan enjeksiyona ait pikler şekilde verilmiştir.

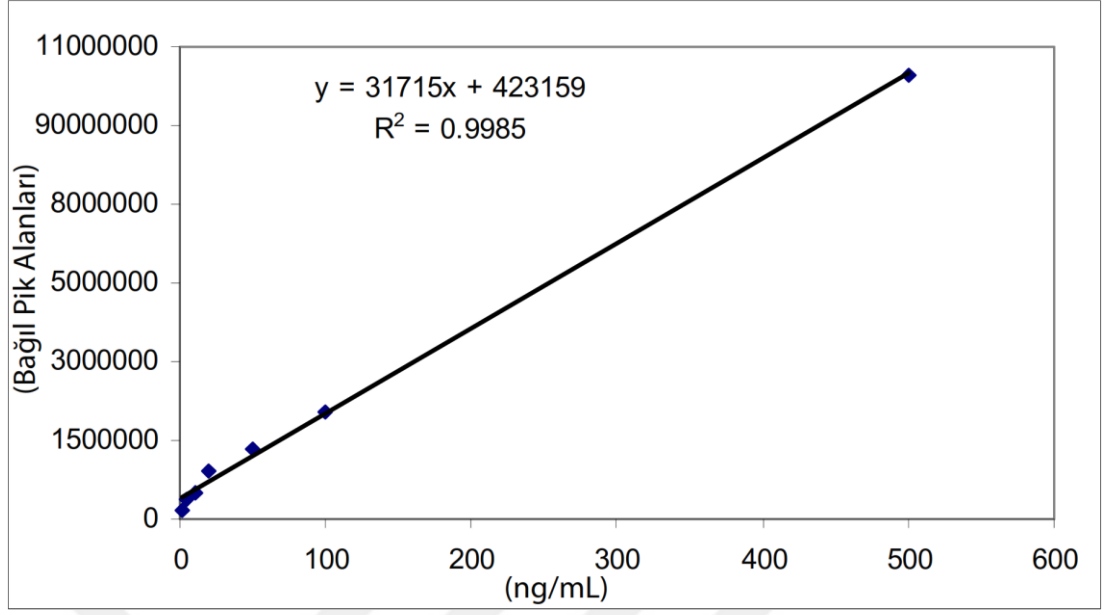


Şekil 3.3. NaCl ilavesinin pik alanlarına etkisi

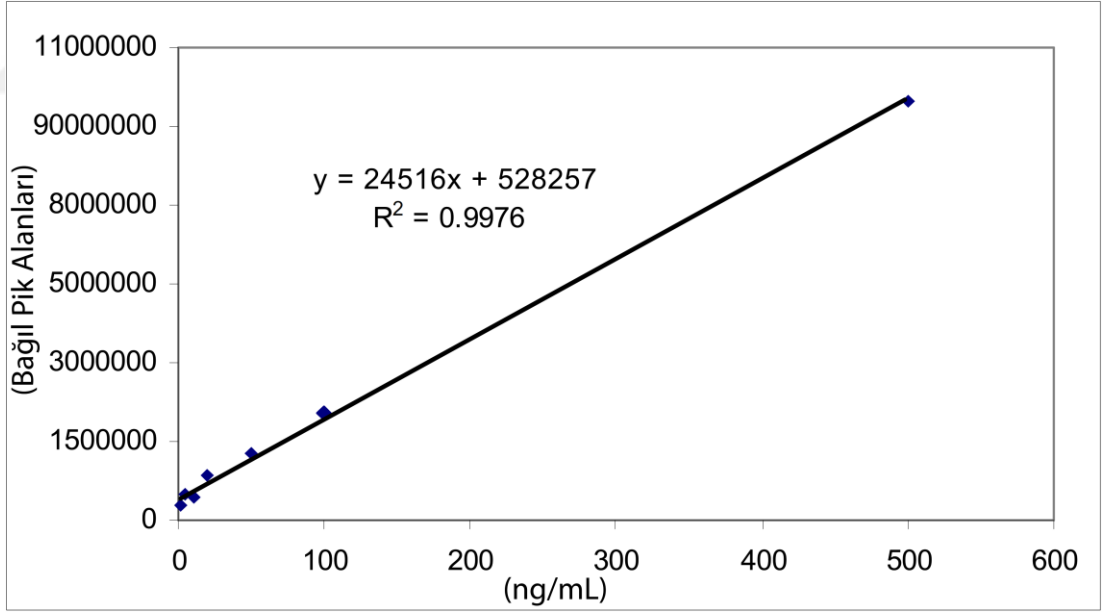
3.2. Metot Validasyonu

3.2.1. Doğrusallık

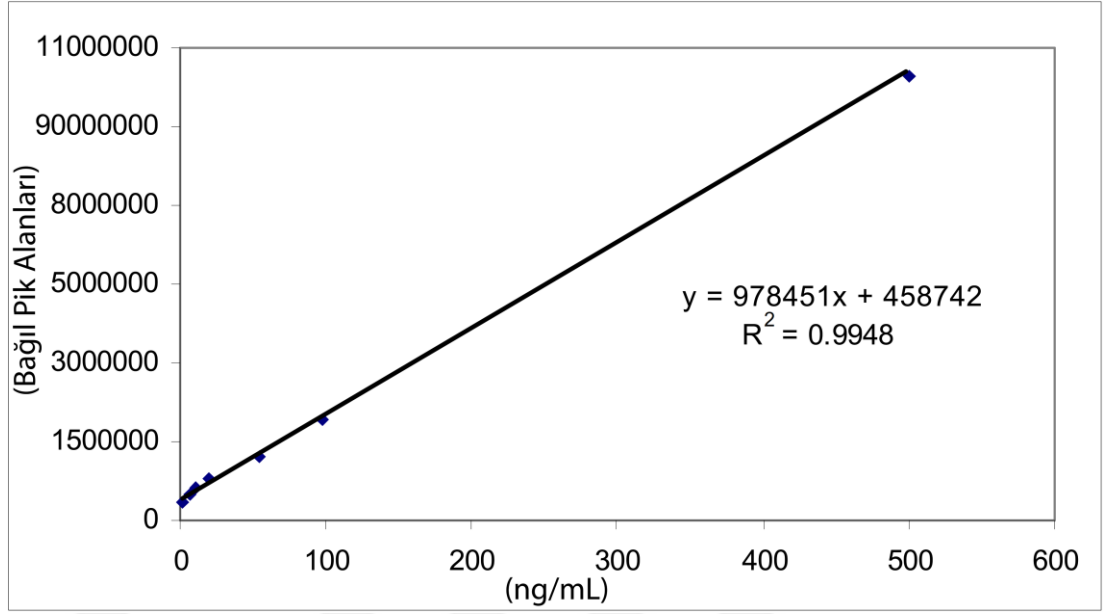
Ölçümlerin doğrusallığını değerlendirmek üzere standart katma yöntemiyle hazırlanmış 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 500 ng/mL konsantrasyonlarda her bir kimyasal için (toluen, benzen stiren ve ksilen) üçer adet enjeksiyon yapılmış, sonuçlar grafikte verilmiştir.



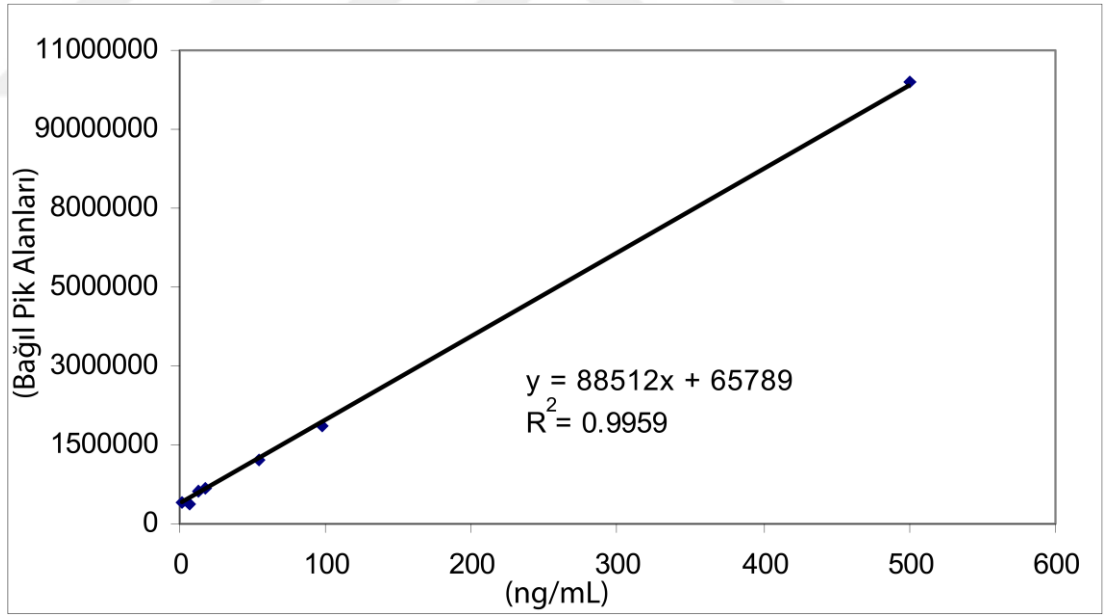
Şekil 3.4. Toluene ait doğrusallık grafiği



Şekil 3.5. Benzene ait doğrusallık grafiği



Şekil 3.6. Ksilene ait doğrusallık grafiği



Şekil 3.7. Stirene ait doğrusallık grafiği

Sırasıyla toluen, benzen, ksilen ve stirene ait 1-500 ng/mL konsantrasyon arasındaki korelasyon katsayısı 0,9985, 0,9976, 0,9948, 0,9959 olarak bulunmuştur. Bu da metodun doğrusallığının çalışma için uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

3.2.2. Tekrarlanabilirlik

Her madde için ayrı ayrı 20, 100 ve 500 ng/mL’lik derişimLer hazırlanmış 5 tekrarlı analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Toluene ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	20 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
	294 378	1 471 890	7 359 452
	250 458	1 348 524	7 632 859
	248 965	1 455 256	7 385 784
	255 125	1 480 589	7 499 458
	275 845	1 378 985	7 501 485
Ortalama	264 954	1 427 049	7 475 808
St.sapma	19,665	59,475	109,003
%BSS	7,4219	4,1677	1,4581

Çizelge 3.2. Benzene ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	20 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
	334 378	1 671 890	8 359 452
	302 587	1 525 698	8 254 987
	299 589	1 568 954	8 458 960
	322 547	1 589 652	8 364 895
	328 654	1 490 654	8 265 895
Ortalama	317 551	1 569 370	8 340 838
St.sapma	15,636	68,966	83,464
% BSS	4,9239	4,3945	1,0007

Çizelge 3.3. Stirene ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	20 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
	250 346	1 251 731	6 258 654
	245 654	1 205 874	6 159 854
	240 258	1 210 458	6 058 965
	225 845	1 200 547	6 150 478
	236 895	1 235 547	6 254 874
Ortalama	239 800	1 220 831	6 176 565
St.sapma	9,339	21,875	83,157
% BSS	3,8946	1,7918	1,3463

Çizelge 3.4. Ksilene ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	20 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
	414 275	2 071 375	10 356 874
	400 548	1 998 545	10 125 896
	399 586	2 154 896	10 026 859
	410 584	2 120 554	10 856 954
	415 258	1 998 547	10 568 452
Ortalama	408 050	2 068 783	10 387 007
St.sapma	7,501	70,656	336,365
% BSS	1,8382	3,4153	3,2383

Tekrarlanabilirlik testlerinde bağıl standart sapma değerleri beklendiği gibi azalan konsantrasyonla birlikte yükselmiştir ve 20ng/mL derişimde dahi oldukça düşük bağıl standart sapma değerleri elde edilmiştir.

3.2.3. Geri kazanım

Plazmaya katma yöntemi ile 50 ve 100 ng/mL derişimlerde üç adet numune hazırlanmıştır. Her maddeye ait %95 güven aralığında hesaplanan kazanım yüzdeleri çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.5. Toluene ait geri kazanım çalışması

Katım miktarı (ng/mL)	Bulunan Değer	% Kazanım
50	48,62	97,24
50	51,52	103,04
50	47,18	94,36
	Ortalama	98,21
	St.sapma	4,42
	% BSS	4,50
	%95 GA	98,21±8,66
100	101,22	101,22
100	99,58	99,58
100	97,69	97,69
	Ortalama	99,50
	St.sapma	1,77
	% BSS	1,77
	%95 GA	99,50±3,46

Çizelge 3.6. Benzene ait geri kazanım çalışması

Katım miktarı (ng/mL)	Bulunan Değer	% Kazanım
50	52,62	105,24
50	51,55	103,10
50	53,65	107,30
	Ortalama	105,21
	St.sapma	2,10
	% BSS	1,99
	%95 GA	105,21±4,11
100	103,22	103,22
100	102,36	102,36
100	99,65	99,65
	Ortalama	101,74
	St.sapma	1,86
	% BSS	1,82
	%95 GA	101,74±3,65

Çizelge 3.7. Ksilene ait geri kazanım çalışması

Katım miktarı (ng/mL)	Bulunan Değer	% Kazanım
50	46,42	92,84
50	45,55	91,10
50	42,63	85,26
	Ortalama	89,73
	St.sapma	3,97
	% BSS	4,42
	%95 GA	89,73±7,78
100	99,54	99,54
100	101,45	101,45
100	97,85	97,85
	Ortalama	99,61
	St.sapma	1,80
	% BSS	1,80
	%95 GA	99,61±3,53

Çizelge 3.8. Stirene ait geri kazanım çalışması

Katım miktarı (ng/mL)	Bulunan Değer	% Kazanım
50	49,93	99,86
50	51,51	103,02
50	53,95	107,90
	Ortalama	103,59
	St.sapma	4,05
	% BSS	3,90
	%95 GA	103,59±7,93
100	103,25	103,25
100	99,98	99,98
100	100,05	100,05
	Ortalama	101,09
	St.sapma	1,87
	% BSS	1,84
	%95 GA	101,09±3,66

3.2.4. Hassasiyet

Her maddeye ait 10 ng/mL konsantrasyonda 10 ayrı numune hazırlanarak yapılan enjeksiyonların sonuçları ve sonuçların standart sapmasının 3,3 katı alınarak hesaplanan LOD ve 10 katı alınarak hesaplanan LOQ değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.9. Toluene ait LOD ve LOQ değerleri

	Alan	Miktar (ng/mL)
	125 856	8,958
	125 478	8,931
	123 859	8,816
	126 598	9,011
	120 741	8,594
	128 966	9,179
	122 654	8,730
	123 569	8,795
	125 458	8,930
	126 852	9,029
Ortalama	125 003	8,89729
St.Sapma	2354,1	0,16756
	LOD	0,55
	LOQ	1,68

Çizelge 3.10. Benzene ait LOD ve LOQ değerleri

	Alan	Miktar (ng/mL)
	167 654	8,958
	165 874	8,863
	163 258	8,723
	168 654	9,011
	165 748	8,856
	168 258	8,990
	167 774	8,964
	162 587	8,687
	166 985	8,922
	165 429	8,839
Ortalama	166 222	8,88149
St.Sapma	2056,82	0,1099
	LOD	0,36
	LOQ	1,10

Çizelge 3.11. Ksilene ait LOD ve LOQ değerleri

	Alan	Miktar (ng/mL)
	200 125	9,565
	199 452	9,533
	198 859	9,504
	202 548	9,681
	195 874	9,362
	201 458	9,629
	205 859	9,839
	197 254	9,428
	201 254	9,619
	199 547	9,537
Ortalama	200 223	9,56968
St.Sapma	2796,99	0,13368
	LOD	0,44
	LOQ	1,34

Çizelge 3.12. Stirene ait LOD ve LOQ değerleri

	Alan	Miktar (ng/mL)
	125 458	9,565
	124 587	9,499
	123 598	9,423
	122 547	9,343
	125 895	9,598
	124 841	9,518
	122 547	9,343
	123 555	9,420
	124 859	9,519
	126 895	9,675
Ortalama	124 478	9,4903
St.Sapma	1421,38	0,10837
	LOD	0,36
	LOQ	1,08

4. TARTIşMA

Toluen, benzen, ksilen ve stiren kimyasal ürün malzemeleri, yapıştırıcılar ve boyaların çözücöleri ve bileşenleri için yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu nedenle bazen kimyasal ürün imalat fabrikalarında gazlarını solumakla zehirlenme olaylarına neden olmaktadır. Benzen, stiren, toluen ve ksilene birlikte maruz kalma, çeşitli endüstriyel ortamLarda sık sık çalışan kişilerde olumsuz sağlık etkisine yol açacak şekilde meydana gelir. Bu nedenle, mesleki hastalıkların önlenmesi için maruz kalma seviyelerinin biyolojik izleme yoluyla tahmin edilmesi gereklidir ve belli uygulamalar önerilmektedir.

Tiner gibi toluen içeren solventlerin suistimali, özellikle gençler için sosyal bir sorundur. Toluen, benzen, ksilen ve stiren gibi uçucu bileşenlerin suistimal niteliğinde ya da inhale edilerek kronik maruziyetlerinin biyolojik materyelde tespiti önem arz etmektedir.

Maruziyet sonucu toluen, benzen, ksilen ve stiren kanda tespit edilebilir. Özellikle tolueinin kandaki konsantrasyonu maruziyetin iyi bir göstergesidir. Toluen ve diğer kimyasalların aynı zamanda idrar konsantrasyonlarının ölçümü de iyi bir biyomarker olarak bildirilmiştir (Ghittori ve ark., 1993). Toluen maruziyeti sonlandığında yarılanma ömrü 2-3 saat arasında olduğu bildirilmiştir (Lauwerys, 1983). Bu sebeple istenilen maddeye ait analizlerin erken sürede yapılması önemLidir.

Toluen, benzen, ksilen ve stiren analizleri için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunların içinde etkin ve hızlı olanlar headspace, katı faz mikro ekstraksiyon, purge and trap gibi yöntemlerdir. Bu yöntemler ile zenginleştirilen numuneler kromatografik metod olan gaz kromatografisi ile kombine edilerek düşük ve yüksek

konsantrasyonlarda analizler istenilen biyolojik materyalde mümkün olmaktadır. Ayrıca gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi ile bu maddelerin ve metabolitlerinin simultane tespiti de bildirilmiştir (Sandor ve ark., 2002). GC-MS gerek hız gerekse maliyet yönünden metabolitlerin ve maddelerin kendilerinin tek seferde analizine imkân vermektedir. Metodların içerisinde purge and trap sisteminde görülen basınç değişimlerinden dolayı piklerin geliş zamanlarında birtakım kaymalar tespit edilmiştir (Brcic ve Skender, 2003). Tespit seviyelerinin düşüklüğü, maliyet ve hız açısından FID gibi GC ile kombine sistemler analizlerde tercih edilirken, GC-MS sistemleri de tercih edilebilmektedir (Hattori ve ark., 1998).

Headspace yönteminde numunenin hazırlanması, numunenin alımı, aktarımı ve cihaz enjeksiyonları önem taşımaktadır. Bunun için çeşitli farklı sistemler ve modifiye edilmiş yöntemler bulunmaktadır (Akgür ve ark., 2001). Kullanılan tekniklerden kaynaklanarak toluen, benzen, ksilen ve stiren analizlerinin duyarlılıkları sırasıyla 0,015-200 ng/mL, 0,94-38 µg/mL, 6-110 µg/mL, 0,01-1,0 µg/mL aralıklarında değişim göstermektedir. Soğuk tuzaklama sistemi kullanılarak GC-FID sistemi ile 1 ng/mL LOD seviyeleri de toluen için mümkün olmuştur (Lee ve ark., 1998). Aynı zamanda yüksek bir hacim olan 5 mL enjeksiyon miktarına da ulaşabilmişlerdir. Her ne kadar yüksek hacim enjeksiyonları başarılı görülsede, bir transfer hattı olduğundan dolayı genel olarak bir gaz kaçıışı ya da soğurma olabilmektedir. Bu nedenle de metod geliştirirken kaçış etkisine bakmak zorunlu olabilmektedir.

İdrar ve kan numunesi analizlerinde bazı araştırmacılar sitrat tamponu gibi birtakım tamponlama yöntemi kullanmışlardır. Tampon çözelti eklemenin daha düşük standart sapmaya neden olduğu ancak beklenenin aksine daha düşük ortalama pik alanları verdiği bulunmuştur. Bu sebepten dolayı Fustinoni ve arkadaşlarının (Fustinoni ve ark. 2000) kullandığı üzere kurutulmuş NaCl'nin pik alanlarının ekstraksiyon verimini artırması düşüncesi ile numunelere ilave edilmiştir. NaCl ilavesinin beklenildiği üzere tüm kimyasallarda bir pik alanı artışına neden olduğu tespit edilmiştir.

Metod geliştirme safhalarında NaCl ilavesi ile herhangi bir taşıma (*carryover*) olup olmadığına özellikle bakılmamıştır. Taşımanın kullanılan cihazların konfigürasyonundan kaynaklandığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Taşıma sorunu Headspace transfer hattından veya numune sarmalı sıcaklığının yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır. Kullanılan cihazlarda ve benzer tüm tasarımlarda transfer hattı sıcaklık kayıplarına karşı izole edilmiştir ancak girilen değeri tutturmakta çok başarılı olamayabilmektedir. Bizim kullandığımız sistemde kapalı bir transfer hattı bulunmadığından ve enjektör kendi içinde ısıtılarak sürekli hareket halinde olduğundan dolayı sistemde herhangi bir kaçak söz konusu olmamaktadır. Bu yüzden taşıma parametresi göz ardı edilmiştir.

Bir sonraki adımda bağıl pik alanlarının ekstraksiyon zamanlarına karşı bulguları incelenmiştir. Her maddeye ait farklı ısı programı yapılarak 7'şer adet enjeksiyon yapılmış ve 4 dakikadan sonra analitlerin dengeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bununla beraber 5 dakikadan sonra analitler için pik alanlarındaki artışın anlamlı olmadığı düşünülebilir, bu yüzden ekstraksiyon süresi 4 dakika olarak hedeflenmiştir.

Ekstraksiyon sırasında, numunenin ısıtılarak çözeltinin numune çözeltisinden gaz fazına buharlaşması gereklidir. Öte yandan, ekstraksiyon sıcaklığının artırılması, Headspace'teki ve analitin partisyon katsayısını artırabilir. Optimum ekstraksiyon sıcaklığı, numuneyi 5 dakika süreyle 40 ila 70°C aralığındaki sıcaklıklara maruz bırakarak araştırılmıştır. Su buharını azaltmak için de optimum ekstraksiyon sıcaklığı olarak 60°C tercih edilmiştir.

Ekstraksiyon süreleri, inkübasyon zamanı ve NaCl ilavesi üzerinden geliştirilen analiz metodun doğrusallığı test edilmiş ve toluen, benzen, ksilen, stiren için R^2 değerleri sırası ile 0,9985, 0,9976, 0,9948, 0,9959 bulunmuştur.

Çalışmanın devamı olarak bu kimyasalları kullanıldığı şüphelenilen gönüllülerden alınacak numuneler ile headspace hacim azaltma ve SPME gibi yöntemlerin ilavesi ile analizlerin yapılması planlanmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Toluen, benzen, ksilen ve stirenin birarada maruziyetinin ve düzeyinin belirlenebilmesi için kan numunelerinde analiz yöntemi, analize etki eden faktörlerin çoğu için optimizasyon çalışmaları yapılarak, geçerliliği sınanmıştır.

Kanda yapılan çalışmalarda GC-HS ile en düşük konsantrasyon, tayin edilebilecek limit değerleri, kesinlik ve tekrarlanabilirlik amaca uygun bir şekilde yapılmıştır.

1-500 ng/mL arasında çizilen kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayıları toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 0,9985, 0,9976, 0,9948, 0,9959 olarak tespit edilmiştir. Her madde için farklı derişimlerde yapılan geri kazanım çalışmaları beklenen aralıkta (%80-120) tespit edilmiştir. Metodun LOD değerleri toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 0,55 ng/mL, 0,36 ng/mL, 0,44 ng/mL, 0,36 ng/mL, LOQ değerleri ise toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 1,68 ng/mL, 1,10 ng/mL, 1,34 ng/mL, 1,08 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

ÖZET

Modifiye Gaz Kromatografisi-Headspace Yöntemi ile İnsan Plazmasında Toluen,Benzen, Ksilen ve Stirenin Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Çalışmamızın amacı mesleki maruziyette, kötüye kullanımda ve zehirlenme durumlarında toluen, benzen, ksilen ve stirenin kan düzeylerinin hızlı, hassas ve doğru tespitinin GC-HS yöntemi ile geliştirilmesi ve geçerliliğinin ortaya konmasıdır.

Toluen, benzen, ksilen ve stirenin birarada maruziyetinin ve düzeyinin belirlenebilmesi için kan numunelerinde Gaz Kromatografisi- Head Space analiz yöntemi kullanıldı. Denge zamanı optimizasyonu, ekstraksiyon ısısının etkisi ve tuz bileşeni etkisi değerlendirildi.

İnsan kan plazmasında yapılan çalışmalarda GC-HS ile en düşük konsantrasyon, tayin edilebilecek limit değerleri, kesinlik ve tekrarlanabilirlik amaca uygun bir şekilde yapılmıştır.

1-500ng/mL arasında çizilen kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayıları toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 0,9985, 0,9976, 0,9948, 0,9959 olarak tespit edilmiştir. Her madde için farklı derişimlerde yapılan geri kazanım çalışmaları beklenen aralıkta (%80-120) tespit edilmiştir. Metodun LOD değerleri toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 0,55 ng/mL, 0,36 ng/mL, 0,44 ng/mL, 0,36 ng/mL, LOQ değerleri ise toluen, benzen, ksilen ve stiren için sırası ile 1,68 ng/mL, 1,10 ng/mL, 1,34 ng/mL, 1,08 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Benzen, Gaz Kromatografisi-Headspace, Stiren, Toluen, Ksilen.

SUMMARY

Quantitative determination and validation of toluene, benzene, xylene and styrene in human plasma by modified gas chromatography-Headspace method

The aim of our study is to develop and validate the rapid, sensitive and accurate determination of blood levels of toluene, benzene, xylene and styrene by GC-HS method in occupational exposure, abuse and poisoning.

In order to determine the exposure and level of toluene, benzene, xylene and styrene together, Gas Chromatography- Headspace analysis method was used in blood samples. Equilibrium time concentration, effect of extraction heat and salt component effect were evaluated.

In human blood plasma studies with GC-HS, the lowest concentration, the limit values to be determined, the accuracy and reproducibility were made in accordance with the purpose.

In the calibration curve drawn between 1-500ng/mL, the correlation coefficients were 0,9985, 0,9976, 0,9948, 0,9959 for toluene, benzene, xylene and styrene, respectively. Recovery studies for each substance at different concentrations were determined within the expected range (%80-120). Method LOD is 0,55ng/mL, 0,36ng/mL, 0,44ng/mL, 0,36ng/mL for toluene, benzene, xylene and styrene, respectively, LOQ is 1,68ng/mL, 1,10ng/mL, 1,34ng/mL, 1,08ng/mL for toluene, benzene, xylene and styrene respectively.

Key Words: Benzene, Gas Chromatography- Headspace, Styrene, Toluene, Xylene.

KAYNAKLAR

- AKDUR R, İşyerinde_toksinler, ERIŞİM (www.recepakdur.com/ getfile.asp?file=İŞYERİNDE%20TOKSİNLER% 20RA.pdf)
- AKGÜR S, ÖZTÜRK P, KURTULMUŞ Y, KARALI H, ERTÜRK S (2001), Medicolegal Aspects of Blood-Urine Toluene and Urinary Ortho-Cresol Concentrations in Toluene Exposure. *Turk J Med Sci.* 31:415-419).
- AKSOY M (1989), Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene, *Environ Health Perspect*, **82**: 193-7.
- ALVAREZ-LEITE E.M, DUARTE A, BARROCA MM, SILVEIRA J N (1999), Possible effects of drinking and smoking habits on hippuric acid levels in urine of adults with no occupational toluene exposure. *J. Occup. Health*, **41**:112-114.
- AMENO K, FUKU C, AMENO S (1989), A fatal case of oral ingestion of toluene, *Forensic Sci. Int.* **41**:255-260.
- AMENO K, KIRIU T, FUKU C (1992), Regional brain distribution of toluene in rats and in a human autopsy. *Arch. Toxicol*, **66**:153-156.
- ANA-LILIA GY, CARLOS K, KAZIMIERS W, ELVA-LETICIA PL, KATARZINA W, GLORIA B (2005), Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **79** (3):259-264.
- ANDERSEN I, LUNDQVIST GR, MOLHAVE L (1983), Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures, *Scand J Work Environ Health* **9**:405-418.
- ANGERER J, KRAMER K (1997), Occupational chronic exposure to organic solvents XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **69**:91-96.

- ANGERER J, SCHILDBACH M, KRAMER A (1998), S-p-Toluymlmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure, *Arch. Toxicol*, **72**:119-123
- ANGERER J, SCHILDBACH M, KRAMER A (1998), S-p-Toluymlmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure, *Arch. Toxicol*, **72**:119-123
- ASTRAND I, ENGSTROM J, OVRUM P (1978) , Exposure to xylene and ethylbenzene. I Uptake, distribution and elimination in ma. *Scand J Work Environ Hlth* **4**:185-194.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2000), Toxicological profile for toluene. Erişim:[<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>]
- BAELUM J, MOLHAVE L, HONORE HANSEN S, DOSSING M (1993), Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans *Scand. J. Work. Environ. Health*, **191**:55-62
- BASELT RC, CRAVEY RH (1990), Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 3d ed, Chicago, Year Book Medical Publishers, p.762-764.
- BENOIT FM, DAVIDSON WR, LOVETT AM (1985), Breath analysis by API/MS human exposure to volatile organic solvents, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **55**:113-120.
- BERGMAN K (1979), Whole-body autoradiography and allied tracer techniques in distribution and elimination studies of some organic solvents: benzene, toluene, xylene, styrene, methylene chloride, chloroform, carbon tetrachloride and trichloroethylene, *Scand J Work Environ Health*, **5** (Supp 1):1-263.
- BIENIEK G, KURKIEWICZ S, WILCZOK T, KLIMEK K, SWIATKOWSKA L, LUSIAK A (2004), Occupational Exposure to aromatic hydrocarbons at a coke plant: Part II. Exposure assessment of volatile organic compounds. *J. Occup. Health*, **46**:181-186.
- BİLİR N, Yıldız AN. İş Sağlığı ve Güvenliği (2004), Ankara. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, p. 199- 201.
- BİLİR N. İş Sağlığı. Eds.: Bertan M, Güler Ç. İç: Halk Sağlığı Temel Bilgileri. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 1997, p. 274-75.

- BOATTO G, NIEDDU M, CARTA A, PAU A, LORENZONI S, MANCONI P, SERRA D (2004), Determination of phenol and o-cresol by GC/MS in a fatal poisoning case, *Forensic Science International*, **139**:191-194.
- BRCIC I, SKENDER L (2003), Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) in urine by purge and trap gas chromatography, *J. Sep. Sci*, **26**:1225-1229.
- CARLSSON A, LJUNGQUIST E (1982), Exposure to toluene: Concentration in subcutaneous adipose tissue, *Scand. J. Work Environ. Health*, **8**: 56-62.
- CARVALHO D, LONCHODE V (1991), A new derivatization procedure for the analysis of hippuric acid And m-methylhippuric acid by gas chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **63**: 33-37.
- ÇOK I, DAGDELEN A, GOKCE E (2003), Determination of urinary hippuric acid and o-cresol levels as biological indicators of toluene exposure in shoe-workers and glue sniffers. *Biomarkers*. Vol8-No2:119-127.
- DILLS RL, BELLAMY GM, KALMAN DA (1997), Quantitation of o-, m- and p-cresol and deuterated analogs in human urine by gas chromatography with electron capture detection, *Journal of Chromatography B*. **703**:105-113.
- DOSSING M, BÆLUM J, HANSEN SH, LUNDQVIST GR (1984), Effect of ethanol, cimetidine, and propanol on toluene metabolism in man, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **54**: 309-315.
- DUTKIEWICZ T, TYRAS H (1968), Skin absorption of toluene, styrene and xylene by man, *Brit J Industr Med*, **25**:243.
- ENGSTROM J, RIIHIMAKI V (1979), Distribution of m-xylene to subcutaneous adipose tissue in short-term experimental human exposure. *Scand J Work Environ Health* **5**:126-134.
- ENGSTROM K, HUSMAN K, RIIHIMAKI V, (1977), Percutaneous absorption of m-xylene in man, *Int Arch Occup Environ Hlth*, **39**:181-189.
- EPA (USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (1990), Drinking Water Criteria Document For Toluene, (EPA Report No. ECAO-CIN-408. Final Draft.

- EPA (USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2005), Toxicological Review For Toluene, Washington, D.C.
- ESHAGI Z, EBRAHIMI M, HOSSEINI MS (2011), Optimization of a novel method for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in hair and waste water samples by carbon nanotubes reinforced sol–gel based hollow fiber solid phase microextraction and gas chromatography using factorial experimental design. *Journal of Chromatography A* **1218**: 3400–3406.
- FIELDER RJ, LOWING R (1981), Styrene. Toxicity review 1. London, Her Majesty's Stationery Service.
- FUSTINONI S, MERCADANTE R, CAMPO L, SCIBETTA L, VALLA C, FOA V (2005), Determination of urinary ortho- and meta-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **817**:309-317.
- FUSTINONI S, BURATTI M, GIAMPICCOLO R, BRAMBILLA G (2000), Comparison between blood and urinary toluene as biomarkers of exposure to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. **72**:389-396.
- GHITTORI S, FIORENTINO ML, MAESTRI L (1993), Urinary excretion of unmetabolized benzene as an indicator of benzene exposure. *J Toxicol Environ Health* **38**:233–243.
- HALEY TJ, (1977), Evaluation of the health effects of benzene inhalation, *Clin Toxicol*, **11**(5):531-48.
- HATTORI H, IWAI M, KURONO S (1998), Sensitive determination of xylenes in whole blood by capillary gas chromatography with cryogenic trapping. *J Chromatogr B* **718**:285–289.
- HENDERSON RF, SABOURIN PJ, BECHTOLD WE, GRIFFITH WC, MEDINSKY MA, BIRNBAUM LS, LUCIER GW (1989), The effect of dose, dose rate, route of administration, and species on tissue and blood level of benzene metabolites, *Environ Health Perspect*, **82**: 9-17.
- HJELM EW, NASLUND PH, WALLEN M (1988), Influence of cigarette smoking on the toxicokinetics of toluene in humans, *J. Toxicol. Environ. Health*, **25**:155-163.

- HUNTER CG, BLAIR D (1972), Benzene: Pharmacokinetic studies in man. *Ann Occup Hyg*, **15**: 193-199.
- INOUE O, KANNO E, KASAI K, UKAI H, OKAMOTO S, IKEDA M (2004), Benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary marker of occupational exposure to toluene. *Toxicology Letters*. **147**:177-186.
- INOUE O, KANNO E, YUSA T, KAKIZAKI M., UKAI H., OKAMOTO S, HIGASHIKAWA K, IKEDA M (2002), Urinary benzylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to toluene, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. **75**:341-347.
- INOUE O, SEIJI K, WATANABE T (1986), Possible ethnic difference in toluene metabolism: a comparative study among Chinese, Turkish and Japanese solvent workers. *Toxicol. Lett.* **34**:167-174.
- JENNINGS W, MITTLEFEHLDT E, STREMPLE P (1996), *Analytical Gas Chromatography*. 2nd edition. J&W Scientific Folsom, California.
- KALNAS J, TEITELBAUM DT (2000), Dermal absorption of benzene: implications for work practices and regulations. *Int J Occup Environ Health*, **6**(2): 114-21.
- KAMIJIMA M, NAKAZAWA Y, YAMAKAWA M, SHIBATA E, HISANAGA N, ONO Y, TOIDA M, TAKEUCHI Y (1994), Metabolic acidosis and renal tubular injury due to pure toluene inhalation, *Arch Environ Health*, **49** (5): 410-3.
- KARACIĆ V, SKENDER L, BOSNER-CUCANCIĆ B, BOGADI-SARE A (1995), Possible genotoxicity in low level benzene exposure, *Am J Ind Med*, **27**(3): 379-88.
- KAWAI T, MIZUNUMA K, OKADA Y, HORIGUCHI S, IKEDA M (1996), Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Health*, **68**:289-297.
- KAWAI T, YASUGI T, MIZUNUMA K (1993), Comparative evaluation of blood and urine analysis as a tool for biological monitoring of n-hexane and toluene, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**:S123-S126.
- KENT R. OLSON, POISONING AND DRUG OVERDOSE (2004), Appleton & Lange, 4th Edition, p128.

- KENT R. OLSON, POISONING AND DRUG OVERDOSE (2004), Appleton & Lange, 4th Edition, p358.
- KONGTIP P, VARARUSSAMI J, PRUKTHARATHIKUL V (2001), Modified method for determination of hippuric acid and methylhippuric acid in urine by gas chromatography, *Journal of Chromatography B*. **751**:199-203.
- LAUWERYS RR (1983), Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. Biomedical Publications, Davis.
- LEE XP, KUMAZAWA T, SATO K, WATANABE K, SENO H, SUZUKI O (1998), Determination of solvent thinner components in human body fluids by capillary gas chromatography with trapping at low oven temperature for headspace samples. *Analyst*, **123**:147-150.
- LODEN M, (1986), The in Vitro Permeability of Human Skin to Benzene, Ethylene Glycol, Formaldehyde, and n-Hexane, *Acta pharmacologica et Toxicologica*, **58** (5), 382-389.
- MAJOR J, JAKAB M, KISS G, TOMPA A, (1994), Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene, *Environ Mol Mutagen*, **23**(2): 137–142.
- MEEK ME, CHAN PKL (1994), Toluene: Evaluation Of Risks To Human Health From Environmental Exposure In Canada. *Env. Carc. and Ecotox. Rev.*, **12**:507-515.
- MOLHAVE L, PEDERSEN OF (1984), Measurements of Alveolar Concentrations of Toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **54**: 65–71.
- NAKAJIMA T, WANG RS (1994), Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int. J. Biochem.* **26**:1333-1340.
- NAKAJIMA T, WANG R.S, ELOVAARA E. (1997) Toluene metabolism by cDNAexpressed human Hepatic cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **53**:271-277.
- Organik Kimya 1 Hidrokarbonlar. _ <http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1222/unite14.pdf> [Erişim tarihi: 02.03.2008].
- PARKE DV, WILLIAMS RT (1953), Studies in detoxication 49, The metabolism of benzene containing [¹⁴C₁]benzene. *Biochem J*, **54**: 231-238.

- PEZZAGNO G, IMBRIANI M, GHITTORI S, CAPODAGLIO E (1988), Urinary concentration, environmental concentration, and respiratory uptake of some solvents: Effect of the work load, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J*, **49**:546–552.
- PIERCE CH, CHEN Y, DILLS RL, KALMAN DA, MORGAN MS (2002), Toluene metabolites as biological indicators of exposure. *Toxicology Letters*, **129**:65-76.
- PROCTOR NH, HUGHES JP, FİSCHMAN ML, (1988), Chemical hazards of the workplace. 2d ed. Philadelphia, J.B.Lippincott Co., p.448-449.
- RAIKHLIN-EISENKRAFT B, HOFFER E, BAUM Y, BENTUR Y (2001), Determination of urinary hippuric acid in toluene abuse. *Clinical Toxicology*. **39**(1):73-76.
- RANDALL C, DISPOSITION OF TOXIC DRUGS AND CHEMICALS IN MAN, 3th ed. (1989), Year Book, Medical Publishers, p 812.
- RICKERT DE, BAKER TS, BUS JS, BARROW CS, IRONS RD (1979), Benzene disposition in the rat after exposure by inhalation, *Toxicol Appl Pharmacol*, **49**: 417-423.)
- RIIHIMAKI V & SAVOLAINEN K (1980), Human exposure to m-xylene. Kinetics and acute effects on the central nervous system. *Ann Occup Hyg*, **23**:411-422.
- RIIHIMAKI V, PFAFFLI P, SAVOLAINEN K (1979), Kinetics of m- xylene in man. Influence of intermittent physical exercise and changing environmental concentrations on kinetics. *Scand J Work Environ & Hlth*, **5**:232-248.
- SABOURIN PJ, CHEN BT, LUCIER G, BIRNBAUM LS, FISHER E, HENDERSON RF, (1987), Effect of dose on the absorption and excretion of [14C] benzene administered orally or by inhalation in rats and mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, **87**: 325-336.
- SATO A, FUJIWARA Y (1975), Elimination of inhaled benzene and toluene in man, *Sangyo igaku, Jap J Ind Health*, **14**: 224-225.
- SATO A, NAKAJIMA T (1978), Differences following skin or inhalation exposure in the absorption and excretion kinetics of trichlorethylene and toluene, *Br. J. Ind. Med*, **35**:43-49.
- SEDIVEC V, FLEK J (1976), The absorption, metabolism and excretion of xylenes in man, *Int Arch Occup Environ Hlth*, **37**:205-217.

- SRBOVA J, TEISINGER J, SKRAMOVSKY S (1950), Absorption and elimination of inhaled benzene in man. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med*, **2(1)**:1-8.
- STEWART RD, DODD HC, Baretta ED, SCHAFFER AW (1968), Human exposure to styrene vapor. *Arch Environ Health*, **16**:656-662.
- STREICHER HZ, GABOW PA, MOSS AH, KONO D, KAEHNY WD (1981), Syndromes of toluene sniffing in adults, *Ann Intern Med*, **94** (6): 758-62.
- SUSTEN A, DAMES B, BURG J (1985), Percutaneous penetration of benzene in hairless mice: An estimate of dermal absorption during tire-building operations, *Am J Ind Med*, **7**: 323-335.
- SZUCS S, TOTH L, LEGOZA J, SARVARY A, ADANY R (2002), Simultaneous determination of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry *Arch Toxicol*, **76**: 560–569
- TASSANEYAKUL W, BIRKETT DJ, EDWARDS JW (1996), Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-, and p-xylene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**:101-108.
- TATDOTOX Erişim Adresi: (<http://tatdtoksikoloji.org/haber/stiren-intoksikasyonu>). Erişim tarihi 01/06/2019.
- TAUBER J (1970), Instant benzol death. *J Occup Med*, **12**: 91-92.
- ULAKOĞLU EZ, SAYGI A, GÜMÜŞTAŞ MK, ZOR E, AKAYA A, KÖKOĞLU E. (1998), Kronik tiner inhalasyonunun sıçan akciğer ve karaciğer dokuları lipid peroksidasyonlarına etkisi, *Cerrahpaşa Tıp Derg*, **29** (2): 75-78.
- US. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Benzene, (2006), Atlanta, GA
- VELİCANGİL S, (1980), Koruyucu ve Sosyal Tıp. 2. Baskı. İstanbul. Filiz Kitabevi, 1980, p. 551-56.

VOSS JU, ROLLER M, BRINKMANN E, MANGELSDORF I (2005), Nephrotoxicity of organic solvents: biomarkers for early detection, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **78**:475-485

WALLEN M, HOLM S, NORDQVIST MB (1985), Coexposure to toluene and paraxylene- Uptake and elimination in man, *Br. J. Ind. Med*, **42**(2):111-116.

WANG G, MARANELLI G, PERBELLINI L, GUGLIELMI G, BRUGNONE F (1993), Reference values for blood toluene in the occupationally nonexposed general population, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**(3):201-203.

WHO Regional Office for Europe, Chapter 5.2. Benzene. Air Quality Guidelines - Second Edition.

WILKINS-HAUG L (1997), Teratogen update: Toluene. *Teratology* **55**:145-151.

WINEK CL, COLLOM WD (1971), Benzene and toluene fatalities, *J Occup Med*, **13**: 259-261.

WINEK CL, COLLUM WD, WECHT CH (1967), Fatal benzene exposure by glue-sniffing, *Lancet*, **25**: 683.

YAVUZ Ö, Dış ortam hava kirliliğinin organizmada yarattığı etkilerin vücut sıvıları ve ekshale havada ölçümü.

http://www.toraks.org.tr/pdf/hava_kir_semp/invivo_olcumLer.pdf

[Erişim_tarihi: _12.03.2008]

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Ayşe GÜVEN

Doğum yeri ve tarihi: Bozkır/ 23.09.1984

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Muaf

İletişim adresi ve telefonu: Burç mah. Sorgunn sokak. No:5 D:9 Şentepe

Yenimahalle/Ankara 0(506) 262 1776

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve

Katıldığı eğitim seminerleri

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri