

Poliaromatik hidrokarbonların kapiler elektrokinetik kromatografi yöntemi ile ayrılması ve tayini

Gamze KAVRAN BELİN*, F. Bedia ERİM

İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Poliaromatik hidrokarbonların (PAH çevrede bulunma sıklığı ve insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle bu bileşikler, pek çok alanda ön plana çıkmakta ve bunların bir karışımdan ayrılarak tayinleri de önem kazanmaktadır. Bu çalışmada sodyum dodesilbenzensülfonat (SDBS), hidrofobik poliaromatik hidrokarbonların (PAH) su-organik faz ortamında elektrokinetik kromatografi yöntemi ile ayrılmalarında sahte sabit faz olarak kullanılmıştır. PAH moleküllerinin, SDBS iyonu ile solvofobik etkileşimi sonucu negatif yük kazanan PAH türleri, elektrik alan altında hareket edebilirler. Böylece farklı halka (1-5) sayısına sahip 8 adet PAH ve 3 adet aromatik bileşik içeren örnek karışımının 130.000-230.000 arası teorik plaka etkinliği ile ayırımı başarılmıştır. Geliş zamanına göre bağıl tekrarlanırlık değerleri % 1.15-1.55 RSD, pik alanına göre ise % 2-9 RSD arasındadır.

Anahtar Kelimeler: Poliaromatik hidrokarbonlar, sodyum dodesilbenzensülfonat, kapiler elektroforez, elektrokinetik kromatografi.

Separation and determination of polyaromatic hydrocarbons by capillary electrokinetic chromatography

Abstract

Due to the abundance of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment and the adverse health effects to which they have been linked, these compounds have been the focus of considerable attention in a number of areas including chemical separations. Especially, nowadays due to many advantages of the capillary electrophoresis technique (CE), detection and analyses of these kinds of compounds by using CE have become more important. In order to separate nonionic compounds in CE, an interaction with a charged carrier in the buffer should be provided. Both PAHs can be separated in CE by using additives which cause selectivity change and resolution of PAHs having the same electrophoretic mobility, not only due to electrostatic interaction but also due to a combination of other effects like hydrophobicity, hydrogen bonding, dipole-dipole interaction, etc. Sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) was evaluated as potential pseudo-stationary phase for the separation of highly hydrophobic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with electrokinetic chromatography in aqueous-organic media. PAH molecules undergo a solvophobic interaction with the SDBS ion, forming negatively charged species that can migrate in an electric field. Thus electrophoretic separations of 8 PAHs and 3 aromatic compounds having different ring numbers (1-5) were achieved with efficiencies between 130.000-230.000 theoretical plates. Reproducibilities of migration times range between 1.15 and 1.55 %RSD and peak areas between 2 and 9 %RSD.

Keywords: Polyaromatic hydrocarbons, sodium dodecylbenzenesulfonate, capillary electrophoresis, electrokinetic chromatography.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Gamze KAVRAN BELİN. kavran@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 31 51.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi'nde tamamlanmış "Nötral aromatik ve izomerik aromatik bileşiklerin elektrokinetik kromatografi yöntemi ile ayırımı ve tayini" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 22.07.2003 tarihinde dergiye ulaşmış, 03.11.2003 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.04.2005 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Poliaromatik hidrokarbonların (PAH) çevrede bulunma sıklığı ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle bu bileşikler pek çok alanda ön plana çıkmakta ve bunların bir karışımdan ayrılarak tayinleri de önem kazanmaktadır. Kapiler elektroforez (CE) ayırma tekniğinde iyonik olmayan bileşiklerin ayrılması için, tampon içinde bir yüklü taşıyıcı ile etkileşim sağlanması gerekir. İyonik olmayan bileşiklerin bu yöntemle ayrılmasında en etkin teknik, Terabe ve diğerleri (1984; 1985) tarafından geliştirilen misel elektrokinetik kromatografi (MECK) yöntemidir. Misel faz PAH ların çözünürlüğünü önemli ölçüde artırır, ancak suda çok sınırlı çözünürlükleri ve hidrofobik özellikleri nedeniyle PAH'lar misel faz ile sulu faz arasında dağılım yapamazlar ve PAH karışımlarının elektroforetik mobilitelerinde farklanma ve ayırım gerçekleşemez.

PAH'ların miselin hidrofobik boşluğundan çözücü fazına geçmelerini sağlamak için yüksek oranda organik çözüye ihtiyaç vardır. Ancak, yüksek oranda organik çözücü kullanımı, misel oluşumunu engeller. Bowser ve diğerleri (1998) çalışmalarında, organik çözücü içeren ortamlarda hidrofobik etkileşimler çok zayıf olduğu için YAM monomerlerinin biraraya gelerek misel oluşturmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, %20 den fazla MeCN içeren sulu çözeltilerde misel oluşmadığı gösterilmiştir.

Buna karşılık, PAH'ların bazı monomerik yüzey aktif maddeler ile solvofobik etkileşim gösterdiği bilinmektedir. CE'de ayırma çözeltisine ilave edilen YAM monomerleri ile PAH'lar farklı etkileşimi gösterirlerse, elektroforetik mobilitelerindeki farklanma sonucu PAH karışımlarının ayrılmaları mümkün olur. Bu şekilde analitlerin elektrolit ilave maddeleri ile seçimli etkileşmesine dayanan CE tekniği, kapiler elektrokinetik kromatografi (EKC) yöntemi olarak isimlendirilir. Literatürden de görüleceği gibi, PAH'ların elektrokinetik ayırımında solvofobik etkileşim gösteren oldukça az sayıda YAM incelenmiştir. Ahuja ve Foley (1994), MECK'de en çok kullanılan sodyum dodesilsülfat (SDS) monomerlerinin PAH'lar ile etkileşim göstermediğini belirtmişlerdir. Buna karşılık,

Walbroehl ve Jorgenson (1986) ilk olarak tetraheksilamonyum iyonu ile %50 asetonitril (MeCN) içeren çözeltide beş PAH'nun ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra Shi ve Fritz (1994), kuarternize amonyum tuzlarının tampon ilave maddesi olarak etkilerini incelemiş ve tetraheptilamonyum iyonu ile PAH'ların ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Muijselaar ve diğerleri (1997), su-MeCN ortamda tetraoktilamonyum ve tetradecilamonyum iyonlarını kullanmışlardır. Shi ve Fritz (1995), MeCN-su (40:60) ortamda negatif yüklü dioktilsülfoksinat (DOSS) iyonlarının solvofobik etkileşimi ile PAH'ların elektrokinetik ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Ding ve Fritz (1997), aynı amaca yönelik olarak sülfolanmış Brij-35 kullanmışlardır.

Bu çalışmada, ayırma çalışmalarında en yaygın kullanılan YAM olan SDS'den farklı olarak yapısında bir benzen halkası içeren sodyum dodesilbensensülfonat (SDBS) YAM'si kullanılarak, 8 PAH ve 3 aromatik madde karışımının ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Ayırımı ve tayini yapılan PAH'ların kimyasal yapıları Şekil 1'de verilmiştir.

Deneysel çalışmalar

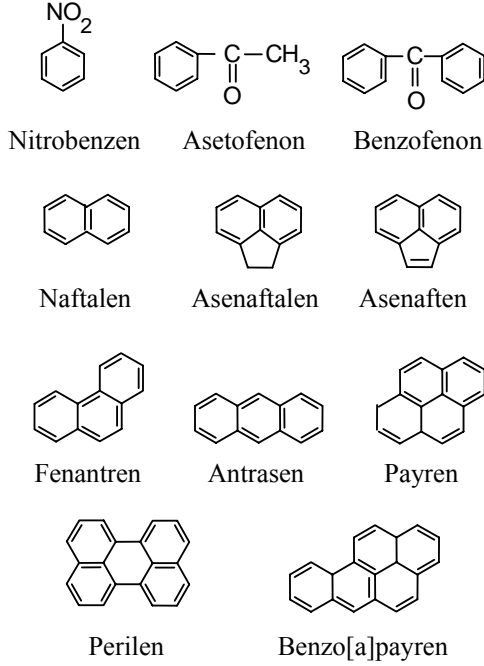
Cihaz

Çalışmalar, değişken dalgaboylu UV-GB dedektörüne (Lambda 1000, Bishoff, Leonberg, Almanya) bağlı ticari bir CE injeksiyon sistemi (Prince Teknoloji, Emmen, Hollanda) kullanılarak yapılmıştır. Elektrokinetik ayrılmalar, toplam ve etkin uzunluğu sırasıyla 67 ve 53 cm olan, 50 µm iççaplı silika kapiler kolonda (Polymicro Teknoloji, Phoenix, AZ, USA) gerçekleştirilmiştir. Kapiler kolonun yıkanması, örnek injeksiyonu ve elektroforetik çalışmalar, bir bilgisayar kontrolü ile sağlanmıştır. Çalışma verileri, ticari bir CE bilgisayar programı (Ceaser 1995, Prince Teknoloji) kullanılarak kaydedilmiştir. Çalışmada kullanılan deiyonize su, Elgacan C114 filtre sistemi kullanılarak sağlanmıştır.

Kimyasallar

Asetofenon, naftalen, asenaftalen, asenaften, fenantren, antrasen, payren, perilen, benzo-

[a]payren ve TRİS, Fluka (Buchs, İsviçre); nitrobenzen ve asetonitril Riedel (Seelze, Almanya); benzofenon ve SDBS Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmalarından sağlanmıştır.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan PAH'ların moleküler yapısı

Prosedür

Herbir PAH stok çözeltisi, MeCN'de çözülerek hazırlanmıştır. Örnek çözeltileri, su-MeCN (55:45) ve SDBS (45 mmol/L) içeren çözeltinin 0.45 µm'lik selülozasetat filtreden süzülmesi ile hazırlanmıştır. Örnek içerisine SDBS ilavesi ile hem örneğin çözünürlüğü artırılmış hem de daha iyi pik şekilleri elde edilmiştir.

Kapiler kolon, hergün çalışmaya başlanmadan önce 10'ar dakika 1 mol/L NaOH, su ve ardından çalışma tamponu ile yıkanmıştır. İnjektion aralarında kapiler sırası ile 2 dakika asetonitril, 2 dakika 1 mol/L NaOH ve 4 dakika çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Örnek injeksiyonu, anodik uçtan basınç ile (40 mbar, 0.07 dakika) gerçekleştirilmiştir. Çalışma dalgaboyu, 254 nm'ye ayarlanmıştır. SDBS'in maksimum dalgaboyu ise 223 nm'dir. 254 nm'de SDBS'in molar absorptivitesi PAH'lara kıyasla oldukça düşüktür.

Sonuçlar ve tartışma

Elektroforetik deneyler için örnek çözeltilerin hazırlanmasında PAH'ların çözünürlüğünü en iyi MeCN'in sağladığı görülmüştür. Tampon olarak TRİS ve boraks denenmiştir. TRİS ile akımın daha düşük ve bu nedenle elektroferogramın daha pürüzsüz olmasından ötürü, çalışma tamponu olarak TRİS seçilmiştir.

Ön denemeler, %40 MeCN içeren tampon çözeltinin, elektroforetik ayırımlarda iyi sonuç verdiğini göstermiştir. Çalışma tamponundaki asetonitril yüzdesi %40 oranında sabit tutularak, SDBS konsantrasyonunun PAH'ların elektroforetik mobilitelerine etkisi incelenmiştir.

Kapiler elektroforezde deneysel olarak bir maddenin elektroforetik mobilitesi aşağıdaki eşitlikle hesaplanabilir:

$$\mu = L_t L_d / V(t - t_{e0}) \quad (1)$$

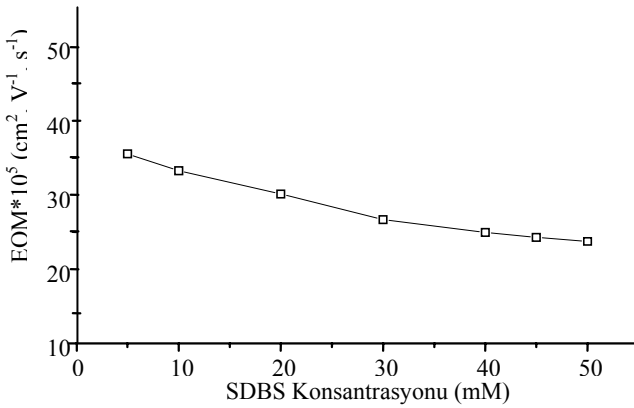
burada L_d kapilerin injeksiyon ucundan dedeksiyon noktasına olan uzaklığı, L_t kapilerin toplam uzunluğu, V kapiler boyunca uygulanan voltaj, t ve t_{e0} sırasıyla maddenin ve nötral işaretleyicinin geliş süreleridir.

SDBS konsantrasyonunun etkisi

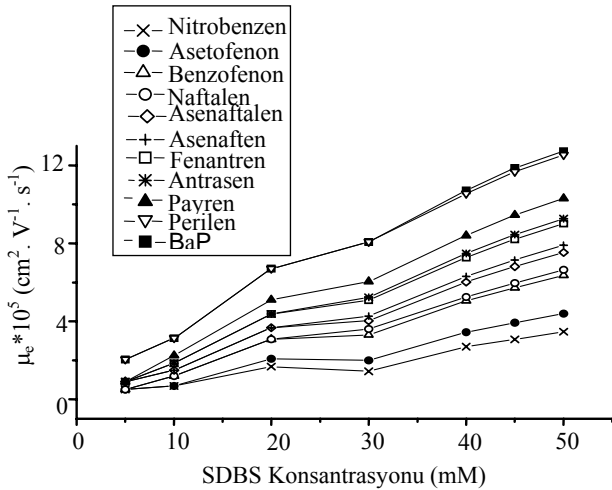
20 mmol/L TRİS ve %40 asetonitril içeren çalışma tamponunda 5 mmol/L'den 50 mmol/L'ye kadar değişen konsantrasyonlarda SDBS kullanılarak PAH'ların ayırımına olan etkisi incelenmiştir. Şekil 2'de, pH=8.2 olan çalışma tamponunda artan SDBS konsantrasyonu ile elektroosmotik mobilitenin ne şekilde değiştiği gösterilmiştir. Beklendiği gibi, artan SDBS miktarı ile tamponun viskozitesi ve iyonik şiddeti arttığından, EOM azalır. 5-50 mmol/L SDBS aralığında akım değişimi 6-28 µA'dır.

Artan SDBS konsantrasyonu ile PAH'ların etkin elektroforetik mobiliteleri Şekil 3'de görüldüğü gibi değişir. Negatif yüklü YAM ile PAH'lar arasındaki etkileşim, SDBS'in düşük konsantrasyonlarında gözlenmiştir. SDBS konsantrasyonunun artırılması ile tüm PAH'ların elektroforetik mobilitelerinde artış gözlenmiştir. Kapiler kolonda elektroosmotik akışın yönü ile negatif

yüklü YAM'nin elektroforetik mobilitesi ters yönde olduğundan, YAM ile etkileşen PAH'lar negatif yüklü maddelermiş gibi davranarak elektroosmotik akış pikinden (bu çalışmada negatif su piki) daha sonra dedekte edilirler. En büyük PAH, negatif yüklü YAM ile en çok etkileşimde bulunduğu elektroforetik mobilitesi en büyüktür. Ayırımın tamamlanmasında, 50 mmol/L SDBS konsantrasyonu optimum koşul olarak belirlenmiştir. Şekil 3'te görüldüğü gibi, daha yüksek konsantrasyonlarda rezolüsyon aynı kalmakta fakat analiz süresi artmaktadır.



Şekil 2. 20 mmol/L TRİS ve %40 (v/v) MeCN, pH=8.2 tamponunda SDBS konsantrasyonuna bağlı elektroosmotik mobilite değişimi



Şekil 3. 20 mmol/L TRİS ve %40 (v/v) MeCN, pH=8.2 tamponunda SDBS konsantrasyonuna bağlı elektroforetik mobilite değişimi

Şekil 4'de; 20 mmol/L TRİS, %40 MeCN ve 50 mmol/L SDBS içeren çalışma tamponunda 25 kV altında alınmış PAH'ların ayırımına ait elektroferogram gösterilmiştir.

Asetonitril konsantrasyonunun etkisi

PAH'ların ayırımına yönelik çalışma, tüm diğer koşullar Şekil 4'te gösterildiği gibi sabit tutularak %50 asetonitril içeren çalışma tamponunda gerçekleştirilmiştir. Asetonitril içeriğinin %40'dan %50'ye çıkarılması, EOM'de küçük bir azalmaya neden olmuştur. %50 MeCN içeren tamponda SDBS ile daha az etkileşime giren PAH'ların elektroforetik mobilitelerinde de azalma olur. Ayırım penceresi daralır ve ardışık pikler arasındaki rezolüsyon kaybolur. Asetonitrile oranla sulu çözeltide, solvofobik etkileşimler daha güçlü olduğundan (Bowser vd., 1998), tampondaki su miktarı azaldıkça PAH'lar ile YAM monomerleri arasındaki solvofobik etkileşimler zayıflar ve analitlerin elektroforetik mobiliteleri azalır.

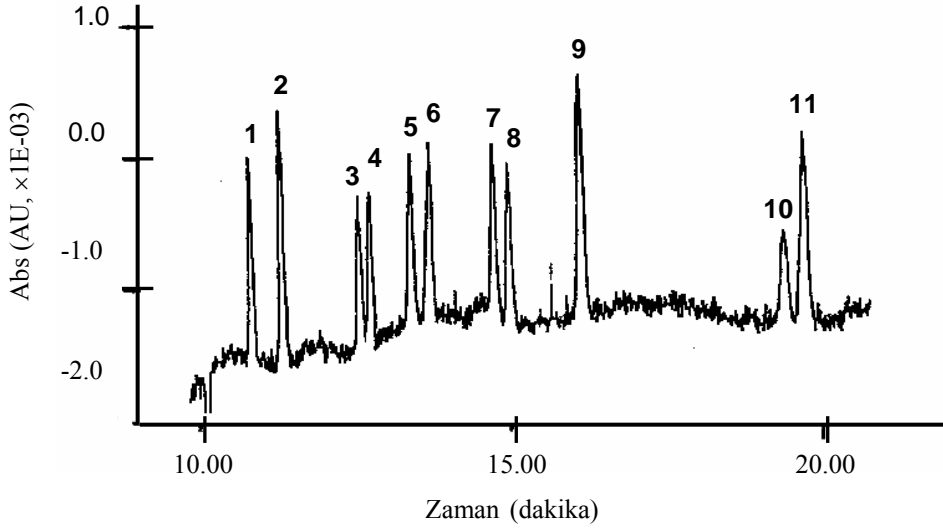
Solvofobik etkileşimleri arttırmak için, asetonitril içeriği %30'a indirilmiş fakat bu konsantrasyonda PAH'lar çökmüş ve elektroferogramdaki gürültüden ötürü pik tanımlaması yapılamamıştır.

Voltaj etkisi

Ayırım, 20, 25 ve 28 kV'da denenmiştir. 20 kV'da; ayırım penceresi genişlemiş fakat analiz süresi uzamış ve son piklerin veriminde azalma olmuştur. Şekil 3'te görüldüğü gibi ayırım, 19.6 dakikada tamamlanmışken voltajın 20 kV'a indirilmesi ile son pik 34. dakikada gelmiştir. Ancak, ardışık piklerin rezolüsyonunda önemli bir artış gözlenmemiştir. Voltajın 28 kV'a çıkarılması ile pikler arasındaki rezolüsyon kaybolmuştur. Bu nedenle, analiz süresi, rezolüsyon ve tüm piklerin verimliliği göz önünde bulundurularak 25 kV optimum kabul edilmiştir.

Kantitatif analiz

Asetonitril oranı, SDBS konsantrasyonu ve voltaj gözönünde bulundurularak Şekil 3'teki çalışma koşulları, PAH'ların ayırımı için optimum koşullardır. Pikler simetrik ve teorik plaka sayıları 130.000-230.000 arasında değişmektedir.



Şekil 4. PAH'ların ayırımı. Tampon: 20 mmol/L TRIS, %40 (v/v) MeCN, pH=8.2. Voltaj=25 kV, dedeksiyon dalgaboyu=254 nm. Pikler: 1-Nitrobenzen, 2-Asetofenon, 3-Benzofenon, 4-Naftalen, 5-Asenaftalen, 6-Asenaften, 7-Fenantren, 8-Antrasen, 9-Payren, 10-Perilen, 11-Benzo[a]payren. Örnekdeki PAH konsantrasyonları: 0.03 mmol/L (7), 0.05 mmol/L (10), 0.1 mmol/L (3 ve 11), 0.2 mmol/L (2,8 ve 9), 0.5 mmol/L (1), 1 mmol/L (4 ve 5), 2 mmol/L (6)

Geliş zamanı için bağıl standart sapma değerleri, CE ayırımları için oldukça uygundur.

Ardarda gerçekleştirilen altı injeksiyon sonucu elde edilen geliş zamanları ve pik alanlarının tekrarlanırlıkları ve 254 nm'de sinyal/gürültü oranı 3 alınarak hesaplanmış olan minimum dedeksiyon limitleri, Tablo 1'de verilmiştir.

Sonuç olarak PAH'ların ayırımı, CE yöntemi ile 19.6 dakika içerisinde elektroforetik tampon içerisindeki negatif yüklü SDBS YAM'si ile PAH'lar arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak gerçekleşmiştir. SDBS, PAH'ların sadece farklı halka sayısına sahip (1'den 5'e kadar) olan türlerinde değil aynı zamanda asenaften-asenaftalen, fenantren-antrasen ve perilen-benzo[a]payren gibi yapısal izomer çiftleri arasında da iyi bir seçicilik göstermiştir.

Sulu çözeltide SDBS'in kritik misel konsantrasyonunun yaklaşık 2 mmol/L olduğu belirtilmiştir (Van Os vd., 1993). SDBS, kromatografik çalışmalarda fazla kullanılmış bir YAM değildir. Erim ve diğerleri (1995), bir çalışmada SDBS'i 13 yağ asidini CE'de ayırmak için Brij-35 ve asetonitril ile birlikte kullanmışlardır.

Bu çalışmada, yağ asitlerinin SDBS ve %20'nin üzerinde asetonitril içeren çözeltideki geliş sıralaması CZE'de beklenen $C_{20} < C_{19} < \dots < C_9$ sıralamasının tersine $C_8 < C_9 < \dots < C_{20}$ şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, SDBS misel yapısının asetonitrilde bozulduğunu göstermektedir. Bu durum gözönünde bulundurularak, yapmış olduğumuz çalışmadaki optimum koşullar altında misel oluşumu beklenmez. Şekil 4'te de görüldüğü gibi, MEKC'ye kıyasla pik şekilleri daha keskin ve teorik plaka sayıları daha yüksektir.

PAH'lar ile negatif yüklü SDBS YAM monomerleri arasındaki etkileşim daha çok solvofobik olmalıdır. Ahuja ve Foley (1994) bir çalışmada, SDS YAM'sini yüksek oranda asetonitril ile birlikte kullanarak tüm PAH'ların EOM ile aynı zamanda geldiğini ve SDS ile PAH'lar arasında bir etkileşimin olmadığını belirtmişlerdir. SDBS, SDS'den farklı olarak yapısında bir benzen halkası içermektedir. SDS'de olmayan güçlü etkileşimin SDBS ile gözlenmesi, yapısındaki benzen halkasının ayırımında etkin olabileceğini göstermektedir.

Reubsat ve Vieskar (1999), aromatik içeriği zengin maddeler ile analitler arasındaki π - π

elektron etkileşimlerinin varlığını göstermişlerdir. π - π etkileşimleri, hidrofobik ya da elektrostatik etkileşimler kadar güçlü değildir ancak, çok yakın özellikteki maddelerin ayırımında kullanılabilir. Çalışmamızda solvofobik etkileşimlerin yanısıra SDBS YAM monomerlerinin aromatik yapısının PAH'lar ile olası π - π etkileşimlerinden de yararlanılmıştır.

Tablo 1. PAH'ların dedeksiyon limitleri ve RSD değerleri. G.Z: Geliş zamanına bağlı, P.A: Pik alanına bağlı

PAH'lar	LOD (μ g/ml)	RSD (G.Z)(%)	RSD (P.A)(%)
Nitrobenzen	6.7	1.55	4.32
Asetofenon	1.9	1.55	2.70
Benzofenon	2.2	1.15	6.76
Naftalen	23.0	1.54	7.23
Asenaftalen	23.0	1.52	5.42
Asenaften	39.0	1.49	2.93
Fenantren	0.683	1.45	6.15
Antrasen	4.0	1.39	7.51
Payren	4.0	1.39	2.12
Perilen	3.4	1.22	9.24
Benzo[a]payren	3.6	1.23	4.13

Kaynaklar

- Ahuja, E. S. ve Foley, J. P., (1994). Separation of very hydrophobic compounds by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, **680**, 73-83.
- Bowser, M. T., Kranack, A. R. ve Chen, D. D. Y., (1998). Analyte-additive interactions in nonaqueous capillary electrophoresis: a critical review, *Trends Analytical Chemistry*, **17**, 424-434.
- Ding, W. ve Fritz, J. S., (1997). Separation of nonionic compounds by CE using a lauryl

- poly(oxyethylene) sulfate additive, *Analytical Chemistry*, **69**, 1593-1597.
- Erim, F. B., Xu, X. ve Kraak, J. C., (1995). Application of micellar electrokinetic chromatography and indirect UV dedection for the analysis of fatty acids, *Journal of Chromatography A*, **694**, 471-479.
- Muijselaar, P. G., Verhelst, H. B., Claessens, H. A. ve Cramers, C. A., (1997). Separation of hydrophobic compounds by electrokinetic chromatography with tetraalkylammonium ions, *Journal of Chromatography A*, **764**, 323-329.
- Reubsat, J. L. E. ve Vieskar, R., (1999). Characterization of π - π interactions which determine retention of aromatic compounds in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **841**, 147-154.
- Shi, Y. ve Fritz, J. S., (1994). Capillary zone electrophoresis of neutral organic molecules in organic-aqueous solution, *Journal of High Resolution Chromatography*, **17**, 713-718.
- Shi, Y. ve Fritz, J. S., (1995). HPCZE of nonionic compounds using a novel anionic surfactant additive, *Analytical Chemistry*, **67**, 3023-3027.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. ve Ando, T., (1984). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Analytical Chemistry*, **56**, 111-113.
- Terabe, S. ve Otsuka, K., (1985). Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Analytical Chemistry*, **57**, 834-841.
- Van Os, N. M., Haak, J. R. ve Rupert, L. A. M., (1993). Physico-chemical properties of selected anionic, cationic and nonionic surfactants, Elsevier, Amsterdam.
- Walbroehl, Y. ve Jorgenson, J. W., (1986). Capillary zone electrophoresis of neutral organic molecules by solvophobic association with tetraalkylammonium ion, *Analytical Chemistry*, **58**, 479-481.