

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SANAYİ ATIKSULARI VE SEDİMENTLERİNDEKİ  
SENTETİK ORGANİK KİRLETİCİLERİN  
KARAKTERİZASYONU**

**Kenan SEZER**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman: Prof. Dr. Hilmi İBAR**

**EDİRNE-2010**

**SANAYİ ATIKSULARI VE SEDİMENTLERİNDEKİ SENTETİK ORGANİK  
KİRLETİCİLERİN KARAKTERİZASYONU**

**KENAN SEZER**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Bu tez 31/ 08/ 2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından Kabul Edilmiştir**



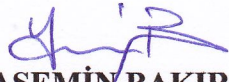
**Prof. Dr. HİLMİ İBAR**

**Danışman**



**Prof. Dr. TİMUR KIRGIZ**

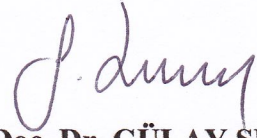
**Üye**



**Doç. Dr. YASEMİN BAKIRCIOĞLU**

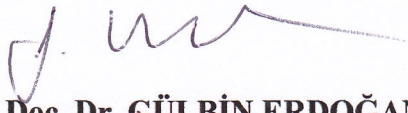
**KURTULUŞ**

**Üye**



**Doç. Dr. GÜLAY ŞEREN**

**Üye**



**Yrd. Doç. Dr. GÜLBİN ERDOĞAN**

**Üye**

## ÖZET

**Doktora Tezi**

### **SANAYİ ATIKSULARI VE SEDİMENTLERİNDEKİ SENTETİK ORGANİK KİRLETİCİLERİN KARAKTERİZASYONU**

**Kenan SEZER**

**Trakya Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Hilmi İBAR**

**2010, 114 Sayfa**

Tez çalışmamızın birinci bölümünde insan metabolizması ürünü olan ve endokrin sistemi üzerinde bozucu etki gösterebilme potansiyeline sahip steroid yapılı asitler sınıfında yer alan safra asitlerinin atıksularda tayini için GC-MS metot geliştirilmiş ve uygulanmıştır.

İkinci bölümde ise Trakya Bölgesindeki tekstil ağırlıklı olan endüstriyel atık sular ve sediment numunelerinde bulunan, mutajenik özellik taşıyan veya canlı organizmada endokrin sistemi bozucu potansiyel gösteren sentetik organik kirleticilerin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Anti-enflamatuvar ilaçlar, beta-blokerler, lipid regülatörleri, analjezikler, steroid hormonları, ftalatlar gibi farmasötik aktif bileşikler (PhAC) ve endokrin bozucu bileşiklerden (EDC) oluşan analitler gerçek numunelerde tayin edildi. Atıksu ve sediment numunelerde en yüksek konsantrasyona sahip bileşikler olarak dietil ftalat, ibuprofen ve ketoprofen olarak belirlenirken tayin frekansı en yüksek bileşikler dietil ftalat, dibutil ftalat ve salisilik asit olarak belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Farmasötik aktif maddeler (PhAC), Endokrin bozucu maddeler (EDC), Safra Asitleri, Atıksu Analizi, Katı faz ekstraksiyonu (SPE), Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometrisi GC-MS.

**ABSTRACT****PhD Dissertation****CHARACTERISATION OF SYNTHETIC ORGANIC POLLUTANTS IN  
INDUSTRIAL WASTEWATERS AND SEDIMENTS****Kenan SEZER****Trakya University****Graduate School of Sciences****Chemistry Program****Supervisor: Prof. Dr. Hilmi İBAR****2010, 114 pages**

At the first part of our thesis study we have developed and applied a GC-MS analysis method for bile acids found in wastewaters which are originated from human metabolism and which takes a part of steroidal acid compounds having potency to act as endocrine disruptors.

The following part of study includes the characterization of synthetic organic pollutants possessing mutagenic properties or showing disrupting potency on endocrine systems at living organism in wastewater and sediment samples from Trakya Region which is occupied mostly by textile industry. The analytes consisting of pharmaceutical active compounds (PhAC's) and endocrine disrupting compounds (EDC's) as like as anti-inflammatory drugs, beta-blockers, lipid regulators, analgesics, steroid hormones and phthalates have been identified in real samples. The highest concentration values in wastewater and sediment samples were obtained for diethyl phthalate, ibuprofen and ketoprofen while detection frequency was highest for diethyl phthalate, dibutyl phthalate and salicylic acid.

**Keywords:** Pharmaceutical Active Compounds (PhAC), Endocrine Disrupting Compounds (EDC), Bile Acids, Wastewater Analysis, Solid Phase Extraction (SPE), Gas-Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarımnda beni her zaman destekleyen bana yol gösteren ve bu aŐamaya gelmemi sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Hilmi İBAR'a.

Maddi manevi desteklerini hiç biz zaman esirgemeyen sevgili aileme (zellikle Anneme) ve bu önemli aşamada daima yanımda olan sevgili eŐim Aysel ile aramıza yeni katılan-hayatıma sonsuz güzellik katan biricik kızımız Melis'e gönülden teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Trakya Bölgesinde Sanayi Yapısı	2
1.1.1. Trakya bölgesinde sanayi işletmeleri	2
1.1.2. Tekirdağ ilinde bulunan sanayi işletmeleri	4
<b>2. FARMASÖTİK AKTİF MADDELERİN VE ENDOKRİN BOZUCU MADDELERİN ÇEVREDEKİ VARLIKLARI</b>	<b>6</b>
2.1. Farmasötik Aktif Bileşiklerin Atık Sular Yüzey Suları Yer Altı ve İçme Sularındaki Varlıkları	8
2.1.1. Analjezik ve anti enflamatuvar ilaçlar	8
2.1.2. Antiepileptik ilaçlar	10
2.1.3. Beta blokerler	10
2.1.4. Kan lipid regülatörleri	11
2.1.5. Doğum kontrol ilaçları	12
2.2. EDC Olarak Hormon Yapılı Steroidler ve Çevredeki Varlıkları	15

2.2.1.	Hormon yapılı steroidlerin fizikokimyasal özellikleri	16
2.2.2.	Steroidlerin çevredeki konsantrasyonları	17
2.2.2.1.	Steroidlerin atık sularındaki konsantrasyonları	17
2.2.2.2.	Steroidlerin yüzey sularındaki konsantrasyonları	18
2.3.	Steroid Yapılar Olarak Safra Asitleri ve Çevredeki Varlıkları	19
2.3.1.	Safra asitlerinin biyosentezi ve yapısal özellikleri	19
2.3.2.	Safra asitlerinin insan ve çevreye etkisi	21
2.3.3.	Steroidlerin kimyasal analizleri	22
2.3.3.1.	Steroidlerin ekstraksiyonu	22
2.3.3.2.	Steroidlerin GC-MS analizleri	22
2.3.3.3.	Steroidlerin LC-MS ve LC-MS <sup>2</sup> analizleri	23
2.4.	EDC Bileşikleri Olarak Ftalatlar ve Çevredeki Varlıkları	25
<b>3.</b>	<b>PhAC VE EDC BİLEŞİKLERİN ANALİZİ</b>	<b>26</b>
3.1.	Numune Hazırlama	27
3.1.1.	Katı faz ekstraksiyonu (SPE)	29
3.1.2.	Katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME)	30
3.1.3.	Stir bar sorbsiyon ekstraksiyonu (SBSE)	31
3.1.4.	Membran ekstraksiyonu (ME)	32
3.1.5.	Sıvı faz mikro ekstraksiyonu (LPME)	32
3.1.6.	Süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)	33
3.1.7.	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE)	33
3.1.8.	Matriks katı faz dispersiyonu (MSPD)	34
3.1.9.	Dağılım katı faz ekstraksiyonu (DSPE)	34
3.1.10.	Ultrasonik ekstraksiyon (USE)	34

3.1.11.	Mikrodalga eşlenik çözücü ekstraksiyonu (MASE)	35
3.2.	Sulardaki EDC ve PhAC Bileşikleri İçin Enstrümental Metotlar	35
3.2.1.	Gaz kromatografi kütle spektrometri tekniği	37
3.2.2.	Gaz kromatografisi nedir	37
3.2.2.1.	Gaz kromatografisinde ön analiz ayırımları	37
3.2.2.2.	Gaz kromatografisinde yer değiştirme ayırımları	38
3.2.2.3.	Gaz kromatografisinde elüsyon ayırımları	38
3.2.3.	Elüsyon kromatografisinde temel tanımlar	39
3.2.4.	Kütle spektrometrisi nedir	43
3.2.4.1.	İyonlaştırma ve fragmentasyon	43
3.2.5.	İyonlaştırma metotları	44
3.2.5.1.	Elektron çarpışma iyonlaştırması	44
3.2.5.2.	Foton iyonlaştırma	45
3.2.5.3.	İyon bombardıman iyonlaştırması	45
3.2.5.4.	Kıvılcım kaynak iyonlaştırma	45
3.2.5.5.	Nötral parçacıklarla bombardıman iyonlaştırması	45
3.2.5.6.	Elektrosprey iyonlaştırma	46
3.2.5.7.	Termal iyonlaştırma	46
3.2.5.8.	Alan iyonlaştırma	46
3.2.5.9.	Kimyasal iyonlaştırma	47
3.2.5.10.	Termosprey iyonlaştırma	47
3.2.6.	İyonların kütle analizörü ile ayırımları	48
3.2.6.1.	Manyetik analizör	48
3.2.6.2.	Quadrupole analizör	49
3.3.	Numunelerdeki EDC ve PhAC analitlerin izolasyonu	50



3.4.	EDC ve PhAC bileşiklerin derivatizasyonu	51
<b>4.</b>	<b>DENEYSEL KISIM-1</b>	<b>55</b>
4.1.	Safra Asitlerinin Kimyasal Yapıları ve Analizleri	57
4.1.1.	Safra asitlerinin kimyasal yapıları	57
4.1.2.	Safra asitlerinin analizleri	59
4.1.3.	Safra asitlerinin katı faz ekstraksiyonları	66
4.1.4.	Safra asitlerinin trimetilsilil ve oksim türevlerine dönüştürülmesi	67
4.1.5.	Safra asitlerinin trimetilsilil/oksim türevlerinin kromatografik ayrımı	68
4.1.6.	Safra asitlerinin fragmentasyon yapısı	68
4.1.7.	Optimum derivatizasyon şartlarının belirlenmesi	68
4.1.8.	Farklı konsantrasyonlarda derivatize edilen asitlerin tayininde tekrarlanabilirlikleri	70
4.1.9.	Safra asitlerinin geri kazanım değerleri	72
4.1.10.	Metot optimizasyonu yapılan safra asitlerinin gerçek numunelerde tayini	73
<b>5.</b>	<b>DENEYSEL KISIM-2</b>	<b>76</b>
5.1.	EDC ve PhAC Bileşiklerinin Seçimi	77
5.2.	EDC ve PhAC bileşiklerinin kromatografik ve kütle spektrum özelliklerinin optimizasyonu	79
5.2.1.	EDC ve PhAC bileşiklerinin alıkonma zamanları ve kütle fragmentlerinin belirlenmesi	79
5.2.2.	Optimum derivatizasyon reaktifinin belirlenmesi	82
5.2.3.	Optimum reaksiyon şartlarının belirlenmesi	84

5.2.4.	Analitlerin atıksulardaki ekstraksiyon verimleri	86
5.2.5.	Katı faz ekstraksiyonunda sorbent seçimi	89
5.2.6.	Analit bileşiklerin atıksulardaki LOD ve LOQ değerleri	92
5.2.7.	Analit bileşiklerin çamur-toprak matrislerinde tayini	95
5.2.7.1.	Analitlerin çamur-toprak matrislerinde geri kazanım ve LOD değerleri	95
5.3.	PhAC ve EDC analitlerinin gerçek numunelerde tayini	97
5.3.1.	Numune alma işlemi	97
5.3.2.	Analizi yapılan PhAc ve EDC bileşiklerinin atıksu – sediment numunelerindeki varlıkları	99
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>103</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>114</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Trakya bölgesinde bulunan sanayi işletmelerinin illere göre dağılımı	3
1.2. Trakya bölgesinde işletmelerin sektörel dağılımı	4
2.1. Safra asitlerinin metabolik sentezi	20
3.1. Gaz kromatografisinde temel ayırım teknikleri	39
3.2. Kromatografik pik özellikleri	40
4.1. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (A)	62
4.2. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (B)	63
4.3. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (C)	64
5.1. PhAC bileşiklerinin derivatizasyonunda reaktif etkinlikleri (A)	83
PhAC bileşiklerinin derivatizasyonunda reaktif etkinlikleri (B)	84
5.2. Aseton-metanol elüsyonu	88
5.3. Aseton-etil asetat elüsyonu	88
5.4. Etil asetat-metanol elüsyonu	89
5.5. Etil asetat-asetonitril elüsyonu	89
5.6. Zemin sinyali varlığında analit kromatogramı	93
5.7. Zemin sinyali olmadan elde edilen analit kromatogramı	93
5.8. Atıksu – sediment numune alma noktaları	97
5.9. Atıksularda analizlenen analitlerinin tayin frekansları	99
5.10. Atıksularda tayin edilen analitlerin toplam konsantrasyonları	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
1.1. Tekirdağ ilindeki sanayi tesislerinin sektörlere ve ilçelere göre dağılımı	5
2.1. İlaç sınıfları ve örnekleri	7
2.2. EDC ve PhAC bileşiklerinin içme sularındaki rapor edilmiş konsantrasyonları	14
2.3. Hormon yapılı steroidlerin fizikokimyasal özellikleri	16
2.4. Farklı ülkelerdeki atıksu arıtma çıkışı analizlerinde saptanan steroidler ve konsantrasyonları	17
2.5. Bazı yüzey sularında saptanan hormon yapılı steroid konsantrasyonları	18
2.6. Steroidlerin GC-MS kaynaklı tayini ve dedeksiyon limitleri	24
2.7. Ftalik asit esterlerinin farklı matrislerdeki kantitatif tayinleri	25
3.1. EDC ve PhAC bileşiklerinin tayin metotları	54
4.1. Oksim ve silil türevlerine dönüştürülen safra asitlerinin fragment iyon ve kütleleri	61
4.2. Safra asitlerinin farklı derivatizasyon şartlarında elde edilen pik integrasyon birimleri ve %RSD değerleri	69
4.3. Farklı konsantrasyonlarda derivatize edilen safra asitlerinin tayin tekrarlanabilirlikleri	71
4.4. SPE ekstraksiyonunda elde edilen geri kazanım değerleri	72
4.5. Gerçek atık su numunelerinde tayin edilen safra asitleri ve konsantrasyonları	74
5.1. Analit olarak seçilen EDC ve PhAC bileşiklerinin kimyasal yapıları	79
5.2. EDC ve PhAC bileşiklerinin oksim-silil türevlerinin tutunma zamanı (tR) ve kütle fragment yapıları	81
5.3. Farklı reaksiyon sistemlerinde ve parametrelerde reaksiyon etkinliği	85

5.4.	Analitlerin farklı sorbent tipleri ve farklı konsantrasyonlarda atıksulardan ekstraksiyon verimleri	91
5.6.	Analit bileşiklerin enstrümental ve metot LOD-LOQ değerleri	94
5.7.	Sedimentlerde tayin edilen analitlerin ekstraksiyon verimleri ve LOD değerleri	96
5.8.	Atıksu numunelerinde aylık bazda tayin edilen analitler ve konsantrasyonları	100
5.9.	Analitlerin sedimentlerdeki varlıkları ve konsantrasyonları	102

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSTFA:	N-O-Bis-(trimetil silil) trifloroasetamid
EDC:	Endokrin bozucu bileşik
GC-MS:	Gaz kromatografi – kütle spektrometri
HMDS:	Hekzametil disilazan
MSTFA:	N-metil-N-(trimetil silil) trifloro asetamid
PhAC:	Farmasötik aktif bileşik
SPE:	Katı faz ekstraksiyonu
TFAA:	Trifloro asetik asit
MAE:	Mikrodalga eşlenik ekstraksiyon
RSD:	Relatif standart sapma
MARS:	Mikrodalga hızlandırılmış reaksiyon sistemi
TMS:	Trimetil silil
SIM:	Seçilmiş iyon görüntüleme

## 1.GİRİŞ

Son elli yıllık süre içinde endokrin sistemi bozucu maddeler (EDC's) toplum açısından daha fazla önem kazanmıştır. Bilimsel araştırmaların artan sayısı doğal ve insan yapımı sentetik kimyasalların hem doğal hayattaki canlıların hem de insan endokrin sistemi ile etkileşebileceğini göstermektedir. 1990 yılında Kanada Çevre Koruma Sözleşmesi (CEPA, 1999) EDC'yi canlı organizmada canlının homeostazını, üremesini, gelişimini ve davranışını sağlayan hormonların sentezini, salgılanmasını, iletimini, reseptörlere bağlanmasını, işlevini veya atılımını engelleyen maddeler olarak tanımlamıştır. Yapılarına ve kullanımına göre EDC'ler: sentetik ve doğal hormonlar, organoklorlanmış pestisidler (OPC's), poliklorlanmış bifeniller (PCB's), dioksinler, alkilfenoller, polietoksilatlar ve metabolitleri, ftalatlar, bisfenol-A gibi bazı özel bileşikler şeklinde sınıflandırılabilir (Ghijsen ve Hoogenboezem, 2002). Bazı EDC'lerin varlığı ile canlılardaki gelişim değişimlerini araştıran birçok çalışma ve bulgu olmasına rağmen bu kimyasalların insan üzerindeki etkileri büyük ölçüde kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte koruyucu bakış açısından ele alındığında bu eksik bulguların EDC'lerin uzun zaman diliminde insan sağlığı üzerinde bozucu etki göstermeyecekleri anlamına gelmez. Bu nedenle Kanada (Hewitt ve Servos, 2001), Amerika Birleşik Devletleri (Parrott v.d, 2001) ve Avrupa Birliği (Janex v.d, 2003) gibi ülkelerin hepsi bu konuda bilimsel ve yönetim anlamında çalışmalar başlatmıştır.

Çalışmamızda Trakya Bölgesinde ilk defa sentetik ilaçların (Farmasötik Aktif Maddeler), hormon yapılı steroidlerin ve ftalatların (Endokrin Bozucu Maddeler) sanayi-evsel atıksulardaki varlıklarını belirlenmiş olup ayrıca büyük bölümü evsel atık kaynaklı olan safra asitlerinin tayinine yönelik metod geliştirilmiş ve gerçek numunelere uygulanmıştır.

## 1.1. Trakya Bölgesinde Sanayi Yapısı

Bölgede yetiştirilen tarımsal ürünlerin işlendiği küçük işletmelerle başlayan sanayileşme 1980'li yıllardan sonra hızla gelişmeye başlamıştır. Bölgede başta tekstil ve gıda sektörü olmak üzere çeşitli büyüklüklerde 992 adet sanayi işletmesi bulunmaktadır. Bölge ekonomisi gün geçtikçe tarıma dayalı bir yapıdan, sanayi ve hizmet sektörü ağırlıklı bir yapıya dönüşmüştür (Kubaş A., v.d 2003).

Türkiye, kurulu kapasite açısından tekstil sektöründe Dünyada sayılı ülkeler arasına girmiştir. Türkiye'deki tekstil işletmelerinin önemli bir bölümü Tekirdağ ili sınırları içerisinde faaliyet göstermektedir. Trakya'da faaliyet gösteren çeşitli kapasitelerdeki 342 adet tekstil ve konfeksiyon işletmesinin 239'u Tekirdağ, 11'i Edirne ve 19'u ise Kırklareli ilinde bulunmaktadır.

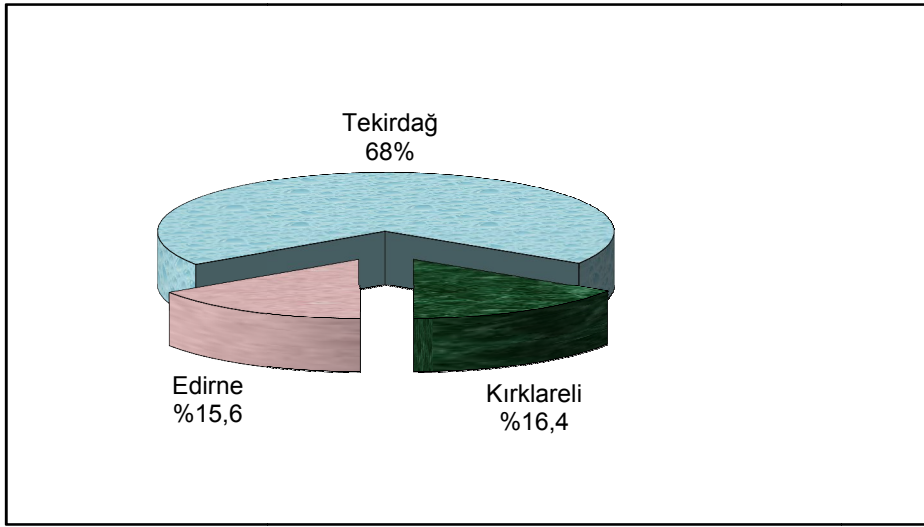
### 1.1.1. Trakya bölgesinde sanayi işletmeleri

Trakya bölgesinde bulunan sanayi işletmelerinin illere göre dağılımı Şekil 1.1.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi, bölgedeki sanayi işletmelerinin % 68'i Tekirdağ ilinde bulunduğundan, il bölgenin sanayi merkezi haline gelmiştir. İkinci sırada % 16,4'lük bir oran ile Kırklareli ili ve üçüncü sırada % 15,6 ile Edirne ili gelmektedir.

Tekirdağ ilinde sanayileşmenin yoğun olduğu ilçeler; Çorlu, Çerkezköy, Muratlı ilçeleridir. Ayrıca Saray, Hayrabolu ve Malkara ilçelerinde de sanayi işletmelerinin sayısında önemli artışlar olmuştur. Kırklareli ilinde sanayileşmenin yoğun olarak bulunduğu ilçeler Lüleburgaz, Merkez ve Pınarhisar'dır. Edirne ilindeki sanayi daha çok gıda sektörü ile ilgili olup, Merkez, Uzunköprü ve Keşan ilçelerinde yoğunlaşmıştır.

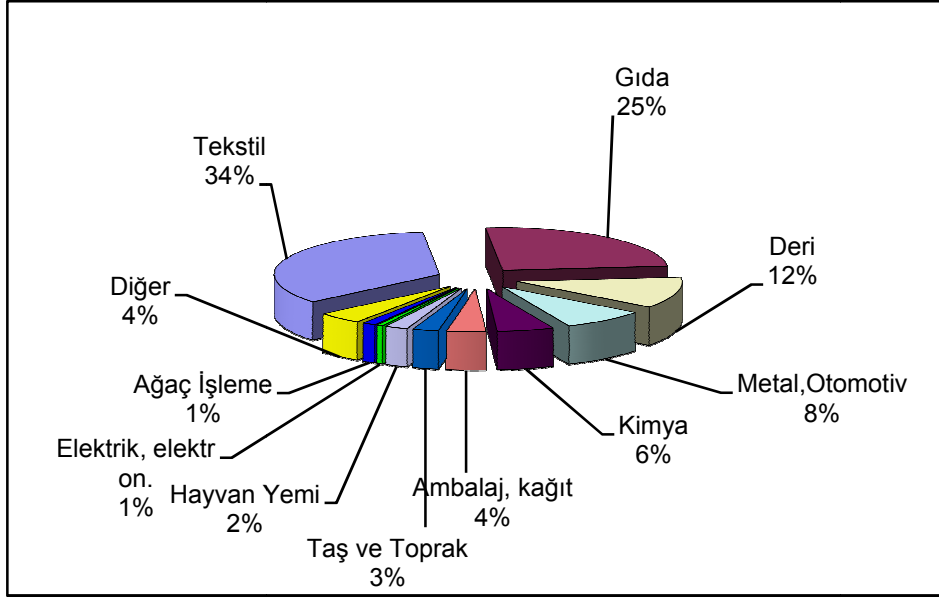


Trakya bölgesindeki sanayi işletmelerinin %34'ü tekstil ve konfeksiyon konusunda faaliyet göstermektedir. Tekstil konusunda faaliyet gösteren işletmelerin önemli bir bölümü boya, kasar ve apre yaparken, bir bölümü de konfeksiyon atölyeleri şeklindedir. Ayrıca iplik üretimi ve gipür-brode konusunda faaliyet gösteren işletmeler de bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Trakya bölgesinde bulunan sanayi işletmelerinin illere göre oranı

Bölgede deri sektöründe faaliyet gösteren işletmelerin oranı %12, metal-otomotiv %8, kimya ve ilaç sanayi %6, ambalaj ve kağıt %4, taş ve toprak sanayi %3, elektrik-elektronik ve ağaç işleme %1'er ve %4 diğer sektörlerdir (Şeki 1.2.).



Şekil 1.2. Trakya bölgesinde işletmelerin sektörel dağılımı

### 1.1.2. Tekirdağ ilinde bulunan sanayi işletmeleri

Tekirdağ ili Çorlu, Çerkezköy ve Muratlı ilçelerinde yoğunlaşan sanayi işletmelerinin önemli bir bölümü tekstil ve konfeksiyon konusunda faaliyet göstermektedir.

Çerkezköy Organize Sanayi Bölgesinin 1973 yılında kurulması ile birlikte Çerkezköy ve Çorlu ilçelerinde hızla gelişmeye başlayan sanayileşme, 1980'li yıllardan sonra Muratlı ilçesini de kapsayacak şekilde genişlemiştir. Bölgede bulunan sanayi işletmelerinin önemli bir bölümü Çorlu, Çerkezköy ve Muratlı ilçelerindedir.

Tekirdağ ilinde çeşitli sektörlerde faaliyet gösteren toplam 678 adet sanayi işletmesi bulunmaktadır. Bu işletmelerin sektörlere ve ilçelere göre dağılımı Çizelge 1.1.'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.1.Tekirdağ ilindeki sanayi tesislerinin sektörlere ve ilçelere göre dağılımı

Sektör	Merkez	Çerkezköy	Çorlu	Hayrabolu	Malkara	Marmara	Muratlı	Saray	Şarköy	Toplam
Tekstil	-	88	178	2	1	3	8	4	-	284
Deri	-	3	110	-	-	2	-	-	-	115
Gıda	8	3	25	12	14	2	8	8	9	89
Metal,Oto	-	18	35	2	-	1	1	1	-	58
Kimya	1	36	13	-	-	-	1	2	-	53
Ambalaj, kağıt	2	9	17	-	-	-	4	-	-	32
Toprak	11	1	1	-	1	-	-	-	-	14
Hayvan yemi	1	-	2	1	2	1	2	-	-	9
Ağaç		1	2	2	-	-	-	-	-	5
Elektrik,	-	2	-	-	-	-	1	-	-	3
Diğer	-	4	8	-	-	-	2	1	1	16
Toplam	23	165	391	19	18	9	27	16	10	678

## 2. FARMASÖTİK AKTİF MADDELERİN (PhAC) VE ENDOKRİN BOZUCU MADDELERİN (EDC) ÇEVREDEKİ VARLIKLARI

Farmasötik aktif maddelerin (PhAC's) varlığının çevresel anlamda önemi 1900'lü yıllarda ortaya çıkmıştır.

Avrupa ve Kuzey Amerika'da 1900'lü yıllarda yapılan çalışmalarda PhAC'lerin yüzey ve yer altı sularındaki varlığı ispatlanmıştır, (H.Sorensen v.d, 1998) ile (Daughton ve Ternes, 1999) PhAC'lerin çevredeki varlığı, etkileri kaynakları ve çevreye yayılma yollarını ayrıntılı bir biçimde inceleyerek bilimsel çevrelerin daha fazla dikkatini çekmişlerdir. Daughton ve Ternes'in çalışmalarında özetlendiği haliyle çoğu insan kaynaklı olmak üzere toplam 118 PhAC bileşiğinin yüzey-yer altı suları ve çamurda varlığını belirlemiştir. Günümüze kadar yapılan bütün çalışmalar PhAC'lerin kontrolsüz şekilde çevreye atılması ve sürekli kullanımıyla birincil derecede kirletici özellik taşıyan maddeler olduğu konusunda hemfikirdir.

Amerika Birleşik Devletlerinde 1999-2000 yılları arasında ülke genelinde çeşitli sularda veteriner ve insan kullanımına sahip ilaçların tayini yapılmıştır (Kolpin v.d, 2002). Bu çalışmalarda antibiyotiklerin ve reçeteli kullanıma sahip ilaçların tayini aynı sıklıkta gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında reçetesiz ilaçlar daha fazla kullanıldığı için daha yüksek frekansta tayin edilmiştir.

Farmasötik aktif maddeler genellikle insanlardaki hastalıkların tanısı, tedavisi, önlenmesi ve azaltılması, insan vücudunun gelişiminin hızlandırılması gibi kullanımlar sonucunda çevreye yayılmaktadır. Ayrıca veteriner uygulamaları da dünya genelinde bu maddelerin kaynağını oluşturabilmektedir. Daughton ve Ternes yaptıkları çalışmalarda her yıl dünya genelinde kullanılan pestisidlerin yarısı kadar miktarda PhAC'in çevreye salındığını tahmin etmektedir. PhAC'lar çevreye insanların bu kimyasalları kullanmasıyla veya zirai alanlarda kullanımları sonucunda akıntılara karışması sonucu geçebilir. Genel anlamda PhAC'lar muhtemel etkilerinin ve kaynaklarının tayini için

terepatik etkilerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bunun yanında birçok çalışmada bu maddeler yapılarına ve fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu günümüze kadar PhAC'lerin çevresel konsantrasyonlardaki (ng/L den  $\mu\text{g/L}$ ' ye kadar) varlıklarının insan sağlığı üzerindeki etkileri hala çok az bilinmektedir. Günümüzde artan sayıda araştırmalar PhAC'lerin hayvan ve insan sağlığı üzerindeki negatif etkilerini saptamıştır. Örnek olarak (Cleuvers, 2003) on adet belirlenmiş ilacın ve bunların kombinasyonlarının ekotoksikolojik etkilerini ortaya koymuştur. Bunun gibi (Pomati v.d, 2006) çevresel düzeyde konsantrasyonlara sahip PhAC karışımlarının insan hücre fonksiyonları üzerinde pozitif inhibitör etkilerini kanıtlamıştır. Amerikan Su İşleri Birliği Araştırma Vakfı 2001 yılında içme sularındaki PhAC'lar üzerine çalıştay düzenlemiştir. Aşağıdaki Çizelge 2.1'de ilaç sınıfları ve bunlara örnek olan bileşikler yer almaktadır.

Çizelge 2.1. İlaç sınıfları ve örnekleri

İLAC SİNIFI	ÖRNEK
<b>Antibiyotikler;</b>	
- $\beta$ - Laktamlar	Amoksisilin, Ampisilin, Benzilpenisilin
- Makrolidler	Eritromisin, Azitromisin, Tilosin
- Sülfonamidler	Sülfametazin, Sülfadiazin, Sülfaguanisin
- Tetrasiklinler	Oksitetrasiklin, Tetrasiklin
<b>Analjezik ve ateş düşürücüler</b>	Kodein, İbuprofen, Asetaminofen, Diklofenak, Fenoprofen
<b>Lipid regülatörleri</b>	Bezafibrat, Klofibratik asit, Fenofibratik asit
<b>Psikiyatrik ilaçlar</b>	Diazepam
<b><math>\beta</math>-blokerler</b>	Metoprolol, Propanolol, Timolol, Solatol
<b>X-ışını görüntüleme ilaçları</b>	İopromid, İopamidol, Diatrizoat
<b>Anti-depresanlar</b>	Fluoksetin
<b>Hormonlar</b>	Estradiol, Estrone, Estriol, Ethynilestradiol
<b>Antiepileptik ilaçlar</b>	Karbamazepin

## **2.1. Farmasötik Aktif Bileşiklerin Atık Sular Yüzey Suları Yer Altı ve İçme Sularındaki Varlıkları**

Farmasötik aktif bileşiklerin (PhAC) sulardaki varlıkları Avusturya, Brezilya, Kanada, Hırvatistan, İngiltere, Almanya, Yunanistan, İtalya, İspanya, Hollanda ve A.B.D'yi kapsayan çalışmalarda birçok sınıftaki 80'den fazla bileşik  $\mu\text{g/L}$  mertebesine kadar konsantrasyonlarda tayin edilmiştir.

### **2.1.1. Analjezik ve anti enflamatuvar ilaçlar**

Bu bileşik sınıfındaki ilaçlar genellikle ağrı kesici olarak kullanılan ilaçlardır. Analjezik ilaçlar aynı zamanda ateş düşürücü özelliklere sahiptirler. Ağrı kesici ilaçların reçete ile satılmasının yanında çok daha büyük bir kısmı reçetesiz olarak satılmakta ve kullanılmaktadır.

Asetaminofen (parasetamol) ve asetil salisilik asit en yaygın olarak satılan ilaçlardır. Asetil salisilik asidin Almanya'da yıllık satış miktarının 500 ton ve üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Ternes, 2001). Diklofenak ve ibuprofen gibi diğer analjeziklerin satış miktarının ise sırasıyla 75 ton/yıl ve 180 ton/yıl olduğu öngörülmekte ve su kütlelerindeki varlıkları daha önemli olmaktadır. Asetil salisilik asidin Alman arıtma tesisleri çıkışındaki ortalama konsantrasyonu  $0.22 \mu\text{g/L}$  olarak ölçülmüşken aynı çalışmada yüzey sularındaki konsantrasyonu tayin sınırının altında kalmıştır (Ternes, 1988a).

Asetil salisilik asit çevrede deaçilasyon yoluyla daha aktif olan salisilik asit ve diğer iki metabolit olan orto-hidroksihippurik asit ve hidrokillenmiş şekli olan gentisik aside dönüşmektedir. (Ternes v.d,1998b) salisilik asit, orto-hidroksihippurik asit ve gentisik asidin arıtma girişlerindeki varlıklarını sırasıyla 54, 6.8 ve  $4.6 \mu\text{g/L}$ 'ye kadar olan konsantrasyonlarda tayin etmiştir. Bu çalışmada Ternes aynı zamanda bu bileşiklerin etkili bir biçimde sudan uzaklaştırıldığını ve sadece salisilik asidin çok

düşük konsantrasyonlarda arıtma çıkışında tayin edildiğini belirtmiştir. Yunanistan ve İspanyada yapılan çalışmalarda salisilik asit için 13 µg/L konsantrasyona kadar olan değerler tespit edilmiştir. Bu durum salisilik asidin mutlak olarak asetil salisilik asit metaboliti olmadığını göstermektedir ve deri ve yiyecek koruyucusu olarak kullanımından gelen miktarların da olduğunu göstermektedir (Farre v.d, 2001).

Yıllık olarak Almanya'da satış miktarı 75 ton olarak öngörülen diklofenak Berlin eyaleti atıksular ve yüzey sularında yapılan uzun dönemli çalışmalarda su döngüsü içindeki en kalıcı PhAC olarak belirlenmiştir. Atıksu arıtma giriş ve çıkışlarındaki diklofenak konsantrasyonu sırasıyla 3.02 ve 2.51 µg/L olarak tayin edilmiştir. Diklofenak aktif maddesinin arıtma sistemindeki bertaraf edilme oranının sadece % 17 olması onun kalıcı bir bileşik olduğunu kanıtlamaktadır, bu olgu ( Stumpf v.d, 1996 ve Zwiener v.d, 2000) tarafından da rapor edilmesi yanında bu oran Ternes (1998) tarafından % 69 olarak rapor edilmiştir. Diklofenak aynı zamanda Avusturya, Brezilya, Almanya, Yunanistan, İspanya, İsviçre ve A.B.D'de arıtma çıkışları ve yüzey sularında tayin edilmiştir. Buser v.d, (1998b), diklofenak'ın doğal göl sularında fotolitik indirgenmeden kaynaklandığını düşündüğü önemli oranlarda eliminasyonunu gözlemlemiştir. Laboratuarda aynı tür sularla yapılan deneylerde güneş ışınları varlığında diklofenak'ın önemli ölçüde elimine olduğu kanıtlanmıştır.

Avusturya, Brezilya, Almanya ve İsviçre'de yapılan çalışmalarda İbuprofen'in arıtma çıkışları ve nehirlerde saptanan konsantrasyonu diklofenak ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak tespit edilmiştir. İspanya'da Farre v.d (2001) arıtma çıkışlarında 1.5, 0.87 ve 85 µg/L gibi değerler saptamıştır. Aynı çalışmada ibuprofen'in yüzey sularındaki konsantrasyonu 2.7 µg/L gibi göreceli yüksek olarak tespit edilmiştir. İbuprofen insan vücudunda hidroksi ve karboksi ibuprofen ve karboksi-hidrotropik asit gibi temel metabolitlerine indirgenmektedir (Stumpf v.d, 1996). Bu metabolitler işlenmemiş atık sularda ibuprofenle birlikte bulunur. Stumpf atıksu arıtma işleminde ibuprofen ve özellikle de karboksi-ibuprofenin önemli ölçüde elimine olduğunu arıtma çıkışındaki 0.92 µg/L hidroksi-ibuprofen konsantrasyonunun girişteki konsantrasyona neredeyse eşit olduğunu rapor etmiştir. Buna paralel olarak 12 adet yüzey suyunda hidroksi-ibuprofenin ortalama 0.34 µg/L konsantrasyon ile ibuprofen ve karboksi-ibuprofen'den (0.02 µg/L) daha yüksek değerlerde tayin edilmiştir.

### 2.1.2. Antiepileptik ilaçlar

Antiepileptik bir ilaç aktifi olan karbamazepin yerleşim birimlerinin atıksu arıtma tesislerinin çıkışlarında sıkça tayin edilen (Ternes, 1998; Ferrari v.d, 2003; Furlong v.d, 2003; Metcalfe v.d,2003 ve Brun v.d, 2006) bir PhAC'dir. Yüzey sularında rapor edilen varlığı tipik olarak 50-1,000 ng/L arasındadır (Herberer v.d, 2002). Bu bileşiğin çevredeki yaygın varlığı atıksu arıtma tesislerindeki oldukça düşük uzaklaştırma veriminden (sadece % 7) kaynaklanmaktadır (Ferrari v.d, 2003). Buna ek olarak karbamazepin ve metabolitlerinin atıksu arıtılmasında etkin bir biçimde uzaklaştırılmadığı rapor edilmiştir (Miao v.d, 2005), bu nedenle bu kirleticilerin yüzey sularında sıklıkla tayin edilmesi olasıdır.

Farklı ülkelerdeki şehir arıtma tesisleri giriş ve çıkışlarında yapılan çalışmalarda bu bileşiğin arıtma işlemlerinde iyi elimine edilemediğini göstermektedir (% 10'dan daha az). Bu nedenle karbamazepin Almanya'da yüzey sularında 1075 ng/L konsantrasyonlara kadar tayin edilmiştir. Bir başka antiepileptik ilaç olan primidone buna benzer numunelerde 635 ng/L'ye kadar olan konsantrasyonlarda tayin edilmiştir. Farklı alanlardaki çalışmalarda karbamazepin ve primidon ilaç aktif bileşiklerinin yüzey sularındaki 1.1 µg/L'ye kadar ulaşan konsantrasyonları (karbamazepin) bu iki bileşiğin atıksu arıtma tesislerindeki düşük yüzdeleri eliminsayonunu da doğrulamaktadır (Ternes v.d, 2001).

### 2.1.3. Beta blokerler

Metoprolol, propranolol, betaksolol, bisoprolol ve nadolol aktif ilaç bileşiklerinin atıksu arıtma çıkışlarındaki varlıkları µg/L düzeylerine kadar rapor edilmiştir (Hirsch v.d, 1999; Ternes, 1998; Sedlak ve Pinkston, 2001). Bunların arasından sadece



metoprolol, propranolol ve bisoprolol'in yüzey sularındaki varlıkları göreceli düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir.

#### 2.1.4. Kan lipid regülatörleri

Klofibrat, bezafibrat ve gemfibrozil gibi kan lipid regülatörleri gelişmiş ülkelerde yaygın kullanıma sahiptir.

Kan lipid regülatör metaboliti olan klofibrat asidin İsviçre ve Alman su kütlelerindeki varlığı ( Heberer ve Stan, 1996; Buser v.d, 1998) tarafından tayin edilmiştir. Klofibrat, etofyllin klofibrat ve etofibrat gibi kan lipid regülatörlerinin aktif metaboliti olup arıtma giriş-çıkış numunelerindeki varlığı 1970'lerde A.B.D'de (Garrison v.d, 1976; Hignite ve Azarnoff, 1977) rapor edilmiştir.

Almanya'da Berlin yakınlarında sulama suyu olarak arıtılmış su kullanılan zirai bölgeye yakın bölgelerdeki yer altı sularında yapılan analizlerde klofibrat asit konsantrasyonu 4µg/L'ye kadar tayin edilmiştir (Heberer v.d, 1997). Bu bölgenin uzağında yer alan alanlardaki 125 metre derinliğe sahip 4. ve 5. derece yer altı sularında dahi analitin varlığı tayin edilmiştir. Berlin şehir içme sularındaki varlığı 270 ng/L'ye kadar tayin edilen bileşiğin yerleşim alanları yakınında bulunan İsviçre göllerindeki ve Kuzey Denizindeki varlığı düşük ng/L konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Bezafibrat, gemfibrozil ve fenofibrat metaboliti olan fenofibrat asit de atıksular ve yüzey sularında µg/L mertebesinde tayin edilmiştir, bunun yanında bezafibrat ve gemfibrozil yer altı sularında sırasıyla 190 ve 340 ng/L konsantrasyonlarda tayin edilmiştir (Ternes, 1998; Stumpf v.d, 1999).

Oksijenli ve oksijensiz ortamda çalışan aktif çamur arıtma ve biyolojik arıtma tesislerinde sentetik atık su kullanılarak yapılan biyoindirgenme deneylerinde klofibrat asit varlığının kalıcı olduğu ortaya konmuştur (Zwiener v.d, 2000). Sorbent olarak farklı toprak türlerinin kullanıldığı deneylerde klofibrat asidin kayda değer bir sorpsiyonu tespit edilememiştir, analitin tutunmadan kolondan aktığı görülmüştür. Bu gözlem başka çalışmalarda filtrasyon uygulaması ile tutunmadan geçen analitin toprağın alt

katmanlarında tutunmadan su kaynaklarına ulaşması bulgusunu doğrulamaktadır (Heberer v.d, 2001b). Buna karşın bezafibrat'ın filtrasyon işlemi ile sudan kolayca uzaklaştırıldığı belirlenmiştir (Heberer v.d, 2001b).

### 2.1.5. Doğum kontrol ilaçları

Östrojenik ilaçlar insanlarda östrojen yerine kullanılan tedavilerde ağızdan ve gebelik önleyici amaçla, ayrıca yarışmalarda atletlerin performansını artırma amacıyla, veterinerlik alanında ise büyümeyi artırıcı amaçla kullanım bulmaktadırlar. Bir östrojen olan 17 $\beta$ -estradiol atıksu arıtma çıkışlarında yüzey sularında hatta içme sularında dahi düşük ng/L konsantrasyonlarda tayin edilmiştir (Herberer v.d, 2002).

Mestranol ve 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) gibi sentetik steroidler genellikle gebelik önleyici olarak kullanılırlar fakat yüksek farmakolojik potansiyellerinden dolayı yıllık satış miktarları göreceli olarak düşüktür. Ternes v.d, 1999b, Almanya'da EE2'nin reçeteli satış miktarının 50 kg/yıl olduğunu öngörmüştür. Buna bağlı olarak EE2 ve mestranol gibi östrojen yapılı steroid hormonlarının atıksu arıtma çıkışlarındaki varlığının düşük ng/L düzeylerinde olduğu varsayılmaktadır. Bu varsayım Brezilya, Kanada, Almanya, İngiltere ve İtalya'da yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla doğrulanmıştır. Mestranol varlığı düşük bir frekansta atıksu arıtma çıkışlarında 4 ng/L'ye kadar olan konsantrasyonlarda tayin edilmiştir (Spengler v.d, 1999). Alman arıtma çıkışı örneklerinde EE2 için ortalama 17 ng/L (n=20) konsantrasyon değerleri saptanmıştır. Saptanan bu değerler başka hiçbir çalışma ile örtüşmemekle beraber Almanya, İngiltere, Hollanda ve A.B.D'de yapılan çalışmalarda EE2'nin atıksu arıtma çıkışlarındaki ortalama değerleri 1-3 ng/L arasında değişmekte veya tayin sınırları altında kalmaktadır. Kanada atıksu arıtma çıkışlarındaki EE2'nin ortalama konsantrasyonu 9 ng/L olarak tespit edilmiştir (Ternes v.d, 1999a). İtalya'da altı adet aktif çamur arıtma tesisinden alınan numunelerde EE2 için atıksu giriş konsantrasyonu ortalama değeri 3 ng/L ve atıksu çıkış ortalama değeri 0,45  $\mu$ g/L olarak belirlenmiştir (Baronti v.d, 2000). Bu çalışmaya paralel olarak EE2'nin aktif çamur arıtma

prosesindeki eliminasyon oranı % 85 olarak tayin edilmiş ve verimli olarak nitelendirilmiştir. Buna karşın seyreltik aktif çamur içeren aerobik ortamda yapılan çalışmalarda önemli miktarda eliminasyon gözlenmemiştir (Ternes, 1999b). Aynı deneyde mestranol'ün hızlı biçimde elimine olduğu gözlenmiştir. Östrojenlerin insan kaynaklı çevreye salınım formlarının konjuge tuzları şeklinde olduğu varsayımından yola çıkarak bu bileşiklerin foseptik sularında dekonjugasyona uğradıklarını öne süren Boronti'ye karşın Almanya'da yapılan çalışmalarda toplam östrojen miktarı içindeki konjuge östrojen oranının % 50'ye kadar ulaştığını ortaya koymuştur (Adler v.d, 2001).

Yapılan bağımsız çalışmalarda genel olarak EE2'nin konsantrasyonu maksimum 4.3 ng/L olarak tayin edilmiştir ve bu çalışmalardaki numunelerin çoğunda belirlenen konsantrasyon tayin sınırının altında kalmıştır. EE2 için tayin edilen bu düşük konsantrasyonlara rağmen bu seviyeler canlı organizmalar üzerindeki etkisi açısından önem taşımaktadır çünkü yapılan çalışmalarda sadece 0.1 ng/L konsantrasyonda EE2'ye maruz bırakılan erkek balıkların bazı türlerinde “dişilik” özelliklerinde artış saptanmıştır.

Östrojenik steroidlerin fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı bu bileşiklerin sedimentlerde adsorplanması ve böylece yer altı su kütlelerinde görülmemesi beklenir fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda Alman içme sularında EE2 analizleri pozitif sonuçlar vermiştir, EE2'nin HPLC-MS ile yapılan analizlerinde yer altı ve arıtılmış içme sularındaki konsantrasyonu 2.4 ng/L'ye kadar tayin edilmiştir (Adler v.d, 2001). Bu bulgu GC-MS/MS veya HPLC-MS/MS gibi daha gelişkin teknikle yapılan analizlerle doğrulanmamıştır ve HPLC-MS'e göre daha hassas olan Elektron impakt MS'e sahip GC ile doğrulanmalıdır.

Sonuç olarak EDC ve PhAC'lerin çevrede tayin edilen konsantrasyonları ng/L ile düşük µg/L aralığındadır. Bu bileşiklerin atıksulardaki varlığı atıksuların tekrar içme ve kullanım potansiyeli taşınması nedeniyle önemlidir. Bu bileşiklerin çevredeki varlıkları ülke ve bölgeye özel olmasından dolayı bölgesel kaynaklardaki varlıklarının tespiti önemlidir. Yukarıda sözü edilen bileşiklerin konsantrasyonlarının tayini atıksu arıtma tesislerinin belirli konsantrasyondaki spesifik bileşiklere yönelik çalışması ve insan sağlığına olası olumsuz etkilerinin kontrolü açısından ayrıca önem taşımaktadır.

Atıksular ve yüzey suları ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında bu iki bileşik sınıfının içme sularındaki varlığı hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Çizelge 2.2.'de verilen

bilgilere dayanarak EDC ve PhAC'ların içme sularındaki konsantrasyonları ng/L düzeyindedir.

Çizelge 2.2. EDC ve PhAC bileşiklerinin içme sularındaki rapor edilmiş konsantrasyonları.

Bileşik	Konsantrasyon (ng/L)	Frekans (%)	Lokasyon	Referanslar
17 $\beta$ -Estradiol	0.2-0.6	50	Almanya	Kuch ve Balchmitter,2001
17 $\alpha$ -Ethinil estradiol	0.2-4	Rapor yok	Hollanda	Block ve Vosten, 2000
Estron	0.4	40	Almanya	Kuch ve Balchmitter,2001
Nonyl phenol	25-90	100	İspanya	Petrovic v.d,2003
Bisphenol-A	0.5-2.0	100	Almanya	Kuch ve Balchmitter,2001
Diklofenak	1-6	Rapor yok	Almanya	Stumpf v.d, 1996
Gemfibrozil	0.7-2.4	Rapor yok	Kanada	Servos v.d, 2007
Klofibrinik asit	3.2-5.3	Rapor yok	İtalya	Zuccato v.d, 2000
Naprosken	8.7	Rapor yok	Kanada	Servos v.d, 2004
Karbamazepin	10-30	Rapor yok	A.B.D	Stackelberg v.d, 2004

Çizelge 2.2.'de gösterildiği gibi Avrupa'da rapor edilen içme sularındaki hormon kalıntılarının çoğu düşük ng/L seviyelerindedir.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda atıksu arıtma işlemlerinde etkin bir biçimde uzaklaştırılmayan klofibrinik asit daha fazla ilgi çekmiştir. Karbamazepini (Stackelberg v.d 2004) neredeyse %100'e varan sıklıkta ve 258 ng/L konsantrasyonlara kadar tayin etmiştir. Bu çalışma gurubu asetaminofen, dihidonifedipin v.b maddeleri analiz edilen suların % 50'den fazlasında tayin etmiştir. Bu bilgiler ışığında günlük içme suları ile alınması muhtemel miktarlar günlük terapi dozajları ile alınan miktarın nerdeyse üç katına ulaşmaktadır. Pomati v.d, (2006) tarafından yapılan son çalışmalar normal çevre konsantrasyonu ng/L mertebesinde bulunan farmasötiklerin insan embriyo hücresi üzerinde fizyolojik ve morfolojik etkilere yol açabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle güncel su arıtma teknolojileri EDC ve PhAC'ları düşük konsantrasyonlara kadar uzaklaştırma yetkinliği açısından tekrar değerlendirilmelidir.

## 2.2. EDC Olarak Hormon Yapılı Steroidler ve Çevredeki Varlıkları

Steroid hormonları kolesterolden sentezlenen ve ortak biçimde siklopentanan-o-perhidrofenantren halka yapılı biyoaktif bileşiklerdir. Doğal steroidler adrenal korteks, testis, yumurtalık ve plasentadan salgılanan progesteron, glukokortikoid, mineralokortikoidler, androjen ve östrojen yapılarını içeren bileşiklerdir (Raven ve Johnson, 1999). Östrojen yapılı estradiol, estron ve estriol bileşikler, yenilenme yeteneğine sahip göğüs, deri ve beyin gibi dokuların yaşamı için önemlidir ve genel olarak dişilik hormonu kabul edilmektedir. Progesteron gibi progesteronlar östrojenlerin dengeleyicisi olarak kabul edilmektedir. Testosteron, dehidroepiandesteron ve androstendion deri kemik ve kas gibi dokuların üretiminde önemli rol oynar. Kortizol gibi glukokortikoidler adrenal bezlerinden heyecan, uyarılma, hastalık durumlarında salgılanan kimyasallardır.

Bütün steroid hormonlar plazma membranını geçerek ilgili hücre reseptörlerine bağlanarak işlev görürler. Doğal steroid hormonlarının yanında gebelik önleyici ethynilestradiol (EE2) ve mestranol (MeEE2) gibi sentetik steroidler de vardır. İnsanlarda olduğu gibi hayvanlar da hormon steroidlerini salgılar ve bu steroidler foseptik kanalları yoluyla sulara ve toprağa karışabilir. Bu steroidler yüzey suları ve atık arıtma çıkışlarında tayin edilmiştir (Ternes v.d, 1999). Çevreye salınan bu steroidler normal fonksiyon gösteren endokrin sistemlere etki edebilir ve bu canlıların üremesini ve gelişimini değiştirebilir (Jobling v.d, 1998). Endokrin bozucu özellikleri nedeniyle su kütelleri açısından 17 $\beta$ -estradiol (E2), estron (E1), estriol (E3), 17 $\alpha$ -ethynilestradiol (EE2) ve mestranol (MeEE2) gibi östrojen yapılı ve gebelik önleyici bileşikler önemlidir Şekil1. İngilterde bazı nehirlerde yapılan çalışmalarda erkek alabalıkların plazma vitellojeninde artış ve aynı zamanda cinsiyet değişimi gözlenmesi östrojen bileşiklerin varlıklarına dayandırılmıştır (Desbrow v.d, 1998 / Jobling v.d, 1998). Estradiol'un 1ng/L gibi düşük konsantrasyonları dahi erkek alabalıkların vitellojenin seviyesini artırmaktadır (Hansen v.d, 1998). Steroid hormonların çevredeki varlığı sadece hayvanları değil aynı zamanda bitkileri de etkileyebilir. Arıtma tesislerinin çıkışından alınan ve steroid içeren sular ile sulanan Alfalfa bitkisinde fitooöstrojenlerin arttığı gözlemlenmiştir (Shore v.d, 1995).

### 2.2.1. Hormon yapılı steroidlerin fizikokimyasal özellikleri

Estradiol, estron ve estriol olarak adlandırılan doğal östrojenlerin çözünürlükleri yaklaşık 13 mg/L'dir. Sentetik östrojenik steroidler daha düşük çözünürlüğe sahiptirler, EE2 için 4.8 mg/L ve mestranol için 0.3 mg/L. Bütün steroidlerin buhar basınçları oldukça düşük olup  $2.3 \times 10^{-10}$  ila  $6.7 \times 10^{-15}$  mm Hg aralığında yer almaktadır. Hidrofob özelliğin bir göstergesi olan log Kow değerleri doğal steroidlerde E3 için 2.81 E1 için 3.43 ve E2 için 3.94 olarak tespit edilmiştir. Sentetik steroidler daha büyük log Kow değerlerine sahiptir, EE2 için 4.15 ve mestranol için 4.67'dir. Bu steroidlerin fizikokimyasal özelliklerinden yola çıkarak düşük uçuculuğa sahip hidrofobik bileşikler olduğu söylenebilir, Çizelge 2.3.'de sözkonusu steroidlerin fizikokimyasal özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.3. Hormon yapılı steroidlerin fizikokimyasal özellikleri.

Bileşik	MW(g)	Suda çözünürlük mg/L 20°C'de	Buhar basıncı mm Hg	log K <sub>ow</sub>
Estron (E1)	270.4	13	$2.3 \times 10^{-10}$	3.43
17β- Estradiol (E2)	272.4	13	$2.3 \times 10^{-10}$	3.94
Estriol (E3)	288.4	13	$6.7 \times 10^{-10}$	2.81
17α-Ethynylestradiol (EE2)	296.4	4.8	$4.5 \times 10^{-10}$	4.15
Mestranol (MeEE2)	310.4	0.3	$7.5 \times 10^{-10}$	4.67

## 2.2.2. Steroidlerin çevredeki konsantrasyonları

### 2.2.2.1. Steroidlerin atık sulardaki konsantrasyonları

Östrojenik steroidlerin varlıkları farklı ülkelerdeki atık arıtma tesislerinin giriş ve çıkışlarında tayin edilmiştir. İtalya'da aktif çamur kullanan altı adet atık su arıtma tesisinde E1, E2,E3 ve EE2 östrojenlerinin ortalama konsantrasyonları sırasıyla 80, 12, 52 ve 3 ng/L olarak tayin edilmiştir (Baronti v.d, 2000). Bunun yanında E3'ün 80 ng/L gibi çok yüksek konsantrasyonlarda tayin ve rapor edilmesi oldukça nadir bir durumdur. Brezilyada arıtılmamış atık sulardaki E2, E1 ve EE2 konsantrasyonları sırasıyla 21, 40 ve 6 ng/L olarak tayin edilmiştir (Ternes v.d, 1999). Hollanda kaynaklı çalışmada östrojenik steroidlerin konsantrasyonları E2 için LOD 48 ng/L, E1 için 11-140 ng/L ,EE2 için 0.2-8.8ng/L aralığında tespit edilmiştir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar aşağıdaki Çizelge 2.4.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Farklı ülkelerdeki atıksu arıtma çıkışı analizlerinde saptanan steroidler ve konsantrasyonları.

Yer	Numune tarihi	Numune sayısı	Estrone E1	17-β Estradiol E2	Estriol E3	Ethynylestradiol EE2	Ref. <sup>b</sup> 1
			Konsantrasyon (ng/L) <sup>a</sup>				
İtalya	10/99-03/00	30	2.5-82.1 (9.3)	0.44-3.3 (1)	0.43-18 (1.3)	<LOD-1.7 (0.45)	2
Hollanda	10/97-12/97	6	0.4-478 (4.5)	0.1-5 (LOD) <sup>c</sup>	-	0.2-7.5 (LOD)	3
Almanya	11/97-	16	<LOD-70 (9)	<LOD-3 (LOD)	-	<LOD-15 (1)	3
Kanada	11/97-	10	<LOD-48 (3)	<LOD-64 (LOD)	-	LOD-42 (9)	4
İngiltere	05/95-01/96	21	1,4-76 (9.9)	2.7-48 (6.9)	-	<LOD-7 (LOD)	5
Japonya	07/98-03/99	27	-	3.2-55 (14) <sup>d</sup>	-	-	
		27	-	<LOD-43 (13) <sup>e</sup>	-	-	
		27	-	0.3-30 (14) <sup>f</sup>	-	-	
A.B.D	05/97-10/97	5	-	0.477-3.66 (0.9)	-	<LOD-0.759 (0.248)	6
Almanya	06/00-10/00	16	0,1-18 (1,5)	0.15-5.2 (0.4)	-	0.1-8.9 (0,7)	7

<sup>a</sup>Konsantrasyon aralığı(ortalama değer)b: Referanslar: (1) Baronti v.d, 2000., (2) Belfroid v.d, 1999., (3) Ternes v.d, 1999., (4) Desbrow v.d, 1998., (5) Nasu v.d, 2000., (6) Snyder v.d, 1999., (7) Kuch ve Ballschmitter, 2001.

<sup>b</sup>Tayin sınırı, <sup>c</sup>Tayin sınırı, <sup>d</sup>Yaz dönemi örnekleri, <sup>e</sup>Son bahar dönemi örnekleri, <sup>f</sup>Kış dönemi örnekleri

### 2.2.2.2. Steroidlerin yüzey sularındaki konsantrasyonları

Steroidlerin yüzey sularındaki varlıkları hakkında yayınlanan birkaç rapor vardır. Japonyadaki 109 nehirde yapılan çalışmalarda yaz döneminde 256 örnek içinden 222 tanesinde estradiol (E2) ortalama 2.1 ng/L konsantrasyonda tayin edilmiştir. Son bahar döneminde 261 numuneden 189 tanesinde ortalama 1.8 ng/L konsantrasyonla tayin edilmiştir. Hollanda kıyı suları ve tatlı su kaynaklarında yapılan analizlerde estron (E1) 11 numuneden 7'sinde ortalama 0.3 ng/L konsantrasyonda tayin edilmiştir. Estradiol ve ethynylestradiol sadece 3 ve 4 numunede tayin sınırı mertebesindeki konsantrasyonlarda tayin edilmiştir. Almanya'da yapılan çalışmalar Hollanda'daki sonuçlarla örtüşmektedir buna ek olarak Almanya'nın güneyinde içme suları örneklerinde 0.4, 0.7 ve 0.35 ng/L konsantrasyonlarda östrojenik steroidlere rastlanmıştır. İtalya'da Tiber nehrinde yapılan analizlerde E1, E2 ve E3 sırasıyla 1.5, 0.11 ve 0.33 ng/L konsantrasyonda tayin edilmiştir. Çizelge 2.5.'de yüzey sularında saptanan hormon steroidleri verilmiştir.

Çizelge 2.5. Bazı yüzey sularında saptanan hormon yapıları steroid konsantrasyonları

Yer	Numune Türü	Estron E1	17-β Estradiol E2	Estriol E3	Ethynylestradiol EE2	Ref. <sup>b</sup>
		Konsantrasyon (ng/L) <sup>a</sup>				
Japonya	109 ana nehir	-	LOD-27 (2.1)	-	-	1
		-	LOD-24 (1.8)	-	-	
Almanya	nehir suyu	0.1-4.0 (0.4)	0.15-3.6 (0.3)	-	0.1-5.1 (0.4)	2
İtalya	Tiber nehri su	1.5-	0.11-	0,33-	0.04	3
Hollanda	kıyı ve yüzey suyu	0.1-3.4 (0.3)	0.3-5.5 (0.3)	-	0.1-4.3 (0.1)	4

<sup>a</sup> Konsantrasyon aralığı ve (ortalama değer)

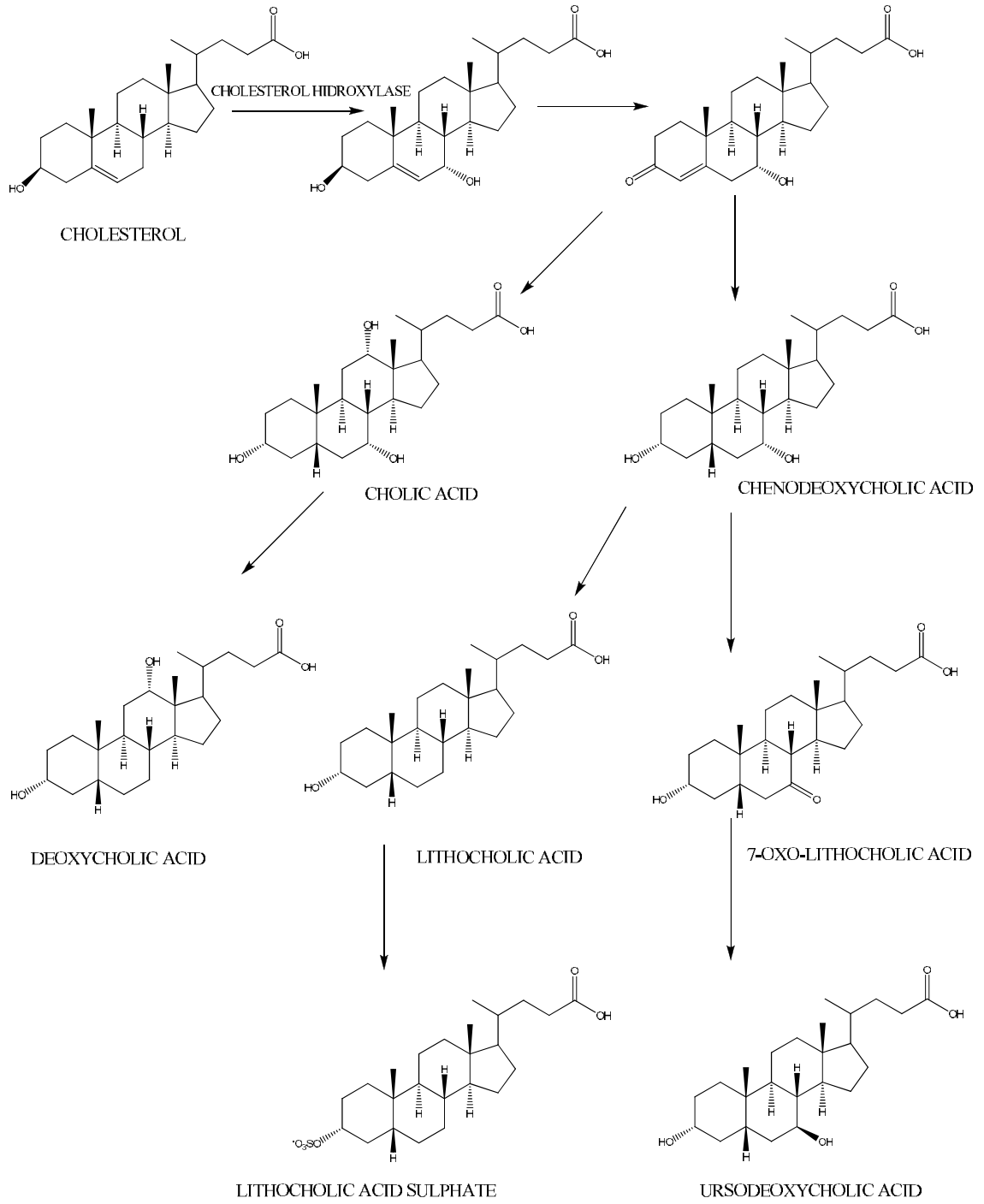
<sup>b</sup> Referanslar: (1) Tabata v.d, 2001., (2) Kuch ve Balcschmitter 2001., (3) Baronti v.d, 2000., (4) Belfroid v.d, 2001.



## 2.3. Steroid Yapılar Olarak Safra Asitleri ve Çevredeki Varlıkları

### 2.3.1. Safra asitlerinin biyosentezi ve yapısal özellikleri

Safra asitleri hepatositlerde kolesterolden sentezlenen bileşiklerdir. Cholic asit ve chenodeoxycholic asit bir çok enzimatik basamağın dahil olduğu proselerde iki ana yol ile karaciğerde sentezlenir. Bu birincil safra asitleri salgılanmadan önce glisin ve taurin aminoasitleri ile konjugasyona uğrar. İnce bağırsakta bu asitlerin tamamı konjuge formda bulunurken bir kısmı kalın bağırsakta hidroliz yoluyla serbest asit formlarına dönüşmektedir. Bu serbest birincil asitler bu aşamadan sonra bakteriyel 7 $\alpha$ -dehidroksilaz enzimlerinin etkisiyle ikincil safra asitleri olan deoxycholate ve lithocholat'a dönüşmektedir. Bağırsak bakterilerinin oksidaz ve redüktaz enzimleri ve karaciğer enzimleri bu asitlerin C-3, C-7 ve C-12 steroidal pozisyonlarına saldırabilir ve böylece safra asitlerinin daha kompleks bileşikler olmasına yol açabilir. İnsan safra suyu yaklaşık % 90 oranında cholic, chenodeoxycholic ve deoxycholic asitten oluşur (2:2:1), ursodeoxy ve lithocholic asit geri kalan % 10'luk kısmı oluşturur. Safra kesesinde bulunan asitler 24 karbonlu serbest hallerinden ziyade 2:1 oranında olan glisin ve taurin amidleri halinde bulunurlar. Ayrıca belli bir orana kadar sülfonik ve glukoronik asit halinde bulunabilirler. Bütün doğal safra asitlerinin steroid iskeletinde yer alan A ve B halkaları arasındaki C-5 pozisyonu ve D halkasına bağlı pentanoik asit yan zinciri *cis* konfigürasyondadır. Safra asitleri arasındaki farklılık hidroksil gruplarının pozisyonları, sayısı ve stereokimyası tarafından belirlenir. Moelküllerin konveks hidrofobik üst kısım, konkav hidrofilik  $\alpha$ -kısım ve negtaif yüklü yan zincir etkisi ile safra asitleri deterjan özellikleri gösteren yapılardır. Sıcaklık ve pH'a bağlı olarak safra asitleri 0.6 – 10 mM konsantrasyonda miseller oluşturur bu özellik safra asitlerinin fizyolojik fonksiyonlarını önemli kılar. Aşağıda verilen Şekil 2.1.'de kolesterolden sentezlenen primer safra asitleri (cholic ve chenodeoxycolic asit), sekonder safra asitleri (deoxycholic, lithocholic asit) ve devam eden tersiyer safra asitleri stereo yapıları ile gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Safra asitlerinin metabolik sentezi

Safra asitlerinin safra bezinden günlük salgılanma döngüsü 6 – 12 sayı arasındadır bu salgılanan miktarın yaklaşık % 20'si bağırsaklarda kalmaktadır. Bağırsaklarda anaerobik bakteriler tarafından metabolize olan asitler temel olarak kalın bağırsakta iki ana reaksiyon ve bunu takip eden minör reaksiyonlar ile metabolize olur.

Kalın bağırsakta ilk aşamada dekonjugasyon yolu ile az iyonlaşan ve lipofilik olan serbest safra asitleri oluşur, ikinci ana reaksiyonda ise cholic ve chenodeoxycolic asitten 7- $\alpha$  dehidroksilasyon ile deoxycholic ve lithocholic asitler oluşur. Deoxycholic asit bağırsak tarafından kısmen absorplanır ve enterohepatik döngü (karaciğer döngüsü) ile karaciğere gelir burada konjuge olur ve safra kesesinde toplanır. Lithocholic asit düşük çözünürlüğe sahiptir ve bağırsakta absorpsiyonu düşüktür. Bağırsaklarda meydana gelen diğer ikincil reaksiyonlarla ursodeoxycholic asit gibi tersiyer safra asitleri oluşur ve absorplanmayan safra asitleri boşaltım yoluyla çevreye salınır.

### 2.3.2. Safra asitlerinin insan ve çevreye etkisi

Safra asitlerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri in-vitro ( organizma içi) olarak yapılan incelemelerle ortaya konmuştur. Safra asitlerinin kolorektal kanser oluşumunda rol aldığı onlarca yıl evvel öne sürülmüş olup bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. Bağırsak içi bakteriler tarafından oluşturulan sekonder safra asitlerinin mikrobiyal testlerde eş-mutajenik (co-mutagenic) ve bazı hayvanlarda mutajen olduğu öne sürülmüştür. Safra asitleri ve bakteriyal metabolitlerinin kanserojen ve mutajen proseslerle ilişkilendirilmiş olmasının yanında direkt genotoksik mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Salmonella testlerinde ilk direkt genotoksik etki J. Watbe ve Bernstein (1985) tarafından ortaya konmuştur. 1980 – 2003 yılları arasında yapılan en az 15 çalışmada safra asitlerinin DNA yapısında bozulmalar meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Mekanizma muhtemel olarak endirekt olup DNA bozulmalarına neden olan oksidatif stresin artması ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasıdır (Bernstein v.d, 2005).

Safra asitlerinin çevre numunelerinde analizi bu bileşiklerin evsel atık suların yüzey ve yer altı sularına karışmasıyla kirlenme derecesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (Evershed v.d, 1997). Bunun yanında atıksu arıtma tesislerindeki valıkları saptanmış ve kirlilik derecesi hakkında bilgi veren biyo-işaretleyiciler olarak kullanım olanakları değerlendirilmiştir (Grimalt v.d, 1990).

### **2.3.3. Steroidlerin kimyasal analizleri**

#### **2.3.3.1. Steroidlerin ekstraksiyonu**

Kimyasal analiz sıvı veya gaz kromatografi kullanımından bağımsız olarak ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarını gerektirir. Sıvı örnekler genellikle filtrasyon ile katı partiküllerin ayrılmasından sonra SPE ile işlem görür. Strata-X, Strata C-18 ve en yaygın olarak hidrofilik-lipofilik co-polimer balanslı Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşları steroidlerin izolasyonuna en uygun olanlardır. Katı matrikslerin ekstraksiyonunda genellikle çözücü varlığında ultrasonik banyolar veya basınçlı sıvı ekstraksiyonları uygulanır.

Toprak, çamur veya sediment ekstraksiyonlarından sonra saflaştırma mutlaka gereklidir. Hajkova ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada Oasis HLB, Envi-CARB ve Supelclean LC-18 kullanarak % 10 asetonitril-su ekstraktında ve farklı çözücüler varlığında ekstraksiyon gerçekleştirdiler. Belirlenen şartlar altında Envi-CARB ile tayin başarısız olmuştur buna karşın Oasis HLB ile asetonitril-amonyumhidroksit 95:5 (h/h) karışımında yüksek geri kazanım ve tekrarlanabilirlik değerleri elde edilmiştir. Bunun dışında birkaç çalışmada silika jel ile doldurulan kolonlar saflaştırma için kullanılmıştır.

#### **2.3.3.2. Steroidlerin GC-MS analizleri**

GC-MS tekniği yüksek ayırım gücü ve tanımlama özellikleri sağlayan bir metottur. Hidroksil ve karbonil gruplarının türevlendirilmesi (derivatizasyon) analitlerin daha iyi kromatografik ayrımı, azalan dipol-dipol etkileşimlerinden dolayı polaritelerinin azalması ve artan termal kararlılık ve uçuculuk nedeniyle önerilen bir yöntemdir. Daha uygun kütle fragment ürünleri verdiği için sililleme en yaygın kullanılan türevlendirme tekniğidir. Fakat yapılan son çalışmalar bazı sililleme

reaktiflerinin yan ürünlere neden olduğunu ortaya koymuştur (ethynylestradiol gibi). Ethynyl grubunun kopmasından dolayı tayin sınırının yükselmesi olgusu türevlendirme reaksiyonunda kullanılan reaktiflere, sıcaklığa ve çözücülere bağlıdır.

### 2.3.3.3. Steroidlerin LC-MS ve LC-MS<sup>2</sup> analizleri

LC-MS teknikleri kompleks çevre örneklerinde steroidlerin güvenilir biçimde tayini için düşük hassasiyet taşıdığından dolayı nadiren rapor edilmiştir. Lopez de Alda ve arkadaşları (2001) sediment içerisinde östrojenlerin tayini için LC-DAD ve LC-ESI-MS tekniklerini karşılaştırmıştır. LC-DAD tekniğinde östrojen ve progesteronlar için LOD değerleri sırasıyla 2 ng/L ve 1 ng/L olarak tespit edilmiştir. LC-ESI-MS tekniği için 0.05-1 ng/L ve 0.04 ng/L LOD değerleri elde edilmiştir. LC-MS<sup>2</sup> tekniği karmaşık matrislerin analizlenmesinde seçiciliğinden ve pozitif hatayı önlediğinden dolayı en gelişkin tekniktir. GC teknikleri ile karşılaştırıldığında LC teknikleri analizden önce türevlendirme yapılmaması analitik hataların azaltılması açısından avantajlıdır. LOD değerleri açısından karşılaştırıldığında GC-MS tekniği LC-MS<sup>2</sup> tekniğine göre daha düşük hassasiyet göstermesine rağmen diğer LC teknikleri ile kolayca karşılaştırılabilir. Higashi ve Shimada safra asitleri, sülfolanmış ve glukoron konjuge olmuş steroidlerin dışındaki steroidlerin API (Atmosferik basınç iyonizasyonu) tekniğinde düşük iyonizasyon verimlerine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır ve bu problemin önlenmesi için moleküllere yüksek proton ve elektron affinitesine sahip grupların bağlanmasını önermişlerdir. Çizelge 2.6.'de steroidlerin GC-MS'e dayalı analitik tayin metodları ve elde edilen tayin sınırları verilmiştir.

Çizelge 2.6. Steroidlerin GC-MS kaynaklı tayini ve dedeksiyon limitleri

Tayin Sistemi	Derivatizasyon	Ekstraksiyon	Matris Tipi	Hedef Analit	LOD
GC-EI-MS	Kurutulmuş ekstrakt + MSTFA: hekzan (1:5) 60°C 120 dk.	PLE, SPE (C-18)	Toprak	E1 17- $\alpha$ -E2 17- $\beta$ -E2	0.05 ng/g
GC-EI-MS	BSTFA + %1 TMCS + Pyr.	SPE (Oasis HLB)	Nehir Suyu	E1 EE2 17- $\beta$ -E2	0.3 ng/L 0.7 ng/L 0.5 ng/L
GC-EI-MS	BSTFA + %1 TMCS + Pyr. Mikrodalga eşlenik deri - vatizasyon. 60 sn, 800 W		Nehir Suyu	E1 17- $\beta$ -E2 E3 EE2 MeEE2	
GC-EI-MS	MSTFA + mekaptolanol + NH <sub>4</sub> I (27:1.7:1 w/w/w) 60°C 30 dk.	Safra sıvılarının hidrolizi + SPE	Balık plazması ve safra sıvısı	E1	0.1-1.5 ng/g
GC-MS-MS	MSTFA 60°C, 30 dk	SPME	Su	E1 E2 EE2 MeEE2	1.0 ng/L 0.7 ng/L 3.0 ng/L 3.0 ng/L
GC-EI-MS	Derivatizasyon yapılmadan	SPE (Oasis HLB)	Sediment	E1 17- $\beta$ -E2 EE2	5.0 ng/g 5.0 ng/g 5.0 ng/g
GC-TOF-MS	Derivatizasyon yapılmadan	SPE (Oasis HLB)	Sediment	E1 17- $\beta$ -E2 EE2	10 ng/g 12 ng/g 1.5 ng/g
GC-GC-TOF-MS	Derivatizasyon yapılmadan	SPE (Oasis HLB)	Sediment	E1 17- $\beta$ -E2 EE2	2.5 ng/g 2.5 ng/g 0.4 ng/g

#### 2.4. EDC Bileşikleri Olarak Ftalatlar ve Çevredeki Varlıkları

Ftalatlar o-ftalik asidin di alikil esterleri yapısına sahip bileşiklerdir. Bu sınıf bileşikler endüstride plastik yapılara esneklik katmak amacıyla geniş kullanm alanları bulmaktadır. Büyük miktarlardaki kullanımları nedeniyle su ve çamur gibi matrikslerde sıkça bulunurlar (R.M. Marce v.d., 2000). En çok kullanılan ftalatlar, dimetil, dietil, di-n-butil, butil benzil, bis(2-etil hekzil) ve di-n-oktil ftalattır. Bis(2-etil hekzil) ftalat toplam ftalat üretimindeki % 25 pay ile en yaygın kullanılan ftalat bileşiğidir. Bazı ftalatlar göğüs kanserine de neden olabilen sentetik östrojenler olarak tanımlanmaktadır (Toppari v.d., 1995). Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı ftalatlara maruz bırakılan memeli organizmaların üreme sistemlerinde ciddi ve geri dönüşü olmayan etkiler meydana geldiğini göstermektedir (Foster v.d.,2001). Çizelge 2.7.'de ftalik asit esterlerinin farklı matrikslerdeki kantitatif tayinlerinde kullanılan metotlar özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. Ftalik asit esterlerinin farklı matrikslerdeki kantitatif tayinleri

Bileşik	Matriks	Ekstraksiyon	Derivatizasyon	Metot	LOD
DEHP	Endüstriyel atıksular	SPE-SDB	yok	LC-APCI-MS	100ng/L
DEHP,DEP DBP	Endüstriyel çamur	Sonikasyon	yok	LC-APCI-MS	15-50ng/L
9 adet PAE	Nehir suyu ve sediment	LLE ve sonikasyon	yok	GC-(EI)-MS	6-12ng/L 125-240ng/kg
DBP,BBP	Atık arıtma çıkışı	SPE-C18	MSTFA	GC-(EI)-MS	Yok
16 adet PAE	Foseptik çamuru	Mekanik	yok	GC-(EI)-MS	10-632ng/L
6 adet PAE	Nehir-deniz suyu	SPME	yok	GC-(EI)-MS	2-27ng/L
DBP-DEHP	Yüzey-içme suları	SPME	yok	GC-(EI)-MS	5-10ng/L

### 3. PhAC VE EDC BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ

Farmasötik aktif bileşiklerin ve onların kalıntılarının analizi temel olarak beş safhadan oluşmaktadır:

- 1-) Numune alma
- 2-) Numune hazırlama
- 3-) Analit izolasyonu
- 4-) Tayin (Enstrümental)
- 5-) Verilerin analizi

Bu safhaların her biri doğru sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir fakat numune alma ve hazırlama işlemleri analitik metodun en kritik safhalarıdır. Analitik işlemde harcanan sürenin % 80'den fazlası bu iki basamakta yer almaktadır. Bu ana safhaların her biri bağlantılıdır ve bir önceki safha bitmeden bir sonraki başlayamaz. Her safhada uygulanan işlemler düzgün ve tekrarlanabilir olmak zorundadır aksi halde analitik prosedürün performansı zayıf olacaktır ve elde edilen sonuçlar arasında tutarsızlık meydana gelecektir.



### 3.1. Numune Hazırlama

Bu safhadaki ana amaç matris içerisinde yer alan analitin analize uygun hale getirilmesidir. Matris etkisi analitin varlığından bağımsız olarak analitin ekstraksiyon verimi, ekstrakte edilen analit miktarı gibi özelliklere etki eden etmen olarak tanımlanabilir. Analitin hangi şartlar altında zenginleştirmeye uygun olduğunu tahmin edebilmek için analitin fiziko-kimyasal özelliklerinin ( $\text{LogK}_{ow}$ ,  $\text{pK}_a$  v.b) bilinmesi gerekir.

Birçok farmasötik, asidik veya bazik fonksiyonel gruplara sahiptir ve iyonlaşma dereceleri asitlik sabitlerine ( $\text{pK}_a$ ) bağlı olup çözeltinin pH'ı ile kontrol edilebilir.

Sülfonamidler  $\text{pK}_{a1}$ ,  $\text{pK}_{a2}$  sabitlerine sahip olup pH 2-3 ve pH 5-8 aralığında işlev görürler. pH 3-5 aralığında bileşik sınıfı genellikle nötral formunda bulunurken daha düşük  $\text{H}^+$  konsantrasyonlarında anyonik formundadır. Anti-ülser ve  $\beta$ -bloker ilaçların çoğu baz özellikleri taşır ve  $\text{pK}_a$  değerleri 7.1-9.7 aralığındadır. Non-steroidal ateş düşürücü ilaçlar ise  $\text{pK}_a$  4.0 – 4.5 aralığında yer alırlar.

Numune hazırlama işleminde geniş yelpazede teknikler uygulanmaktadır fakat hepsinin amacı aynıdır:

- ▶ Potansiyel girişimleri önlemek
- ▶ Analitin konsantrasyonunu artırmak
- ▶ Gerekliyse analiti daha uygun bir forma sokmak
- ▶ Numune matrisindeki değişimlere duyarsız tekrarlanabilir bir metod oluşturmaya yardımcı olmak
- ▶ Daha küçük miktarlarda örnek ve organik çözücü kullanmak
- ▶ Ekstraksiyonda daha yüksek seçicilik sağlamak
- ▶ Otomasyon potansiyelini artırmak

Aşağıda farklı numune hazırlama teknikleri şematik olarak gösterilmektedir.

**KATI NUMUNELER**



Homojenasyon, kurutma



Soxhlet, LLE, PLE, ASE, PSE

MASE, USE, SFE, MSDP, DSPE, HS-SPME

**SIVI NUMUNELER**



filtrasyon, pH ayarlanması



LLE, SPE, SPME, SBSE,

LPME, SLM, MMLLE



SAFLAŞTIRMA



EVAPORASYON



ÇÖZÜCÜ DEĞİŞTİRME



FİNAL ANALİZ (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, CE v.d)

### 3.1.1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)

SPE zaman içinde klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonun (LLE) yerini almıştır ve çevre analizlerinde en yaygın numune hazırlama tekniği olmuştur. SPE tekniği LLE tekniğine göre önemli avantajlar barındırmaktadır, bunlar:

- 1- Yüksek geri kazanım yüzdeleri
- 2- Gelişmiş seçicilik ve tekrarlanabilirlik
- 3- Emülsiyon oluşumunu engelleme
- 4- Kullanılan organik çözücü hacminde azalma
- 5- Zaman tasarrufu ve otomasyon olanakları

Katı faz ekstraksiyonunda analit katı ve sıvı faz arasında dağılım göstermektedir ve bu analit moleküllerinin katı faz'a olan affinitesi numune matriksinden daha büyük olmalıdır. SPE genellikle sıvı numunelerin hazırlanmasında yarı uçucu veya uçucu olmayan analitlerin ekstraksiyonunda kullanılır fakat aynı zamanda organik bir faza alınmış olan katıların ekstraksiyonunda da kullanılabilir. SPE metodu katı numunelerin ekstraksiyonu ile sınırlı değildir ve çevre numunelerinin hemen hepsinde ve özellikle atıksu ekstraksiyonlarında avantajlı biçimde kullanılabilir.

Seçicilik, affinite ve kapasite parametrelerini kontrol ettiğinden dolayı SPE'de sorbent seçimi anahtar rolde öneme sahiptir. Sorbent seçimi büyük oranda analite ve analitin fonksiyonel grupları ile sorbentin etkileşimine bağlıdır. Bunun yanında seçim aynı zamanda numune matriksine ve matriksin sorbent ve analitle olan etkileşimine bağlıdır. Klasik SPE sorbentleri kimyasal bağlı silika (C8 veya C18) ile başlayıp stiren-divinil benzen, immunosorbentler (IS), moleküler baskılanmış sorbentler (MIP) gibi polimer bazlı sorbentlere kadar uzanmaktadır.

Yeterli hidrofobik özelliklere (Log Kow; 1.5 – 4.0) sahip farmasötikler herhangi bir ters faz sorbent (C18, C8, St-DVB) kullanılarak kolayca zenginleştirilebilir. Analit bileşiklerin yeterli hidrofobisiteye ulaşmasını sağlamak için asidik bileşiklerin deprotonasyonu ve bazik bileşiklerin protonasyonu sağlanmalıdır. Bu nedenle bazik analitlere zıt olarak asidik analitlerin pre-konsantrasyonu asidik şartlarda yapılmalıdır.

Su numunelerinden asidik, bazik ve nötral farmasötiklerin ekstraksiyon verimini saptamak için karşılaştırılan farklı sorbentlerle yapılan analizlerde birçok sorbentin nötral bileşiklerin geri kazanım verimlerinin birbirine yakın olduğu saptanmış fakat bezafibrat, ibuprofen, diklofenak ve klofibrin asit için büyük farklar gözlenmiştir (Weigel v.d, 2004). Bu asidik bileşikler için Oasis HLB ile % 80'nin üzerinde geri kazanım verimleri elde edilmiştir, aynı durum yer altı ve yüzey sularından analizlenen sülfonamidler ve tetrasiklinler için geçerlidir (Lindsey v.d, 2001). Diğer bir sorbent olan Strata-X su numunelerinden bileşiklerin izolasyonu için diğer sorbentlerle karşılaştırılmıştır ve sülfonamidlerin, tetrasiklinlerin, florokinolinlerin, penisilin G prokain ve trimethoprim gibi karışım halinde olan bileşikler için en uygun olarak seçilmiştir (Hilton ve Tomas, 2003). Literatürlerde belirtilen analitik metodların çoğunda hedef analitler fiziko-kimyasal özellik bakımından benzer diğer bileşiklerle eşzamanlı analiz edilmektedir ve buna multi-residue (çoklu kalıntı) analizi denmektedir. Bu farklı bileşiklerin eş zamanlı analizi, analiz koşullarının optimizasyonunu gerektirir ve bu bazı durumlarda her bileşik için ideal koşulların kullanılamaması anlamına gelir.

### **3.1.2. Katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME)**

Katı faz mikroekstraksiyonu organik moleküllerin gaz, sıvı ve katı numunelerden izolasyonu ve pre-konsantrasyonunu kapsayan modern bir metottur. Bu metot farklı matris tiplerinde polar-nonpolar bileşikler için kullanılabilir. SPME'nin mekanizması SPE'ye benzer olup ardaki tek fark kullanılan sorbent kütlesidir. SPME metodu şırınga üzerine yerleştirilen polimerik katı faz ile kaplanan silika fiberden oluşmaktadır. Numunenin taşınması, saklanması veya işlenmesi esnasında SPME fiber iğneye tutundurulmuş numuneye daldırılır, proses numune fazı ve SPME arasında denge kurulana kadar devam eder. Gaz kromatografisi kullanılması halinde enjektör içerisinde analit molekülleri fiber üzerinden termal olarak desorplanır. HPLC kullanılması halinde sıvı desorpsiyonu ara bağlantısı kullanılır (Musteata v.d, 2007).

SPME için silika fiber ve GC kapiler kolon gerektiren üç farklı uygulama vardır; ilk ikisi fiber ekstraksiyon modu olup sonuncusu GC kapiler kolon modudur.

1- Headspace (HS-SPME) 2- Direct immersion (DI-SPME) 3- In-tube (ITSPME)

Direct immersion modu en yaygın kullanılan tür olup polimer kaplı silika destekli fiberin doğrudan numuneye daldırılması ile işlem görmektedir.

Atıksulardan sülfonamidlerin ekstraksiyonu için kullanılan SPE prosedürleri ile direct immersion – SPME prosedürlerinin karşılaştırılmasında SPE ile tayin edilemeyen sülfasalazin SPME ile tayin edilmiş ve diğer sülfonamidler için % 75'in üzerinde geri kazanım verimleri elde edilmiştir (Balakrishnan v.d, 2006).

### 3.1.3. Stir bar sorbsiyon ekstraksiyonu (SBSE)

Çözücüsüz olarak kullanılan bu ekstraksiyon tekniği SPME ile aynı prensipte çalışır fakat bu teknikte polimer kaplanmış fiber çubuk yerine ekstraksiyon fazını içeren büyük bir kütle, karıştırıcı bir çubuk üzerine kaplanmaktadır. Teknikte en yaygın kullanılan ekstraksiyon fazı polidimetilsiloksan'dır (PDMS). Bir analitin sulu fazdan ekstraksiyon fazına çekilmesi analitin silikon faz ile sulu faz arasındaki dağılım sabiti ( $K_{PDMS/W}$ ) ile kontrol edilir fakat bu sabit  $K_{ow}$  ile ilişkilendirilmiş olup her iki sabit de kullanılmaktadır. SBSE tekniği sadece  $K_{ow} \geq 2$  olan hidrofobik bileşikler için kullanılabilir ve  $K_{ow} = 5$  olan bileşikler için dahi yüksek zenginleştirme faktörleri elde edilebilir.

Ekstraksiyon işleminden ve termal desorpsiyondan sonra hedef bileşikler analitik sisteme verilebilir. Ekstraktın tamamı sisteme verildiği için çok yüksek hassasiyet sağlanabilir. SPME tekniği ile karşılaştırıldığında desorpsiyon prosesi kullanılan ekstraksiyon fazının daha büyük yüzeye sahip olmasından dolayı daha yavaş olabilir.

### 3.1.4. Membran ekstraksiyonu (ME)

Membran ekstraksiyonu sıvı-sıvı ekstraksiyonun gelişmiş biçimidir. Bu teknikte membran seçici bir filtre olarak işlev görür burada membranın kimyasal yapısı analit transferinin seçimini belirler. Bu tekniğin en önemli uygulaması üç faz (sıvı/organik/sıvı) içeren “supported liquid membrane” ekstraksiyonudur. Burada ince bir organik faz, iki sıvı film arasına yerleştirilen hidrofobik gözenekli polimer membrana iliştilir. Farklı iletim mekanizmaları çalışabilir fakat analit molekülleri difüzyon prosesi ile sıvı membrandan yüksüz olarak geçmelidir.

### 3.1.5. Sıvı faz mikroekstraksiyonu (LPME)

Bu teknik sıvı-sıvı ekstraksiyonun minyatürize edilmiş halidir. Bu teknikte numune fazı (dönör) ve organik faz (akseptör) arasına konulan ince bir film hem iki fazın karışmasını önler hemde klasik LLE ile meydana gelen emülsyon oluşumu ve seçimsiz geçişleri engeller. Tekniğin ana avantajı çok düşük hacimlerde solvent kullanımı, düşük maliyet, yüksek seçicilik ve temiz ekstrakt eldesidir. LPME tekniği ile birçok ilaç sınıfı ekstrakte edilmiştir bunların arasından ateş düşürücüler, ağrı kesiciler, psikoanaleptikler, antihistaminler ve bazı uyuşturuculara özel önem verilmiştir. Bu bileşik sınıflarının çoğu hidrofobik yapıları bazılar olup üç-fazlı LPME ile % 40-90 aralığındaki verimlerle ekstrakte edilmektedir (Quintana v.d, 2004).

### 3.1.6. Süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)

Süper kritik akışkanlar, yoğunlukları sıcaklık ve basınç ile korelasyon gösteren hem sıvı hem de gaz özellikleri taşırlar. Ekstraksiyon amacıyla SFE kullanmanın temel avantajı ucuz olmaları, hızlı ekstraksiyon işlemi ve organik çözücülere göre zararsız olmalarıdır. Süper akışkan solvent olarak CO<sub>2</sub> en yaygın kullanıma sahip olmakla birlikte bunun yanında C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>, n-C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>, NH<sub>3</sub>, CHF<sub>3</sub>, SF<sub>6</sub> ve N<sub>2</sub>O gibi bileşikler de kullanılmaktadır. Karbondioksitin düşük polaritede olmasından dolayı özellikle ilaç sınıflarının çoğu için problem meydana gelebilir, bunu önlemek için metanol ilavesi ile polarite artırılabilir. İkinci önemli sorun ise tekrarlanabilir ekstraksiyon verimi değerlerinin elde edilmesinde problemler yaşanmasıdır.

### 3.1.7. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE)

Kapalı bir sistem içerisinde basınç altında kendi atmosferik kaynama noktalarının üzerindeki sıcaklıklarda hareket eden organik çözücüler daha yüksek çözme gücü, düşük viskozite ve yüksek difüzyon hızlarına sahip olurlar. PLE'nin diğer metodlar üzerinde daha yüksek tekrarlanabilirlik, düşük çözücü hacmi kullanımı, zaman tasarrufu gibi avantajları vardır. Metot toprak ve çevre numunelerinin birçoğuna uygulanabilir, (Stoob v.d, 2006) zirai topraklardan sülfonamid antibiyotiklerin basınçlı sıvı ekstraksiyonu metodunu geliştirmiştir, başka bir çalışmada PLE metodu katı yağ numunelerinden analit izolasyonu için kullanılmıştır.

### **3.1.8. Matriks katı faz dispersiyonu (MSPD)**

MSPD tekniğinde yaklaşık 0.5 g katı veya yarı katı numunenin katı bir destek maddesi ile (silika v.b) öğütülmesi sonucunda organik bağlı faz oluşumu esasına dayanır. Katı destek maddeleri SPE kolonların hazırlanmasında kullanılan materyallerle aynıdır. Öğütme işlemi tamamlandığında materyal numune ile birlikte SPE kolonuna benzer kolona transfer edilir. Bu teknik LLE ve SPE tekniğinde meydana gelen problemlerin birçoğunu engellediği için çeşitli numune matrikslerinde kullanılabilir.

MSPD kolonları farklı polaritedeki birçok bileşiğin izolasyonunu sağlar, kolonun seçiciliği kullanılan sorbent/numune kombinasyonuna bağlıdır. Teknik daha çok hayvan dokuları, sebze ve meyvelerden ilaç izolasyonlarında kullanılmaktadır. Farmasötiklerin bu metot ile izolasyonu sınırlı sayıda literatürde yer almaktadır.

### **3.1.9. Dağılım katı-faz ekstraksiyonu (DSPE)**

Bu teknik MSPD'ye benzerdir, sorbentin doğrudan orijinal numuneye ilavesinden ziyade sulu bir ekstrakta ilave edilir, kullanılan sorbentin daha düşük hacimde olması MSPD'ye göre avantaj sağlamaktadır (Posyniak, 2005). Çevresel anlamda MSPD tekniği ile tavuk dokularında sülfonamid tayini çalışmaları yapılmıştır.

### **3.1.10. Ultrasonik ekstraksiyon (USE)**

Genellikle ilaçların katı numunelerden ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Metotta düşük frekanslı ses dalgaları ile oluşturulan mekanik enerji numune parçalanmasında etki gösterir. Çözücü ilave edilmiş numune ultrasonik bir banyoya daldırılır ve birkaç



dakika için ultrasonik radyasyona maruz bırakılır. Ekstrakte edilen analitler vakum filtrasyonu veya santrifüj düzenekleri kullanılarak matrislerden ayrılır, yüksek verimler elde edebilmek için işlem birkaç defa tekrarlanır. Klasik sıvı ekstraksiyonlarına göre işlemin kısa zamanda tamamlanması avantajlarının yanında ultrasonik enerjinin numune içindeki düzensiz dağılımından kaynaklanan düşük tekrarlanabilirlik metotta engel oluşturmaktadır.

### **3.1.11. Mikrodalga eşlenik çözücü ekstraksiyonu (MASE)**

Metot katı numune – çözücü karışımlarının kapalı sistemlerde basınç ve sıcaklık kontrolü altında mikro dalga enerjisi ile ısıtılmasına dayanır. Bu kapalı ekstraksiyon ve yüksek basınç-sıcaklık şartları ekstraksiyon prosesinin verimini ve performansını Soxhlet metoduna göre önemli derecede artırmaktadır. Sadece polar moleküllerin mikrodalga enerjisini absorplama yeteneği olduğu için polar ve polar-non polar çözücü karışımları kullanılmalıdır, metot termal olarak stabil bileşiklerin ekstraksiyonuna uygundur (Mandal v.d, 2007). MASE toprak, çamur ve bitki materyallerinden farklı sınıfta bileşiklerin izolasyonu için kullanım alanı bulmaktadır.

### **3.2. Sulardaki EDC ve PhAC'ların Analizi İçin Enstrümental Metotlar**

EDC ve PhAC bileşiklerinin çevredeki tayinleri bu bileşiklerin düşük konsantrasyonları ve onların geniş aralıktaki fizikokimyasal özellikleri nedeniyle oldukça zordur. Günümüz analitiksel metodolojisi son on yılda hızlı biçimde ilerlemiştir ve bu konuda dünya genelinde araştırmalar üstlenilmiştir. Sulardaki EDC ve PhAC'ların belirlenmesi ve nicel tayini onların sudan ekstraksiyonunu, kromatografik ayrımlarını ve en son olarak tayinini içerir. Geliştirilen tayin teknikleri teknolojik gelişmişlik,

hassasiyet, güvenilirlik ve maliyet açısından geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. Sularda bulunan EDC ve PhAC'ların litre hacim başına mikrogram mertebesindeki konsantrasyonlarda tayini için genellikle numunedeki matriksten izolasyon ve konsantrasyonu için ekstraksiyon teknikleri uygulanmaktadır.

Ekstraktlardaki hedef analitlerin tayini için birçok enstrümental metot uygulanabilir fakat gaz kromatografi (GC) veya sıvı kromatografi (LC) ile eşlenik olarak kullanılan kütle spektrometri veya tandem kütle spektrometri bu kirleticilerin eser miktardaki tayinleri için en çok kullanılan metotlar haline gelmektedir. LC-MS-MS tekniği polar olan ve termal olarak stabil olmayan EDC ve PhAC'lar için en gelişkin teknik olarak kabul edilmektedir fakat bu yöntem hala çok yüksek maliyetlidir. Sıvı kromatografi ile kıyasla gaz kromatografisi, bileşik sayısındaki kapsam açısından daha zayıf bir teknik olarak görünse de bu teknik birçok laboratuvar için kullanışlı ve hassas bir tayin olanağı sağlar.

Gaz kromatografisi metodunun seçilmesi yanında, bileşiklerin daha az polar ve daha uçucu hale gelmesi için ekstraksiyon işleminden sonra genellikle türevlendirme (derivatizasyon) basamağının uygulanması gerekiyor. EDC ve PhAC'ların GC-MS tekniği ile analizi; örnekleme-ekstraksiyon-derivatizasyon ve en son olarak tanımlama ve kantatif tayini basamaklarını içermektedir.

Numune alma işleminden önce meydana gelebilecek numune kirlenmelerini önlemek için önele temasta bulunan bütün cam gereçler çözücü ile durulanmalı ve fırınlanmalıdır (Snyder v.d,2002). Buna ek olarak bazı araştırmacılar cam donanım yüzeylerinde meydana gelebilecek analit adsorpsiyonları minimize etmek için silanlama amaçlı toluen (Belfroid v.d, 1999) veya diklormetan içinde % 10'luk dimetil dikloro silan içeren çözeltilerle yıkanmasını önemektedir (Hilton ve Thomas, 2003).

### **3.2.1. Gaz kromatografi kütle spektrometri tekniği**

### **3.2.2. Gaz kromatografisi nedir**

Kromatografi bir karışımında bulunan bileşiklerin bir seri dağılım dengesi içersisinde biri geniş yüzeyli sabit faz ve diğeri ilki ile temas halinde olan hareketli fazlar sisteminden oluşan bir sistemde bileşiklerin farklı oranlarda dağılımı ile ayrılmasıdır. Kromatografi sadece analitik ayrımlar ile sınırlı değildir bunun dışında metot saf maddelerin eldesinde, reaksiyon kinetiklerinin incelenmesinde, moleküler düzeydeki yapısal incelemelerde, entalpi ve entropi gibi fizikokimyasal parametrelerin belirlenmesinde de kullanılır.

Ayırımı yapılacak olan karışım gaz, sıvı hatta bazı durumlarda katı olabilir. Numunenin gaz kromatografisi analizi için kolon katı fazı veya hareketli faz ile etkileşmesi ve çalışılan sıcaklıkta yaklaşık 0,1 Torr buhar basıncına sahip olması gerekir. Numune bileşenleri ile iki faz arasındaki bu etkileşim sonucunda numune bileşenleri farklı bölge veya bantlara ayrılır. Numune bileşenlerinin ayırımı üç farklı teknikle gerçekleştirilebilir.

#### **3.2.2.1. Gaz kromatografisinde ön analiz ayrımları**

Sıvı veya gaz karışımı katı kaplanmış yüzeye sahip kolon içersisine beslenir. Karışım kendi kendinin taşıyıcı fazı gibi görev görür. Ayırım bileşenlerin sorpsiyon yeteneklerine göre meydana gelir. Kaplama yüzeyi doygunluğa ulaştığında karışım bileşimi kolon içinde değişime uğramadan ilerler. Tekniğin ilk uygulamalarında kolonu ilk terk eden bileşiklerin konsantrasyonu ölçüldüğünden “ön analiz” adını almıştır. Kolon içinde en az tutulan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve saf olarak elde edilir.

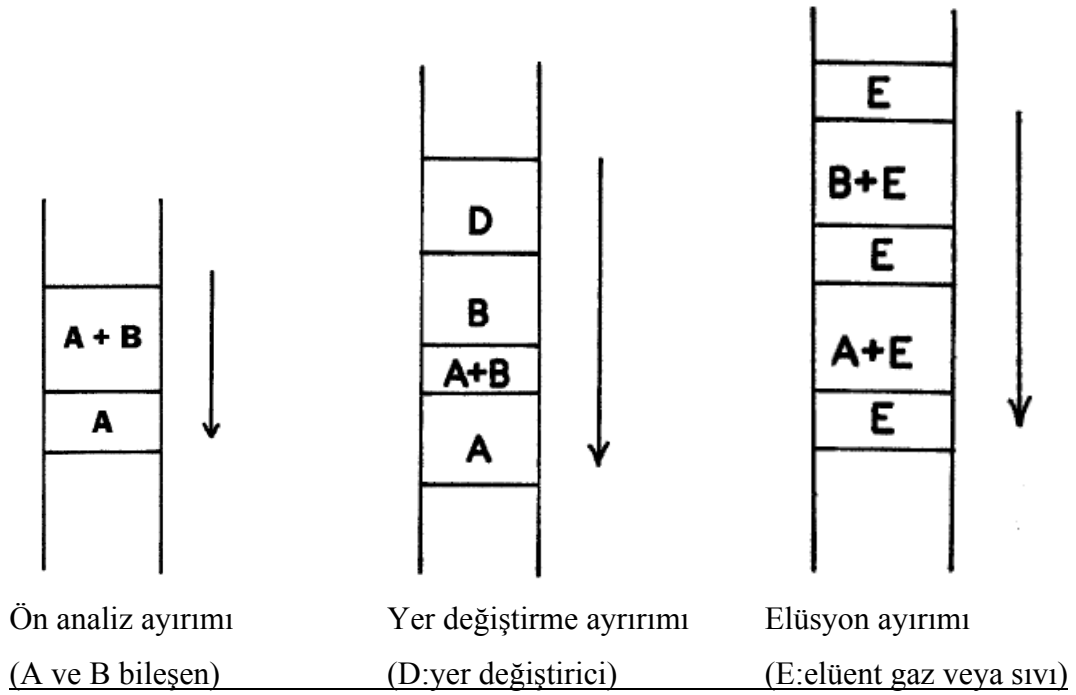
Tekiğin dezavantajlarından biri numunedeki her bir bileşenin konsantrasyon tayininin güç olmasıdır, fakat bileşen sayısı kolyca belirlenebilir.

### **3.2.2.2. Gaz kromatografisinde yer değiştirme ayırımları**

Teknikte yer değiştirme ajanı gaz veya sıvı halde hareketli faz içerisinde bulunur. Teknikte gerekli olan özellik yer değiştirme ajanının numunedeki herhangi bir bileşikten daha fazla sorpsiyona uğramasıdır. Kolondan çıkan saf bileşenler bant şeklinde elde edilir. Analitik dezavantajlardan biri bileşen bantlarının bir birinden saf mobil fazın bantları ile ayrılmamasıdır. Bant yükseklikleri kalitatif tayin, elde edilen bant genişlikleri ise bileşen miktarı ile orantılıdır.

### **3.2.2.3. Gaz kromatografisinde elüsyon ayırımları**

Bu teknikte A ve B bileşenleri kolon boyunca katı fazdaki tutunmaları tarafından belirlenen hızlarda hareket eder, eğer sorpsiyon farkları ya da kolon uzunluğu yeterince büyük ise bileşenler birbirinden tamamen ayrılır. Elüent sıvısının ya da gazının sürekli kolona verilmesi ile kolonda ayrılmış bölge ve bantlar meydana gelir. Tekniğin dezavantajı kuvvetli sorpsiyona uğrayan bileşenleri kolondan elüe etmek için uzun zaman aralıklarının gerekmesidir, fakat bu problem de kolon sıcaklık programları ile çözülebilmektedir. Absisteki pik maksimumunun konumu kalitatif olarak bilgi verirken pik alanları her bir bileşenin miktarını verir. Her üç tekniğin özeti aşağıda Şekil 3.1.'de verilmektedir.



Şekil 3.1. Gaz kromatografisinde temel ayırım teknikleri

### 3.2.3. Elüsyon kromatografisinde temel tanımlar

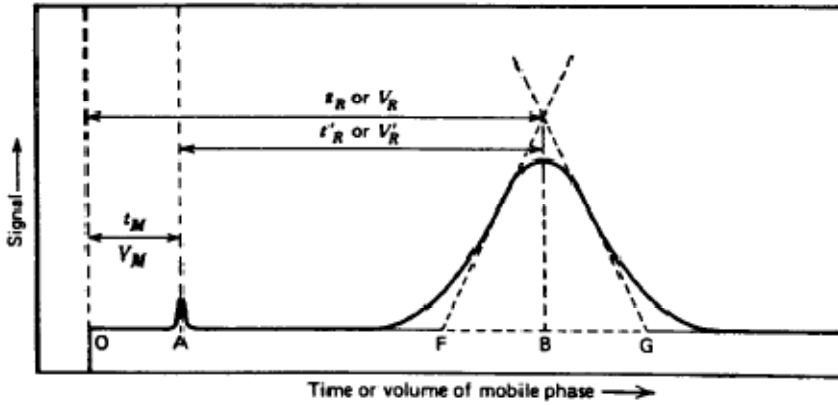
A şeklinde ifade edilen bir analitin kolon içerisinde ne kadar hızlı hareket edeceğini gösteren ifade termodinamik denge sabiti terimi  $K_c$  ile verilmektedir:

$$K_c = [A]_s / [A]_M \quad (\text{Eşitlik 1.})$$

$[A]_s$  ve  $[A]_M$  sırasıyla analitin sabit ve hareketli fazdaki molar konsantrasyonunu ifade etmektedir.  $K_c$  terimi ne kadar büyük olursa sabit fazdaki sorbsiyon o denli büyük ve buna bağlı olarak kolondaki tutunma zamanı uzun olacaktır. Kolon içindeki kütle transferi yeterince hızlı olursa hareketli faz analit moleküllerini kolon içinde sürekli hareket ettirdiği halde denge sabiti ifadesi geçerli olur. Başka bir varsayım da

bileşiklerin kolon içerisinde birbiriyle etkileşmediği yönündedir, eğer bu gerçekleşmezse teorik olarak öngörülen sonuçlardan sapmalar meydana gelecektir.

Bir bileşenin enjeksiyonundan sonra ölçülen kolondan çıkış süresi “tutunma zamanı” olarak tanımlanır. Şekil 3.2’de A bileşenin kolonda tutunması  $V_R$  ile gösterilen “tutunma hacmi” terimi ile ifade edilmektedir.



Şekil 3.2. Gromatografik pik özellikleri

Bu terim enjeksiyon noktasından pik maksimumuna kadar harcanan taşıyıcı gaz hacmini vermektedir. Çözünen bileşenin bu karakteristiği tutunma zamanı  $t_R$  ile de ifade edilebilir:

$$V_R = t_R \times Fc \quad (\text{Eşitlik 2.})$$

Bu eşitlikte  $Fc$ ; kolonun akış hızıdır ve sabit değer olarak kabul edilir, buna bağlı olarak tutunma zamanı, tutunma hacmi ile orantılı olacaktır. Şekil 3.2.’deki küçük öncü pik sabit fazda sorpsiyona uğramayan bir bileşeni ifade etmektedir. Gaz kromatografide bu özellik hava veya metan tarafından gösterilir ve hava piki olarak adlandırılır.  $V_M$  ile gösterilen sembol kolon içi hacminin ölçülmesinde kullanılan ve “ölü hacim” olarak da adlandırılan terimdir.

Aşağıda verilen eşitlik teorik dağılım sabiti  $K_c$  ile tutunma hacmini  $V_M$  ilişkilendirmektedir:

$$V_R = V_M \times K_C V_S \quad (\text{Eşitlik 3.})$$

Kromatografide dağılım sabitini kullanırken bu terimi ikiye ayırmak kullanışlıdır:

$$K_C = k \times \beta \rightarrow \beta = V_M / V_S \quad (\text{Eşitlik 4.ve 5.})$$

$(\beta)$  terimi faz hacim oranı ( $k$ ) ise tutunma faktörüdür ve kolon içerisinde sabit fazda tutunmuş olarak bulunan bileşen miktarının hareketli fazda bulunan bileşen miktarına oranını ifade eder:

$$k = (W_A)_S / (W_A)_M \quad (\text{Eşitlik 6.})$$

Tutunma faktörünün ( $k$ ) büyüklüğü arttıkça sabit fazda bulunan madde miktarı artacaktır ve bu nedenle maddenin kolonda tutunma zamanı da uzayacaktır. Bu değer dağılım sabiti ile ilişkili olup kromatogramdan kolayca elde edilebilir. Eşitlik 4. tekrar düzenlenir ve burada faz hacim oranları Eşitlik 5. ile ifade edilirse:

$k = K_C / \beta = K_C V_S / V_M$  olur ve buradan kromatografik temel eşitlik olan Eşitlik 7. ortaya çıkar:

$$V_R = V_M + K_C V_S \quad (\text{Eşitlik 7.})$$

Kromatografik kolonun etkinliğini ölçmek için pik genişliğinin ölçülmesi gerekir fakat bu büyüklük maddenin tutunma zamanına göreceli olarak bağlıdır ve tutunma zamanı arttıkça pik genişliği de artar. Kromatografik sistemin etkinliğini ölçmek için “tabaka sayısı” terimi olan ( $N$ ) kullanılmaktadır:

$$N = \frac{V_M}{V_S} = 16 \text{ (—)} = 5.54 \text{ (—)} \quad (\text{Eşitlik 8.})$$

Tabaka sayısının hesaplanmasında farklı sonuçlar çıkabilir bunun nedeni ise  $\sigma$  ölçümü pikin farklı yüksekliklerinde yapılabilir. Pikin taban kısmında  $W_b$  değeri  $4\sigma$ 'dır böylece sayısal sabit değer  $4^2$  yada 16 olacaktır, pikin yarı yüksekliğinde ise  $W_h$  değeri  $2.354\sigma$  olacak ve sayısal sabit 5.54 olacaktır.

Tabaka sayısı  $N$  ile ilişkili olan diğer bir parametre "tabaka yüksekliği" ( $H$ ) ile ifade edilmektedir.

$$H = L/N \quad (\text{Eşitlik 9.})$$

Burada  $L$ ; kolon uzunluğudur ve tabaka yüksekliğinin birimi uzunluk cinsindedir. Tabaka yüksekliği  $H$ , farklı uzunluktaki kolonların etkinliğinin karşılaştırılması açısından  $N$  değerinden daha kullanışlıdır. İyi bir kolon büyük bir  $N$  sayısına ve küçük bir  $H$  değerine sahip olmalıdır.

Kolon etkinliğinin başka bir ölçüsü bitişik piklerin ayrılmasında kullanılan "çözünürlük" terimi  $R_s$ 'dir:

$$= \frac{\left( \frac{\quad}{\quad} \right) \left( \frac{\quad}{\quad} \right)}{\left( \frac{\quad}{\quad} \right) \left( \frac{\quad}{\quad} \right)} = \frac{\quad}{\quad} \quad (\text{Eşitlik 10.})$$

Eşitlik 10'da  $d$  ile gösterilen terim A ve B gibi iki bileşene ait piklerin tepe noktaları arasındaki uzaklığı ifade etmektedir.  $W_b$  değerleri ise piklerin taban genişliklerini ifade etmektedir.



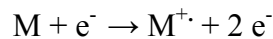
### 3.2.4. Kütle spektrometrisi nedir

Kütle spektrometri organik bileşiklerin kütlesi ve yapısını tayin etmek, inorganik bileşiklerin tanımlanması için kullanılan bir metottur. Numune spektrometre içinde gaz halinde bulunur ve kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrımları yapılan genellikle elektriksel olarak sinyal üretebilecek gaz fazında iyonlar oluşturulur. Farklı türlere karşılık gelen ion-akım değerleri osiloskop, kâğıt veya bilgisayar ortamında görüntülenir. Bir kütle spektrometresi aşağıdaki bileşenlerden oluşur:

- 1-) Numuneden iyonların oluşturulduğu bir iyon kaynağı
- 2-) İyonları m/z değerlerine göre ayıran analizör (Quadropole, Ion trap v.d)
- 3-) Her tür için iyon akımının şiddetini veren dedektör
- 4-) Yukarıdaki bileşenler için güç kaynakları ve kontrol sistemleri
- 5-) Çeşitli vakum sistemleri

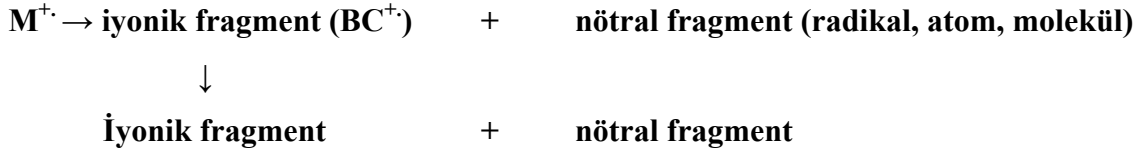
#### 3.2.4.1. İyonlaştırma ve fragmentasyon

İyonizasyon için çeşitli kaynaklar kullanılabilir, seçim numunenin fiziksel durumuna ve maddenin uçuculuğu ile termal stabilitesine bağlıdır. Elektron-impact iyonizasyon gaz fazındaki moleküller için tatmin edici sonuçlar verir bu teknikte M olarak ifade edilen organik molekül bir elektronun kopmasıyla +1 yüklü radikal vernek üzere moleküler iyon oluşturur:



İyonizasyon sırasında belirli bir iç enerji moleküle aktarılır. Bu aktarılan miktar değişkendir ve büyüklüğü bir veya daha fazla parçalanma reaksiyonunun oluşup oluşmayacağını tayin eder. Parçalanma reaksiyonları (fragmentasyon) genellikle düşük

aktivasyon enerjisine sahip göreceli kararlı iyonik ve nötral türlerin oluşumunu tercih eder:



Düzgün bir parçalanma reaksiyonu genellikle tek bir atom veya atom grubundan oluşan radikal ve iyonları meydana getirir. Parçalanma reaksiyonunda yük en düşük iyonlaşma potansiyeline sahip fragment üzerinde bulunur. Yukarıdaki reaksiyonda  $BC^+$  türünün fragmentasyonunda yük  $B^+$  ve  $C^+$  üzerinde veya  $B^+$  ve  $C^+$  üzerinde kalır, eğer  $B$ 'nin iyonlaşma potansiyeli  $C$  türünden daha düşük ise ana parçalanma ürünleri  $B^+$  ve  $C^+$  olacaktır. Kararlı fragmentler molekül üzerindeki atomların pozisyonlarını değiştirmesiyle de meydana gelebilir, bu değişimler yeniden düzenlenme (rearrangement) adını alır.

### 3.2.5. İyonlaştırma metotları

#### 3.2.5.1. Elektron çarpışma iyonlaştırması

En yaygın biçimde kullanılan metottur. Madde iyonlaştırma odasında uçucu hale getirilir, moleküller elektronlarla bombardıman edilir ve pozitif yüklü iyonlara dönüştürülür:  $A + e^- \rightarrow A^+$  (uyarılmış)  $+ 2e^- \rightarrow A^+$  (son durum)

Oluşturulan iyonlar için meydana gelen iyon akımı  $I$  şu şekilde ifade edilir:

$$I = aI_e \rho \sigma L$$

$I_e$  elektron akımı,  $\rho$ : iyonlaşma odasındaki numunenin basıncı,  $\sigma$ : moleküllerin iyonlaşma kesiti,  $L$ : elektronların odadaki etkin yolu ve  $a$ : iyonların ekstraksiyon verimi.

### **3.2.5.2. Foton iyonlaştırma**

İyonlaştırma ajanları fotonlardır. Fotonlar yüksek enerjili lambalar veya lazerler tarafından oluşturulur. Kullanılan fotonların spektral aralığı ultravioleto – infrared bölgede değişim gösterir. İyonlaşma prosesi fotonun enerjisine bağlıdır.

### **3.2.5.3. İyon bombardıman iyonlaştırması**

Katı numunelerin birincil iyonlarla bombardımanı sonucu ikincil iyonların oluşturulmasına dayanan bir metottur. Düşük uçuculuğa sahip bileşikler için kullanılmaktadır.

### **3.2.5.4. Kuvılcım-kaynak iyonlaştırma**

Uçucu olmayan inorganik katılar için kullanılmaktadır (metaller, mineraller, tuzlar. İyon oluşumu elektrotlardan birinin çukur kısmında yer alan iletken numunenin diğer elektrot ile potansiyel altında kuvılcım oluşturması ile meydana gelir veya iletken olmayan numunenin iletken iki elektrot arasında yer almasıyla meydana gelir.

### **3.2.5.5. Nötrale parçacıklarla bombardıman iyonlaştırması**

Katı numuneler Ar, Xe, Cs gibi atomlarla bombardıman edilir.

### 3.2.5.6. Elektrosprey iyonlaştırma

Bu metot polimer benzeri makromoleküller için uygundur numune çözeltisi, potansiyeli cihazın duvarlarına göre çok yüksek olan şırınga iğnesi benzeri ince metal bir borudan geçirilir, elektriksel alan etkisiyle çözelti iyonizasyon odasında elektrik yüklü çok küçük taneciklere dönüşür.

### 3.2.5.7. Termal iyonlaştırma

Katı numune ısıtıldığında buharlaşmaya ve iyonlaşmaya sebep olan bir katı filament üzerine konulur. Pozitif yüklü ( $n_+$ ) iyonların sayısının gaz fazında nötral atom ( $n_0$ ) sayısına oranı sıcaklık, filamentin yapısı ve numune matriksine bağlıdır.

### 3.2.5.8. Alan iyonlaştırma

Gaz fazındaki bir molekül güçlü bir elektrostatik alandan ( $10^8$  V/cm) geçirildiğinde pozitif yüklü iyon oluşturmak üzere elektron kaybedebilir. Bu elektrostatik alan keskin kenarlı metaller arasına 10kV gibi bir potansiyel uygulandığında oluşturulabilir. Alan desorpsiyonu bu metodun özel bir uygulamasıdır. Burada katı numune anot görevi yapan aktif bir filament üzerine konulur ve adsorblanmış yüzeyden pozitif iyonlar fırlatılır.

### 3.2.5.9. Kimyasal iyonlaştırma

Reaktif gaz 1 Torr basınçta iyonlaştırma odasına gönderilir ve 0.01 Torr veya daha az kısmi basınca sahip gaz numunenin karıştırılmasıyla elektron ışını karışımın içinden geçirilir büyük oranda reaktif gaz iyonları oluşturulur. Bu soft iyonizasyon metodunda reaktif iyon, moleküler iyondan daha kuvvetli bir proton vericisi ise numune molekülü M'den  $MH^+$  iyonu oluşur.

### 3.2.5.10. Termosprey iyonlaştırma

Kütle spektrometreyi bir gaz kromatografi cihazına bağlamak kolay olduğu halde elüent içinde yüksek miktarda bulunan çözücünden dolayı bu işlem sıvı kromatografi için daha zordur. Bu sorunu çözmeye ilk yaklaşımlardan biri kimyasal iyonlaştırma için reaktif gaz olarak işlev görebilecek çözücü kullanmaktır. Başka bir alternatif de numuneyi içeren elüenti hareket eden bir tel veya bant üzerine koymaktır, daha sonra ısıtılan bu bant/tel çözücünün uzaklaşması ile uygun bir iyonlaştırma tekniği için hazır hale gelir. Elektrolit içeren bir elüentin kapiler içindeki sıcaklığı  $150^{\circ}C$ 'ye ulaştığında bu karışım vakum odasına püskürtülür, çözücü hızlı biçimde buharlaşır elektrolitle birlikte analit molekülleri kalır. Bu partiküller çok küçük olduğundan dolayı analit molekülleri çok yüksek bir iyonik elektrostatik alana maruz kalır ve elektrolit yapısına bağlı olarak kolayca proton veya katyon yapılarına dönüşürler. Termosprey olarak bilinen bu yöntemle hem negatif hem pozitif iyonlar oluşturulabilir.

### 3.2.6. İyonların kütle analizörü ile ayırımları

#### 3.2.6.1. Manyetik analizör

Kütlesi  $m$  ve yükü  $z$  olan bir iyon iyon kaynağını terk ettiğinde  $V$  potansiyeli altında  $z$   $V$  enerjisine sahip olacak şekilde  $mv^2/2$  kinetik enerjisiyle hareket eder,  $v$  burada iyonun hızıdır. Eğer iyon, uçuş doğrultusuna dik bir şekilde olan  $B$  manyetik alanına girerse  $F$  ile ifade edilen manyetik bir kuvvet altında kalır:

$$F = vzB$$

Sonuç olarak iyonlar merkezkaç kuvvetini ( $mv^2/r$ ) dengeleyen manyetik kuvvet  $F$  tarafından belirlenen  $r$  yarıçaplı bir dairesel yörünge izler.

Manyetik analizörün iyonları birbirinden ayırma prensibi şu şekilde ifade edilebilir:

$$mv^2/r = vzB \leftrightarrow m/z = rB/v$$

$v = \sqrt{2zV/m}$  şeklinde gösterilebilir ve bununla bağlantılı olarak,  $m/z = B^2 r^2 / 2V$  son ifade olarak yazılabilir. Eğer  $r$  ve  $V$  sabit tutulursa  $m/z$  değeri doğrudan manyetik alan kuvvetiyle doğru orantılı olacaktır. Son eşitlikte;  $m$ (kg),  $r$ (m),  $B$ (1Tesla= $10^4$ gauss),  $z$ (Coulomb) ve  $V$ (volt) cinsinden ifade edilmektedir.

### 3.2.6.2. Quadrupole analizör

Quadrupole filtre hiperbolik, eliptik veya dairesel kesite sahip dört paralel elektrottan oluşur. Diagonal karşıt elektrotlar aynı potansiyel altında bulunur, bu potansiyel:

$\Phi_0 = U + V \cos \psi t$  ile gösterilmektedir. Burada  $U$ : doğru akım potansiyeli (d.c),  $V \cos \psi t$ : radyofrekans potansiyelini (frekans  $\psi/2\pi$ ) ifade etmektedir. Krşılıklı eşleşmiş iki elektrot ( $x$  düzlemi) ve diğer iki elektrota ( $y$  düzlemi) uygulanan elektrik alan arasında  $180^\circ$  faz farkı vardır. Quadrupole alanın ( $x, y$  düzlemi boyunca) her noktasında uygulanan potansiyel  $\Phi = \Phi_0 (x^2 - y^2)/r_0$  olacaktır.

Quadrupole filtredeki  $m$  kütesine ve  $e$  yüküne sahip bir iyonun hareketi diferansiyel denklem olarak ifade edilebilir:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{eV}{m r_0} (x^2 - y^2) = 0$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{eV}{m r_0} (x^2 - y^2) = 0$$

Bu eşitlikler iki tip çözüme yol açar; birincisinde iyonlar yörüngede kararlı bir biçimde yol alır ve  $z$  düzlemi boyunca (elektrotlara paralel olan düzlem) osilasyon hareketi ile elektrotlara çarpmadan ilerler, ikincisinde kararlı olmayan yörüngelerde osilasyon hareketi üstel biçimde artarak ilgili iyonların elektrotlara çarpmasına neden olur. Böylece belirli  $m/z$  değerlerine sahip iyonlar analizörden geçer ve elektriksel olarak sinyal üretmek üzere dedektöre ulaşır.

### 3.3. Numunelerdeki EDC ve PhAC analitlerinin izolasyonu

Ekstraksiyon için çözücü sürüklenme, buhar destilasyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyon metotları daha etkin ve kullanışlı olan katı faz ekstraksiyon (SPE) ve katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) metodu ile yer değiştirmiştir. Günümüzde SPE metodunda hem disk hem tek kullanımlık kartuşlar kullanılmaktadır. EDC ve PhAC'ların analizinde ekstraksiyon için en yaygın olarak oktadesil (C18) bağlı silika kartuşlar kullanılmaktadır (Mouatassim-Souali v.d, 2003; Jeannot v.d, 2002). Grafitleştirilmiş karbon (Ding ve Chen, 1999), ethynilbenzen-divinilbenzen co-polymer (Bolz v.d, 2000) ve polistiren-divinilbenzen (Belfroid v.d, 1999) yapılı kartuşlar da kullanılmaktadır. Farklı SPE kartuş materyalleri spesifik bileşikler için çok farklı verimlere sahip olabilirler. Örnek olarak C18 veya grafitleştirilmiş karbon ile karşılaştırıldığında stiren-divinilbenzen yüksek-polar maddelerin düşük tutunma kabiliyetleri nedeniyle kantitatif ekstraksiyonları için uygun değildir (Petrovic v.d, 2002). Geniş aralıkta farklı polarite gösteren bileşikler için tek basamaklı ekstraksiyon uygun olmadığında ardışık katı faz ekstraksiyon prosedürleri uygulanabilir. Son zamanlarda polystiren-divinil benzen-N-Vynilpyrrolidone terpolymer'den oluşan Oasis HLB sorbenti (Tixier v.d, 2003) geniş alanda uygulanmaktadır ve EDC-PhAC ekstraksiyonu için standart SPE fazı olarak kabul edilmektedir. Kartuş içindeki adsorbent hem hidrofilik hem lipofilik tutunma karakterleri göstermektedir (Rodriguez v.d, 2004) böylece EDC ve PhAC moleküllerindeki asidik ve bazik fonksiyonel grupları ile etkileşmektedir. Kartuşun bu özellikleri numune hazırlamada gerekli olan yüksek seçiciliğe ulaşmak için ardışık SPE prosedürlerini elimine edebilir. Bunlara ek olarak Oasis HLB'nin iyi kuruma özellikleri kartuşların kurutulması işlemindeki negatif etkili madde kayıplarını minimize edebilir (Ollers v.d, 2001).

Ekstraksiyon işleminden sonra adsorbent üzerindeki hedef bileşiklerin desorpsiyonu için farklı polaritede çözücü elüsyonu uygulamak önemlidir. Etil asetat tek başına veya aseton ile karışım halinde nötral ve daha az polar bileşiklerin elüsyonu için en çok kullanılan çözücüdür. Örneğin Xiao v.d (2001), Oasis HLB kartuştan steroid hormonlarını elüe etmek için etil asetat kullanmıştır. Elüsyon çözücüsünün seçimi büyük oranda hedeflenen analite ve kullanılan SPE materyaline bağlıdır. Çözücü oranı,



hacmi ve elüsyon hızı deneysel olarak tayin edilmelidir. Tablo.2’de çeşitli ekstraksiyon metotları özetlenmiştir.

### 3.4. EDC ve PhAC bileşiklerinin derivatizasyonu

Derivatizasyon işlemi analiti daha stabil hale, daha iyi kromatografik özellikli hale ve dedektörde daha iyi sinyal verebilecek hale getirir. EDC ve PhAC bileşiklerinin çoğunda hidroksil, karboksil, amin grupları olduğu için bu bileşikler yüksek polarite ve düşük uçuculuk özelliklerine sahiptirler, bu nedenle GC analizlerinde derivatizasyon basamağı çok önemlidir. Off-Line derivatizasyon işlemleri ile trimetilsilil eterleri, metil eterleri, asetil esterleri ve pentaflorobezoil ester türevleri eldesi birçok uygulamada kullanılmaktadır (Tablo.3). EDC ve PhAC bileşiklerinin derivatizasyonunda en çok kullanılan reaktifler; Bis-(trimetil-silil) trifloroasetamid (BSTFA), N-metil-N-terciyer bütildimetilsilil trifloroacetamide (MTBSTFA), diazometan, N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve pentaflorobenzil bromür’dür (PFBBBr). Diazometan farklı özellikteki asidik bileşiklerin metillenmesi için hızlı ve az yan ürün veren bir prostestir. Bu reaktifin temel dezavantajı toksik olması ve hazırlandıktan sonraki çok kısa saklama ömrüdür. Diazometanın ibuprofen, naproksen, diklofenak, ketoprofen ve klofibril asit gibi bütün asidik farmasötikleri türevlerine dönüştürdüğü rapor edilmiştir (Ollers v.d, 2001). BSTFA, MSTFA, MTBSTFA bileşiklerinin hepsi sililleme reaktifleridir. Bu bileşikler farklı fonksiyonel grupları (alifatik ve aromatik hidroksil grupları, karboksik ve amino grupları) silillemedeki reaktiflikleri ve oluşan türevlerin satbilitesi bakımından farklılık göstermektedir. BSTFA en popüler sililleme reaktifidir ve trimetilsilil türevlerini (TMS) verir. BSTFA’nın çeşitli hidroksil grupları ile ılımlı koşullar altında hızlı ve kantitatif reaksiyon verdiği rapor edilmiştir. Uzun süreli saklama koşullarında BSTFA türevlerinin stabil olması, ortamdaki aşırı reaktifin su ile hidrolizini takip eden susuz sodyum sülfat dehidrasyonu ile sağlanabilir (Li v.d, 2001). BSTFA’nın derivatizasyon hızları çözücüye bağlıdır. Asetonun alkil fenollerin derivatizasyonu için çok uygun olduğu rapor edilmiştir. BSTFA kullanımının dezavantajı neme duyarlı

olmasıdır. BSTFA ile karşılaştırıldığında bazı çalışmalarda gösterdiği yüksek termal ve hidrolitik kararlılık nedeniyle ve ayrıca tersiyer-butildimetil silil gruplarının sağladığı iyi kromatografik ayırım ve MS dedeksiyonu nedeniyle MTBSTFA reaktifi tercih edilmiştir (Rodriguez v.d, 2003). Pentaflorobenzil bromür karboksil ve fenol grupları içeren asidik herbisidlerin derivatizasyonunda kullanılmıştır. Aynı zamanda bu reaktifin aseton içinde  $K_2CO_3$  ilave edilerek steroidlerin türevlendirilmesinde çok iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Lerch ve Zinn, 2003). Peterson v.d (2000), idrarda bulunan ilaçların derivatizasyonu için MSTFA ve N-metil-bis-trifloroasetamid'i (MBTFA) sırayla hidroksil ve amino gruplarını türevlendirmede kullandı.

Farklı derivatizasyon reaktiflerinin kantitatif tayin üzerinde önemli etkileri vardır bu nedenle reaktif seçiminde bazı kriterler göz önüne alınmalıdır: 1-) drivatizasyonun tamamlanma oranı; 2-) Bütün hedef fonksiyonel grupların dönüştürülmesi; 3-) Mümkün olduğunca az yan ürün oluşumu. Ethynyl estradiol ve asetaminofen gibi EDC ve PhAC bileşikleri derivatize edilmesi gereken birden fazla fonksiyonel gruba sahiptir. Tamamlanmamış derivatizasyon düşük pik sinyali ve yüksek tayin sınırlarına neden olmaktadır. Örnek olarak molekülde birden fazla alifatik grup bulunması durumunda PFBBBr ile tamamlanmamış derivatizasyon meydana gelebilir (Lerch ve Zinn, 2003). Tamamlanmamış derivatizasyonun başka bir sebebi de sterik engelli grupların bulunması olabilir. Bazı çalışmalar Ethynil estradiol yapısındaki aynı karbona bağlı hidroksilin ethynil grubunun sterik engelleme göstermesi ile derivatize edilemediğini rapor etmektedir (Kelly, 2000). Bunun yanında MSTFA ethynil estradioldeki hidroksil grubunu derivatize etmektedir (Quintana v.d, 2004). Derivatizasyon reaktifinin seçimi yanında reaksiyon zamanı, sıcaklık, reaktif dozu, katalizör varlığı ve çözücü özellikleri analit derivatizasyonunun veriminde etkili olabilir. Verimin ve dolayısıyla tayin hassasiyetinin artırılması için birçok çalışmada yukarıda bahsi geçen parametreler ayrı olarak optimize edilmektedir. Bunun yanında aynı anda birçok faktör sistematik ve eşzamanlı olarak istatistiksel deneysel dizayna bağlı analiz edilebilirse tayinin kesinliği ve etkinliği eş zamanlı artar. Hedef analitlerin ayırımları ve tayinleri LC-MS veya GC-MS tekniklerinin her ikisi ile de yapılabilir, analizin kalitesi ekstraksiyon parametrelerinde olduğu gibi, ayırım ve tayin için cihazda kullanılan parametre ve programlara bağlıdır. Örnek olarak düşük konsantrasyondaki çevresel kirleticilerin tayininde zemin girişimlerini bastırmak ve duyarlılığı artırmak

için GC-MS tekniğinde SIM (Selected Ion Monitoring) modunun kullanımı gibi çözümler sunulmaktadır. Çizelge 3.1.'de sularda EDC ve PhAC tayini için bir çok sayıda metot özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. EDC ve PhAC bileşiklerinin tayin metotları.

Bileşik	Numune hazırlama (ekstraksiyon, elüsyon, numune hacmi)	Derivatizasyon	Tayin	LOD ve LOQ ng/L, matriks	Referans
E1, E2,E3,EE2	Oktadesil silica C18, ACN:H2O(200ml örn.)	belirtilmemiş	LC-UV	LOD: 10-15, atıksuda	Alder ve Barcelo, 2001
E1, E2,E3,EE2	Speeddisk-C18 H2O:ACN(4:1) 2l örnek	50µL pentafloropropionik asit.	GC-MS	LOQ: 0.04-0.32 atıksuda	Moultasim-Souali v.d, 2003
E1, E2,EE2,NP,4-t-OP	Lşchrolut EN;ACN ve MeOH, 1L örnek	Pentaflorobenzoiklörür	HRGC/NCI-MS	LOD: 0.05-0.1 yüzey sularında	Kuch ve Ballshmitter, 2001
E1, E2,EE2	C18 disk:MeOH:H2O, 2,5L mrnek	MTBSTA-ACN içinde%1TBDMCS	GC-MS GC-MS <sup>2</sup>	Belirtilmemiş	Kelly, 2000
Karbamazepine, klofibril-asit, diklofenak,ketoprofen,naproksen, ibuprofen.	Oasis HLB;1L örnek.	Diazometan	GC-MS	Belirtilmemiş	Tixier, 2003
Karbamazepine, klofibril-asit, diklofenak,ketoprofen,naproksen, ibuprofen,bezafibril,gemfibrozil,diazepam	RP-C18 kartuş;4mlACN;1L örnek.	PFBBR (sikloheksan içinde trietyl aminle 100°Cde 2saat.	GC-MS	LOQ:13-32 yüzey suyunda	Sacher, 2001.
Ibuprofen,naproksen,ketoprofen,tolfenamik asit,diklofenak	Oasis HLB;EtOAC;500mL örnek	MTBSTFA	GC-MS	LOQ: 20-50 yüzey sularında	Rodriguez, 2003
Karbamazepine, klofibril-asit, diklofenak,ketoprofen,naproksen, ibuprofen	Oasis HLB; EtOAC:ACN(50:50);1L örnek	Diazometan	GC-MS	LOD: 0.3-4.5 yüzey sularında	Ollers, 2001
51 adet EDC ve PHAC	Oasis HLB;MeOHve MeOH/MTBE(10:90) ve DCM	Belirtilmemiş	GC-MS-MS LC-MS-MS	LOD: 1-10 yüzey sularında	Trenholm v.d, 2006

#### 4. DENEYSEL KISIM-1

##### Kullanılan Araç ve Gereçler

GC-MS: Varian 4000 GC-MS/MS (Varian, Walnut Creek, CA, USA)

Autosampler: Varian CP-8400 (Sıcaklık programlanabilir sistemli)

GC kolon: SGE kapiler kolon BPX-5 (30m x 0.25 mm x 0.25µm)

Vakum sistemi: Visiprep DL vacuum manifold for 12 sample (Supelco, Bellefonte, USA)

Rotaporator: Buchi R-200, Buchi vacuum pomp V-700 (Flawil, Switzerland)

Cam mikrofiber filtre kağıdı (Whatman, Maidstone,UK.)

Katı faz ekstraksiyon kartuşları:

1-) Oasis HLB 6cc, 2-) Strata-X 6cc (Waters, Milford, MA, USA), 3-) Phenomenex (Torrance, CA, USA)

Pyridine (Merck, Darmstadt, Germany)

Hidroksilamin hidroklorür (Merck, Darmstadt, Germany)

Hekzan (Supelco)

Metanol (Supelco)

Etil asetat (Supelco)

Hekzametildisilazan (HMDS) (Merck, Darmstadt, Germany)

Trifloro asetik asit (TFAA) (Merck, Darmstadt, Germany)

Cholic asit: {(R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl)pentanoic acid}

Lithocholic asit: { (4R) – 4 - ( (3R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3hydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl)pentanoic asid }

Chenodeoxycholic asit: {(4R)-4-((3R,7R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-di-hydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl)pentanoic asid}

Ursodeoxycholic acid: {(4R)-4-((3S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-di-hydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl) pentanoic acid}(Sigma Aldrich)

3-Hydroxy, 7-ketocholanic acid: {(4R)-4-((8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-7-oxohexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl) pentanoic acid}

Dehydrocholic acid: {(4R)-4-((8R,9S,10S,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-3,7,12-trioxohexadecahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthren-17-yl) pentanoic acid}

## 4.1. Safra Asitlerinin Kimyasal Yapıları ve Analizleri

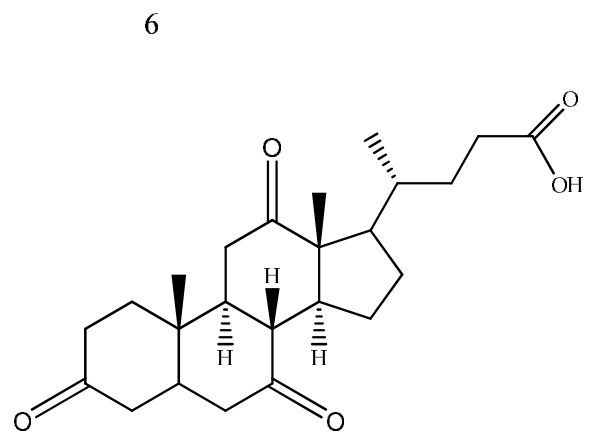
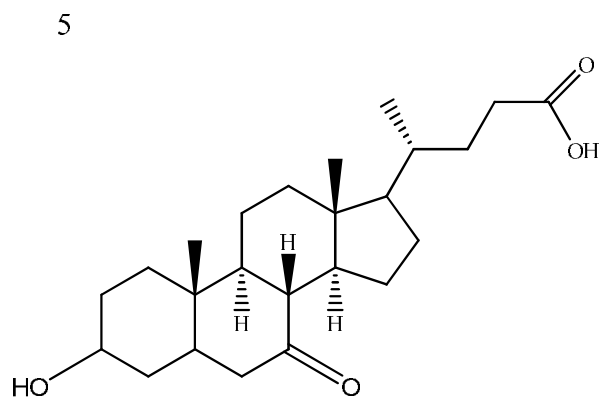
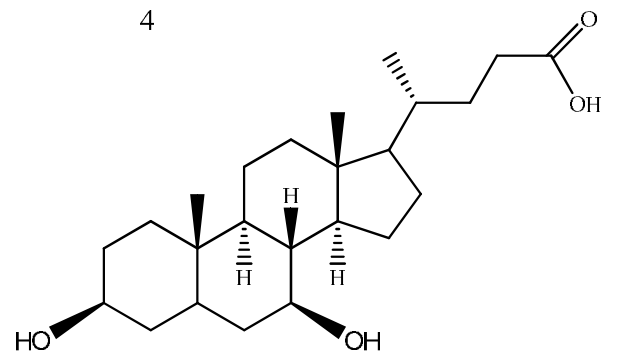
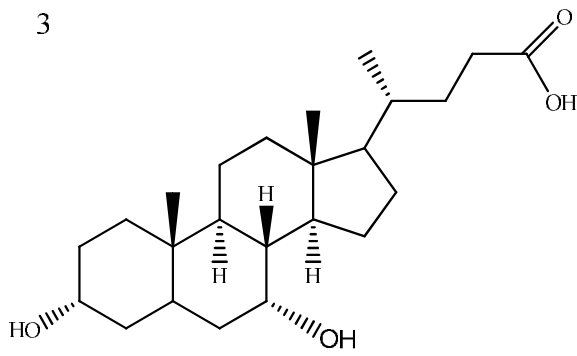
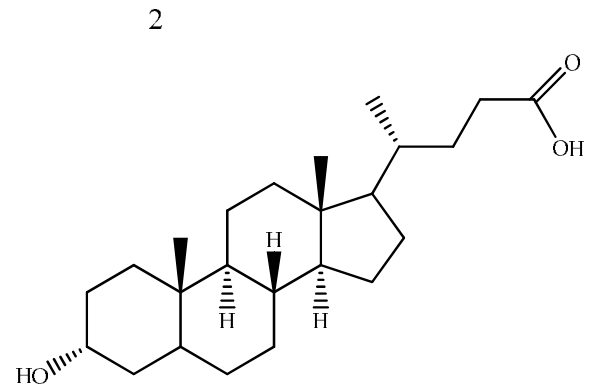
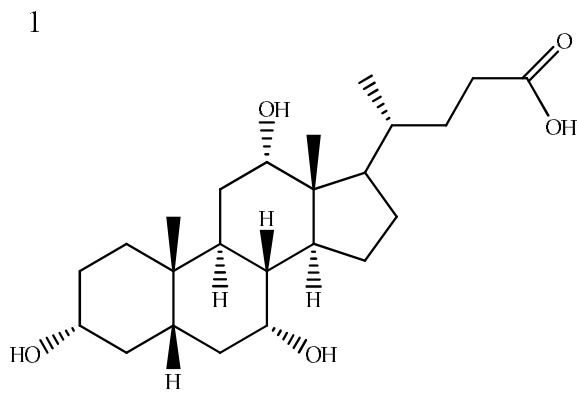
### 4.1.1. Safra asitlerinin kimyasal yapıları

Safra asitleri gelişmiş memelilerin sindirim sisteminde üretilen C<sub>24</sub>, C<sub>27</sub> ve C<sub>28</sub> yapılı steroidal asitlerdir (Elhmmali v.d, 2000). Lithocholic asit ve Deoxycholic asit en önemli safra asitleridir. Bu kimyasal indikatörlerin sedimentlerde yüzlerce yıl bozunmadan kaldığı bilinmektedir (Nes ve Nes, 1980; Mackenzie v.d, 1982; Bull v.d, 2002)

Safra asitleri yan zincirde karboksil grubu bulunan steroidal asitlerdir; bununla birlikte biyolojik olarak safra asitleri karaciğer tarafından oluşturulan kolesterol katabolizmasının ana ürünleridir. Safra asitlerinin çoğu doymuş steroidal halka yapısına sahip 24 karbon içeren ve buna ekli karboksil yapısında yan zincir taşır.

Birincil safra asitleri, hepatik enzimlerle kolesteroldeki 5-β çift bağının doyurulması, 3β- hidroksil grubunun 3α-hidroksile epimerizasyonu ayrıca 7α-hidroksil grubunun 12α-hidroksil ile birlikte veya tek başına bağlanması ve yan zincirin 3 karbon kısalarak terminal karbonun karboksil grubuna oksidasyonu ile oluşur. (R.G Danzinger v.d (1972). Safra asitleri ve steroidal hormonlar (estron, estradiol v.b) kolesterol orjinine sahip olduklarından safra asitlerinin çevre su kütlelerine karışması ile onları potansiyel EDC haline getirir ve bu olgu atık sular ve çevrede tayinlerini önemli kılar.

Safra asitlerinin en yaygın formu halinde bulunanlardan altı tanesinin yapıları aşağıda verilmiştir. 1. Cholic asit, 2. Lithocholic asit, 3. Chenodeoxycholic asit, 4. Ursodeoxycholic asit, 5. 3-Hydroxy,7-ketocholanic asit, 6. Dehydrocholic asit.





#### 4.1.2. Safra asitlerinin analizleri

Safra asitlerinin gaz kromatografi kütle spektroskopisi ile tayinleri 1970'li yılların sonlarına dayanmaktadır ve biyolojik sıvılardaki tayinlerine yönelik çalışmalarda hala tercih edilen yaygın bir metottur (Keller, S v.d, 2004). Safra asitlerinin tam anlamıyla türevlerine dönüştürülmesi keto gruplarının oksimleştirilmesi, karboksil ve hidroksil gruplarının eter ve ester türevlerine dönüştürülmesi literatür olarak çok kısıtlıdır. Bu çalışmamızda ortaya konan deneysel veriler safra asitlerinin GC-MS ile analize uygun kararlı türevlerinin oluşturulması ve tekrarlanabilir tayin ölçümlerine olanak tanımaktadır.

Kolik asitlerin tayininde ilk olarak ayrı safhalarda esterleştirme ve açilleme işlemleri uygulandı (Alme, B v.d, 1977). Birinci aşamada yapılan çalışmalarda genellikle karboksilik grup birçok farklı ester türlerine dönüştürülmüştür. Metil esterler %5 HCl içeren metil alkol varlığında diazo metan ile elde edilmiştir (Tohma, M., v.d 1987). Etil esterler yine % 5 oranında asit içeren etil alkol varlığında diazometan ile elde edilmiştir (Honda, A., v.d 2000). Butil esterleri 0.05M konsantrasyonda klörür asidi içeren butil alkol varlığında elde edilmiştir. Bunun yanında fenilaçil esterleri pentaflorobenzilbromür varlığında elde edilmiştir. İkinci safhada hidroksil grupları çeşitli reaktifler kullanılarak sililleme reaksiyonları ile türevlerine dönüştürülmüştür. Bu amaçla genellikle heksametildisilazan/trimetilklorosilan (HMDS/TMCS-2:1) veya trimetilsilil imidazol ve dimetilsilil imidazol gibi farklı yapıdaki imidazol bileşikleri kullanılmıştır. Bahsedilen ilk uygulamaların yanında N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve bis (trimetilsilil) trifloroasetamid (BSTFA) reaktifleri de kullanılmıştır (Tsaconas, C., v.d 1986 ve Tyagi, P., v.d 2007). İki basamaklı türevlendirme yanında trimetilsililimidazol ve BSTFA varlığında heksafloro izopropanol (esterleştirme), trifloroasetik anhidrit (açilleme) gibi tek safhada gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyonları da kullanılmıştır. Oluşturulan safra asidi türevlerinin tayini için GC-MS ve GC-FID metotları kullanılmıştır.

Çalışmamızda safra asitlerinin GC-MS ile tayinine yönelik deneysel kısımda amacımız;

1-) Seçilen bu altı safra asidinin kantitatif olarak trimetilsilil türevlerine dönüştürmek ve oluşan yeni yapıların fargmentasyon ürünlerini ortaya koymak.

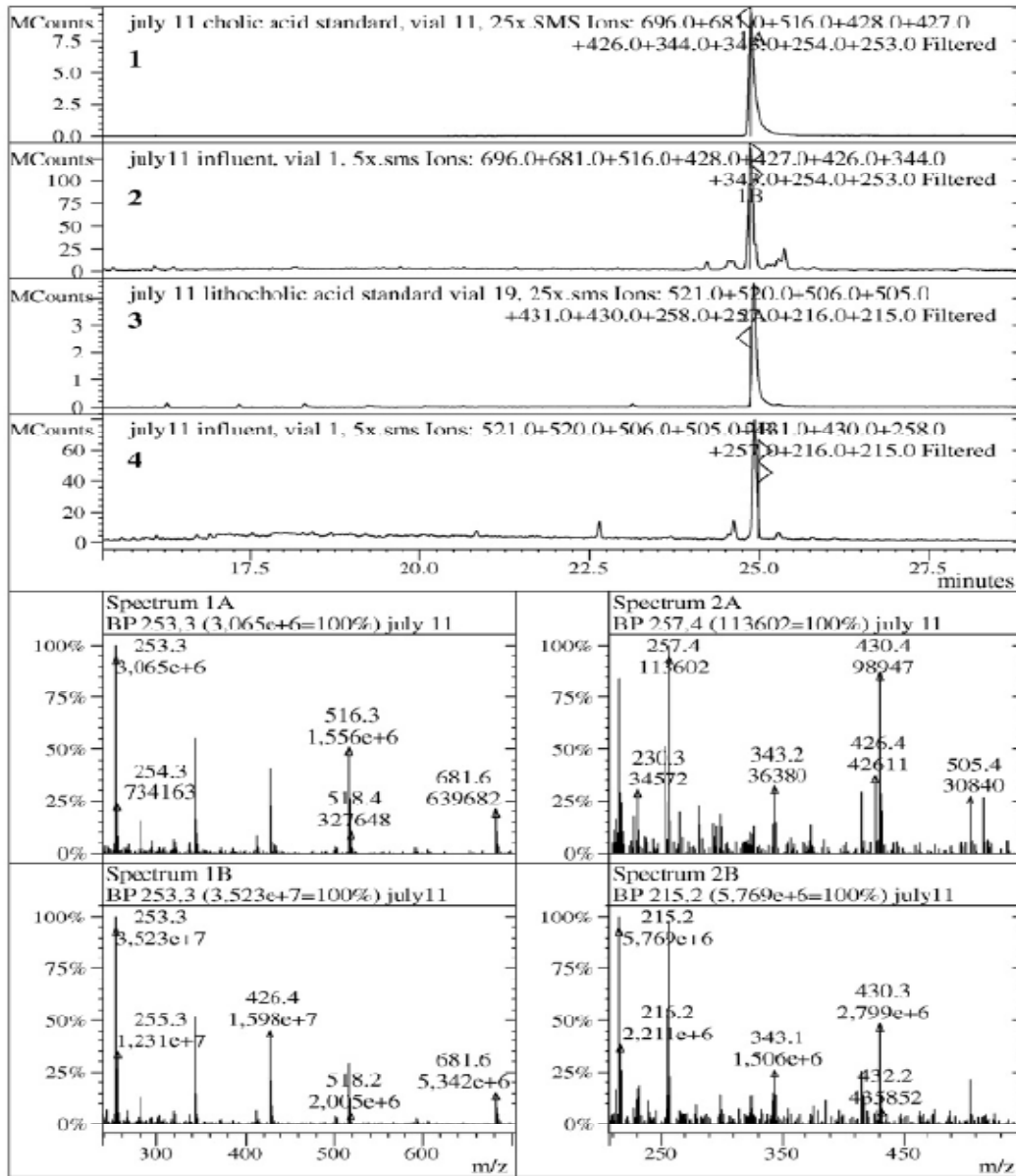
2-) Kantitatif türevlendirme elde edebilmek için oksimleştirme ve sillilleme reaksiyonlarını optimize etmek

3-) Trimetilsilil ve oksim türevlerinin kolik asitlerin model çözeltilerdeki farklı konsantrasyonlarda tayinlerinin doğrusallığını elde etmek

4-) Kolik asitlerin katı faz ekstraksiyonlarında geri kazanım verimlerini pH'a bağlı olarak ortaya koymak; 5-) Optimizasyonu yapılan metodu atıksulara uygulamak.

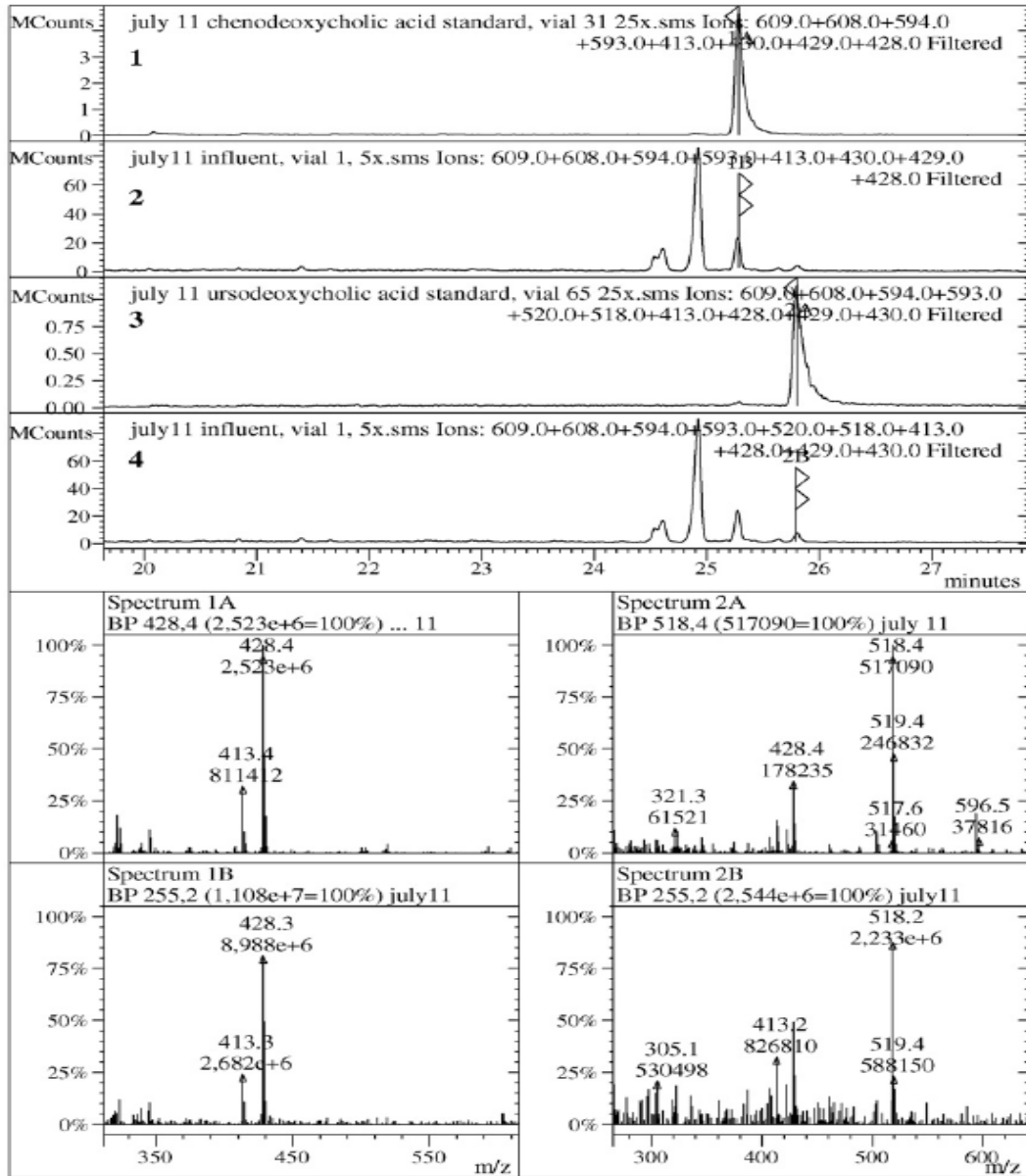
Çizelge 4.1. Oksim ve silil türevlerine dönüştürülen safra asitlerinin fragment iyon ve kütleleri

Asit	pKa	CAS	Molekül kütlesi	tR(dk)	<u>Moleküler ve fragment iyonlar</u>		
					M	[M-15] <sup>+</sup>	Diğer iyonlar m/z
1. Cholic asit	5.51	81-25-4	408.58	24.87	696.5	681	[M-2TMSOH] <sup>+</sup> = 516 [M-(2TMSOH+Si{CH <sub>3</sub> } <sub>4</sub> ) <sup>+</sup> = 428
2. Lithocholic asit	4.90	434-13-9	376.57	24.91	520.5	505	[M-TMSOH] <sup>+</sup> = 430 [M-2TMSOH] <sup>+</sup> = 340
3. Chenodeoxy asit	3.91	474-25-9	392.58	25.28	608.5	593	[M-TMSOH] <sup>+</sup> = 518 [M-2TMSO] <sup>+</sup> = 430
4. Ursodeoxy asit	3.00	128-13-2	392.58	25.81	608.5	593	[M-2TMSOH] <sup>+</sup> = 428 [M-(15+2TMSOH)] <sup>+</sup> = 413
5. 3-Hydroxy,7-ketocholanic asit			390.56	26.28	621.5	606	[M-TMSOH] <sup>+</sup> = 532 [M-(15+TMSOH)] <sup>+</sup> = 516 [M-TMSCOO] <sup>+</sup> = 490 [M-(TMSNO+TMS)] <sup>+</sup> = 449
6. Dehydrocholic asit	4.20	81-23-2	402.53	27.55/27.95	733.5	720	[M-TMSOH] <sup>+</sup> = 646 [M-(TMSO+TMSOH)] <sup>+</sup> = 556 [M-(TMSO+2TMSOH)] <sup>+</sup> = 466



Şekil 4.1. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (A)

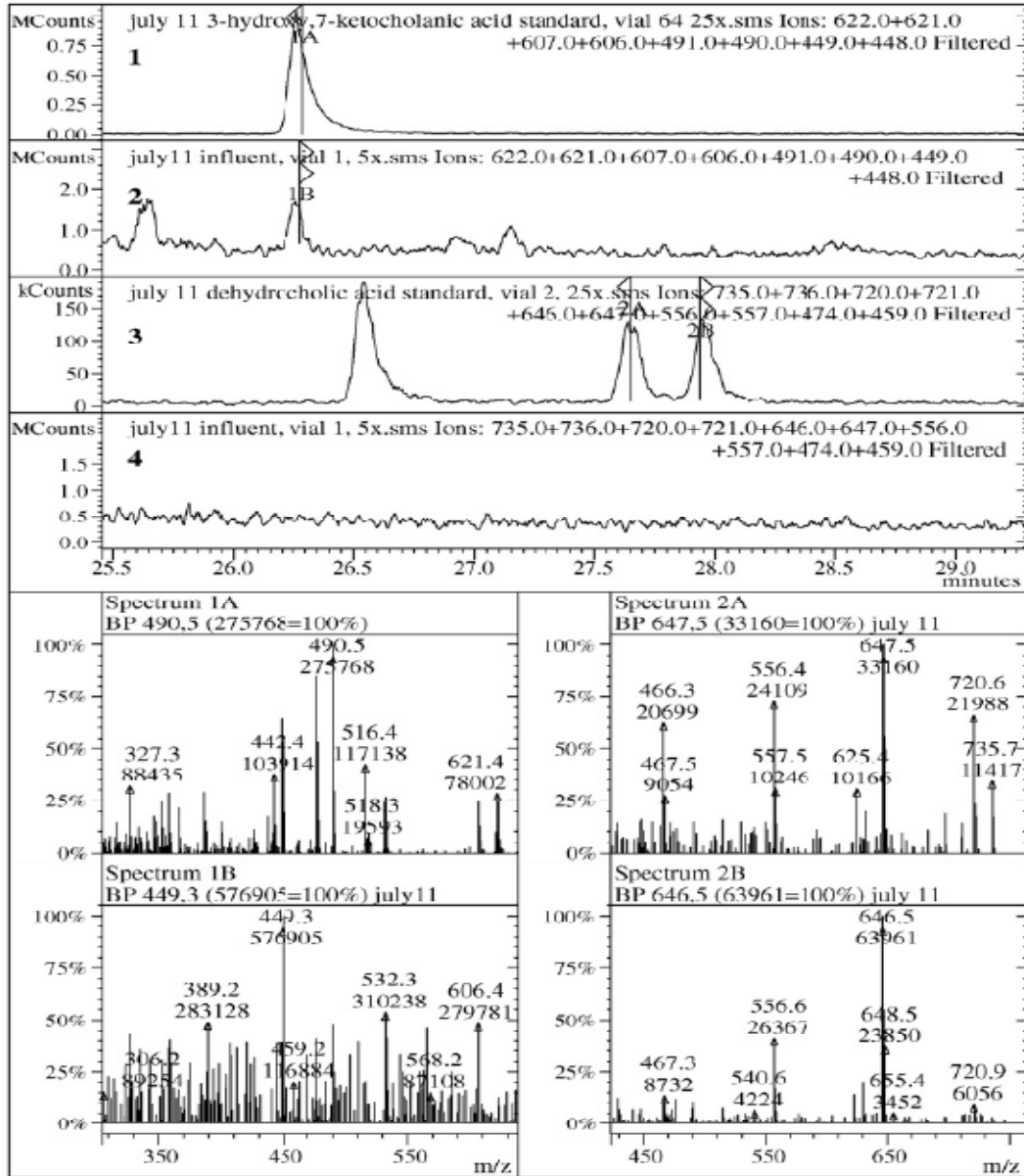
Yukarıda Şekil 4.1.'de verilen kromatogram ve spektrumlarda safra asitlerinin trimetilsilil (oksim) eter/ester türevleri ve bunların elüsyon profilleri ile kütle spektrumları görülmektedir. (A) ile gösterilen birinci spektrum cholic ve lithocholic aside ait spektrumlardır. 1 ve 3 no'lu kromatogramlar ile 1A ve 2A kütle spektrumları standart asit çözeltilerinden elde edilmiştir. 2 ve 4 no'lu kromatogramlar ile 1B ve 2B kütle spektrumları ise atıksu numunelerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (B).

Yukarıda Şekil 4.2’de verilen kromatogram ve spektrumlarda safra asitlerinin trimetilsilil (oksim) eter/ester türevleri ve bunların elüsyon profilleri ile kütle spektrumları görülmektedir. (B) ile gösterilen birinci spektrum chenodeoxycholic ve ursodeoxycholic aside ait spektrumlardır. 1 ve 3 no’lu kromatogramlar ile 1A ve 2A kütle spektrumları standart asit çözeltilerinden elde edilmiştir. 2 ve 4 no’lu

kromatogramlar ile 1B ve 2B kütle spektrumları ise atıksu numunelerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Safra asitlerinin oksim/silil türevlerinin elüsyon kromatogramları ve kütle spektrum profilleri (C).

Yukarıda Şekil 4.3’de verilen kromatogram ve spektrumlarda Kolik asitlerin trimetilsilil(oksım) eter/ester türevleri ve bunların elüsyon profilleri ile kütle

spektrumları görülmektedir. (C) ile gösterilen spektrum 3-Hydroxy,7-ketocholanic asit ve dehydrocholic aside ait spektrumlardır. 1 ve 3 no'lu kromatogramlar ile 1A ve 2A kütle spektrumları standart asit çözeltilerinden elde edilmiştir. 2 ve 4 no'lu kromatogramlar ile 1B ve 2B kütle spektrumları ise atıksu numunelerinden elde edilmiştir.

### 4.1.3. Safra asitlerinin katı faz ekstraksiyonları

Çalışmada kullanılan kartuşlar ekstraksiyondan önce 5 ml hekzan, 5 ml etil asetat, 10 ml metanol ve 10 ml destile su ile şartlandırıldı. Katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirilme yapılmadan önce atıksu numuneleri cam mikrofiber kâğıttan geçirildi. Su numunelerinin ve standart çalışma çözeltileri pH 4 olacak şekilde 1/10 HCl ile ayarlandı. Bu işlemde sonra numune veya standart çözeltiler (0.5-1.0L) 4-5 ml/dk akış hızında vakum tankını kullanarak kartuşlardan geçirildi. Katı faz ekstraksiyonundan sonra kartuşlar vakum altında 45 dk süreyle kurutuldu. Analitlerin elüsyonunda sırasıyla; 5ml hekzan, 5ml etil asetat ve 14 ml metanol çözücülerini kullanıldı. Toplanan elüentler rotavaporatörde 30-40°C’de kuruluğa kadar uçuruldu. Katı faz ekstraksiyonunun akış şeması aşağıda verilmiştir.

KARTUŞ ŞARTLANDIRMA (HLB, STRATA-X, PHENOMENEX)

↓ (5ml hekzan + 5ml etil asetat + 10ml metanol + 10ml su)

SPE EKSTRAKSİYON (4-5ml/dk, 0.5-1.0 L çözelti, pH:4)

↓

KARTUŞLARIN KURUTULMASI (Vakum altında, 45dk)

↓

ANALİTLERİN ELÜSYONU

↓ (5ml hekzan + 5ml etil asetat + 14ml metanol)

ANALİT EKSTRAKTI (Rotevaporatör-30°C kuruluğa kadar uçurma)

↓

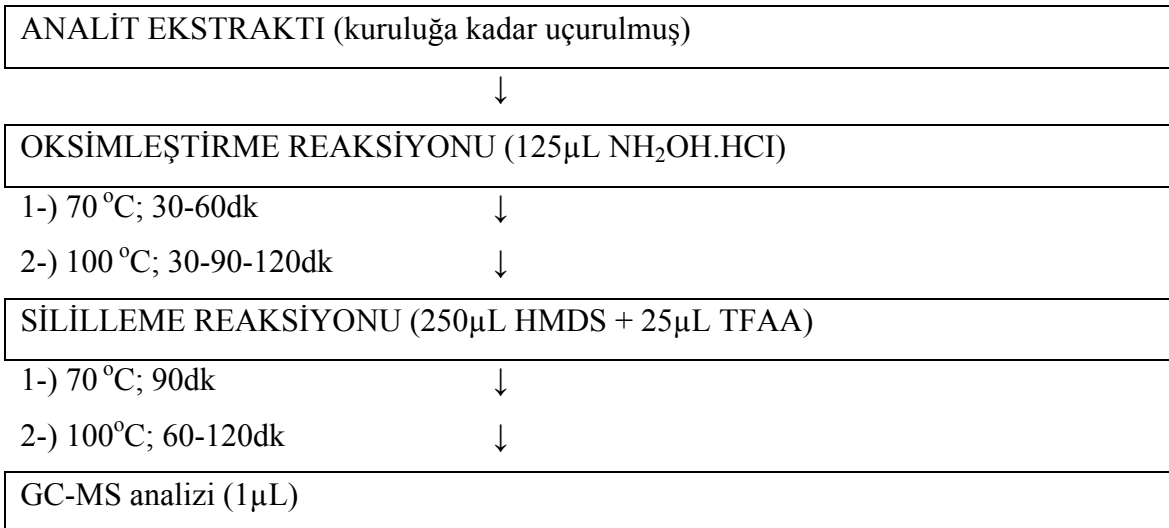
ANALİTLERİN DERİVATİZASYONU → GC-MS ANALİZ



#### 4.1.4. Safra asitlerin trimetilsilil ve oksim türevlerine dönüştürülmesi

Asitleri içeren standart çözeltiler 20-25mg/100ml olacak şekilde su/etanol (1:1) çözeltisi kullanılarak hazırlandı ve daha sonra istenen konsantrasyon ve miktarların elde edilmesinde seyreltmeler kullanıldı. Standartlardan 10-500µL hacimler alınarak viallere kondu ve su numunelerinin elüentlerindeki gibi kuruluğa kadar uçuruldu. Viallerdeki kalıntılara oksimleştirme amacıyla 125µl hidroksilaminhidroklörür (piridin içinde %2.5 a/h) çözeltisi konuldu. Oksimleştirme 70°C’de 30 ve 60 dk süreyle ısıtıcı bloklarda yapıldı, aynı işlem 100°C’de 30, 90 ve 120 dk süreyle de gerçekleştirildi. Sililleme işlemine geçildi.

Sililleme işleminde viallere 225µL HMDS (hekzametildisilazan) ve 25µL TFAA (trifloroasetik asit) ilave edildi. Blok ısıtıcılarda 70°C’de 90 dk, 100°C’de 60 ve 120 dk süreyle reaksiyonlar gerçekleştirildi. Her denemeden sonra vialdeki çözeltiler alındı HMDS ile seyreltildi ve 1µl hacimlerde GC-MS’e enjekte edildi. Sonuçların değerlendirilmesinde oksimleştirme için 70 °C-30dk ve sililleme işlemi için 70 °C-90dk reaksiyon şartları optimum olarak belirlendi.



#### 4.1.5. Safra asitlerini trimetilsilil/oksim türevlerinin kromatografik ayrımı

Derivatizasyon sonucu elde edilen trimetilsilil/oksim bileşikleri gaz kromatografisinde gradient elüsyon ve enjektör sıcaklık programları kullanılarak birbirinden ayrımı sağlandı:

a-) Enjektör: Enjeksiyon 100°C’de yapıldı ve 1 dk sıcaklık sabit tutuldu, enjektör sıcaklığı 270°C’ye çıkarıldı (200°C/dk), bu sıcaklıkta 3 dk süreyle tutuldu.

b-) Kolon: GC kolon sıcaklığı 100°C’den başlatıldı ve bu sıcaklıkta 1 dk tutuldu, sıcaklık 300°C’ye (20°C/dk) çıkarıldı, bu sıcaklıkta 10dk süreyle tutuldu.

#### 4.1.6. Safra asitlerinin fragmentasyon yapısı

Çalışılan safra asitlerinin derivatizasyonları oksim oluşumunu takip eden sililleme rekasiyonları ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre:

a-) Moleküler iyonlar  $[M]^+$  ve metil radikali eksik  $[M-CH_3]^+$  iyonları her bir asit için elde edildi.

b-) Cholic asit, Lithocholic asit, Chenodeoxycholic asit, 3-hydroxy,7-ketocholanic ve dehydrocholic asit için moleküler; 696, 520, 608, 621 ve 735 m/z değerine sahip iyonlar belirlendi.

c-) Asitlerin bir metil radikali kaybetmiş  $[M-CH_3]^+$  fragmentleri sırasıyla 681, 505, 593, 606 ve 720 m/z değerleri ile belirlendi.

#### 4.1.7. Optimum derivatizasyon şartlarının belirlenmesi

Çizelge 4.2.’da safra asitlerinin belirli pg/ $\mu$ L enjekte edilen konsantrasyonlarda, farklı oksimleştirme ve sililleme şartlarında elde edilen pik alanları ve %RSD değerleri belirlenen fragmentasyon kütleleri bazında verilmektedir.

Çizelge 4.2. Safra asitlerinin farklı derivatizasyon şartlarında elde edilen pik integrasyon birimleri ve %RSD değerleri

Derivatizasyon↓	İntegrasyon birimi/pg					
	Cholic	Lithocholic	Chenodeoxycholic	Ursodeoxycholic	3-hydroxy,7-keto	Dehydrocholic
Enjekte edilen pg→	865	844	866	848	3025	3221
1	37,413	17,436	31,082	16,196		
2	38,672	17,300	30,580	16,770	7,340	2,400
3	38,281	17,464	30,721	17,002	7,384	2,653
4	37,889	17,480	30,139	16,613	7,108	2,448
5	39,066	16,030	31,575	17,230	7,336	2,638
6	37,352	15,499	29,072	15,451	6,992	2,566
7	38,064	17,436	30,631	17,153	7,569	2,543
8	38,764	16,617	28,943	16,564	7,276	2,302
Ortalama (%RSD)	38,187(1.64)	16,907(4.57)	30,342(3.04)	16,222(3.50)	7,286(2.59)	2,507(4.90)

*Açıklama: 1-) Sadece sililleme (70°C-90dk); 2-) Oksimleştirme (70°C-30dk) + Sililleme (70°C-90dk); 3-) Oksimleştirme (70°C-30dk) + Sililleme (100°C-60dk); 4-) Oksimleştirme (70°C-30dk) + Sililleme (100°C-120dk); 5-) Oksimleştirme (70°C-60dk) + Sililleme (70°C-90dk); 6-) Oksimleştirme (100°C-30dk) + Sililleme (70°C-90dk); 7-) Oksimleştirme (100°C-90dk) + Sililleme (70°C-90dk); 8-) Oksimleştirme (100°C-120dk) + Sililleme (70°C-90dk). %RSD: farklı şartlarda elde edilen pikogram başına entegrasyon birimlerinin ortalamasının bağlı standart sapmasını ifade etmektedir.*

Çizelge 4.2.'deki sonuçlar değerlendirildiğinde safra asitlerinin kantitatif olarak düşük konsantrasyonlarda tayin edilebilmesi için oksimleştirme ve sililleme reaksiyonlarının her ikisi de gereklidir. Bu durum özellikle keto grubu içeren 3-hydroxy,7-ketocholanic asit ve dehydrocholic asit için daha da önemlidir (1 numaralı derivatizasyonda pik yok). Reaksiyon sıcaklığı olarak 70°C her iki basamakta optimum değer olarak belirlendi Farklı derivatizasyon şartları karşılaştırıldığında 2 ve 5 no'lu koşullarda birim pikogram asit başına elde edilen piklerin entegrasyon birimi en yüksek değerler olarak tespit edildi. Reaksiyon sürelerini göz önüne aldığımızda derivatizasyon şartlarından 2.'si optimum şart olarak kabul edilebilir.

#### **4.1.8. Farklı konsantrasyonlarda derivatize edilen asitlerin tayininde tekrarlanabilirlikleri**

Daha önceki çalışmalara ait bilgiler ışığında kolik asitlerin su ve atıksu çevrelerinde µg/L seviyesinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kolik asitlerin çevredeki konsantrasyonlarının tayininde tekrarlanabilirliği bu konsantrasyon mertebesinde gerçekleştirildi. Derivatize edilen SPE ekstraktların 1L numuneden elde edilmesi, vialde kullanılan reaktif hacim toplamının 375µL olması (NH<sub>2</sub>OH.HCl + HMDS + TFAA) ve derivatizasyon reaksiyonlarından sonra analitlerin HMDS ile 25 defa seyreltilip 1µL hacmin enjeksiyonu göz önüne alındığında; Enjekte edilen 1µL hacim çözeltilde 0,432-3,46 ng aralığında analit bulunmaktadır ve bu analit miktarı 4.1-3,42 µg/L su veya atıksu konsantrasyonuna denk gelmektedir. Bu verilere göre analitlerin tayin tekrarlanabilirliği (375µL x 0,432ng/µL x 25 seyreltme = 4,05 µg) ve (375µL x 3,46ng/µL x 25 seyreltme = 32,43 µg) konsantrasyon aralığında çalışıldı. Sonuçlar aşağıda Çizelge 4.3.'de verimiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda derivatize edilen safra asitlerinin tayin tekrarlanabilirlikleri.

Asit	tR (dk)	Derivatize edilen asit konsantrasyonu ( $10^{-9}$ M)*/enjekte edilen pg*					%RSD***
		7.5/432	15/864	30/1730	60/3460	Ortalama**	
		Entegrasyon birimi/pg					
Cholic	24.88	23,949 (6.21)	24,497 (4.15)	24,114 (4.18)	20,533 (4.89)	23,278	7.9
Lithocholic	24.92	7,989 (7.80)	8,098 (6.0)	7,238 (3.50)	6,596 (6.0)	7,775	6.0
Chenodeoxycholic	25.28	16,125 (7.2)	16,136 (7.2)	15,966 (8.4)	13,537 (5.0)	15,449	7.4
Ursodeoxycholic	25.81	9,692 (8.6)	9,980 (6.7)	9,038 (5.0)	7,689 (5.0)	9,570	5.0
3-Hydroxy,7-ketoch.	26.27	3,149 (12)	3,689 (4.27)	4,490 (1.81)	4,401 (8.1)	4,193	10.0
Dehydrocholic	27.55- 27.95	605 (2.9)	847 (2.10)	1,848 (5.2)	2,630 (10)	Kalibrasyon eğrisi	

Açıklama: (\*) =  $375\mu\text{L}$  çözeltildeki Molar konsantrasyon ve enjekte edilen pg'ı ifade etmektedir.

(\*\*) = Ortalama değerler; ayrı yapılan iki derivatizasyon işleminden elde edilen analit çözeltilerinin her birinin 3 defa enjeksiyonundan elde edilmiştir.

() = Parantez içindeki değerler aynı miktarlarda asitlerin pikogram başına pik alanlarının bağıl standart sapmasının ifade etmektedir(%RSD)

%RSD\*\*\* = Farklı miktarlardaki kolik asitlerin pikogram başına pik alanlarının bağıl standart sapmasını ifade etmektedir.

Safra asidi tayinlerinin % RSD bazında değerlendirilen tekrarlanabilirliği ve doğrusalıkları; cholic, lithocholic, chenodeoxycholic ve ursodeoxycholic asitler için % 7.9 RSD  $\geq$  mertebesinde ve ortalama % 6.6 RSD değerine sahiptir, 3-hydroxy,7-ketocholanic asit ve dehydrocholic asit için tayin tekrarlanabilirliği ve doğrusalık, limit değerlerde (%RSD\*\*\* = 10, ketocholanic asit için) veya kalibrasyon doğrusundan (dehydrocholic asit için) elde edilebilir.

#### 4.1.9. Safra asitlerinin geri kazanım değerleri

Çizelge 4.4.'de Oasis HLB katışı kullanılarak belirlenen geri kazanım değerleri % 77 (Lithocholic asit) ile % 104 (3-hydroxy, 7-ketocholanic asit) arasında değişmektedir. Çözeltilerin pH değerlerinin asitlerin geri kazanım miktarları için önemli bir etki göstermemiştir. Asit türü ve pH'dan bağımsız olarak geri kazanım ortalama % 93.4 değeri ve % 7.2 RSD ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge.4.4. SPE ekstraksiyonda elde edilen geri kazanım değerleri

Atıksudaki konsantrasyon		% Geri kazanım			
		pH2	pH4	pH7	Ortalama (pH 2,7)
Cholic:	60 µg/L	95(4.40)	95(6.3)	96(3.68)	95.3(0.60)
Lithocholic:	66 µg/L	77(5.92)	77(0.10)	90(3.4)	81.3(9.2)
Chenodeoxycholic:	66 µg/L	89(5.1)	92(3.91)	91(2.54)	90.7(1.68)
Ursodeoxycholic:	51 µg/L	99(7.8)	97(7.8)	95(5.0)	97.0(2.06)
3-hydroxy,7-keto.:	36 µg/L	104(10)	103(11)	97(11)	101.3(3.74)
Dehydrocholic:	255 µg/L	90(12)	94(6.8)	101(6.4)	95.0(5.9)
Bütün asitler için ortalama % geri kazanım					93.4(7.3)

*%RSD değerleri 3 paralel çalışmada ve her çalışmanın üç defa enjeksiyonu ile elde edilmiştir. Derivatize edilen bileşikler.*

#### 4.1.10. Metot optimizasyonu yapılan safra asitlerinin gerçek numunelerde tayini

Safra asitlerinin atık sularındaki kalitatif ve kantitatif tayinleri daha önce belirlenen derivatizasyon işlemleri ile oluşan moleküler ve fragment iyonları temelinde atıksu arıtma tesisi girişlerinden ve nehir sularında gerçekleştirildi (Çizelge 4.5.). Sonuçlara göre:

a-) Tayini yapılan asitlerin miktarları ekstarksiyonu yapılan atık su miktarına bağlıdır (1L ve 0.5L).

b-) Atıksu arıtma girişlerinden alınan su numunelerinde başlıca tayin edilen asitler cholic asit ve lithocholic asit (66.6 – 141 µg/L) olmakla birlikte chenodeoxycholic, 3-hydroxy,7-ketocholanik ve ursodeoxycholic asitler sırasıyla  $\leq 46.4\mu\text{g/L}$ ,  $\leq 19.6\mu\text{g/L}$  ve  $\leq 48.64\mu\text{g/L}$  konsantrasyonlarda tayin edildiler.

c-) Nehir sularında cholic ve lithocholic asit 3L numune hacminden ve sadece düşük µg/L konsantrasyonlarda tayin edildi.

d-) En fazla sayıda asit pH 4 ayarlı olan numunelerde tespit edildi. Bunun dışında pH değişiminin tayin miktarı ve sıklığında fazla etkili olmadı.

Çizelge 4.5. Gerçek atık su numunelerinde tayin edilen safra asitleri ve konsantrasyonları.

Asit	Tayin edilen ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>δ</sup>										
	Eylül : SPE (OASIS)*		Ekim:SPE(OASIS)*			Kasım:SPE(OASIS)*		Kasım:SPE(STRATA)*		Temmuz#ww	Ocak#rw
Numune-pH	pH4		pH2	pH4	pH7	pH4	pH7	pH4	pH7	pH4(OASIS)	pH4(OASIS)
Numune hacim (L)	1L	0.5L	0.5L			0.5L		0.5L		1L	3L
Cholic	104(7.3)	105(5.6)	82.2(7.5)	122(8.1)	101(4.6)	79(2.5)	77.4(4.7)	75.2(8.6)	66.6(7.1)	82.0(8.7)	1.94(8.8)
Lithocholic	70.3(8.5)	71.6(8.1)	105(7.6)	141(6.6)	124(5.3)	79.3(4.3)	84.7(2.4)	73.0(8.6)	74.0(7.3)	55.8(8.1)	1.73(1.9)
Chenodeoxycholic	44.1(7.6)	44.6(5.6)	31.7(7.6)	46.4(7.2)	38.7(6.7)	28.7(5.4)	29(2.9)	26.5(5.4)	24.3(8.8)	23.0(5.2)	0.44(1.7)
Ursodeoxycholic	15.9(7.9)	15.7(8.2)	13.8(7.4)	19.6(4.9)	15.2(6.2)	9.4(7.7)	13.1(2.0)	9.6(8.0)	10.9(7.4)	12.1(5.3)	t.e
3-Hydroxy,7-ketocholanic	48.6(7.4)	43.5(7.1)	15(9.4)	26.8(8.1)	44.8(7.5)	t.e	14.3(7.8)	t.e	9.4(7.9)	4.2(8.7)	t.e
Toplam konsantrasyon	283	280	248	356	324	196	219	184	185	156	4.00

t.e: Tayin edilemedi, \*: 2007 numuneleri, #: 2008 numuneleri, ww: arıtma girişi atıksu, rw: nehir suyu,  $\delta$ : ortalama konsantrasyon değerleri ve %RSD değerleri 3 ayrı paralel ekstraksiyon ve derivatizasyondan elde edilen analitlerin 3'er defa enjeksiyonları ile elde edilmiştir.



## SONUÇLAR

- 1-) Belirlenen altı adet safra asidinin gaz kromatografi ile ayrımı ve kütle spektroskopisi ile kantitatif tayini optimize edildi.
- 2-) Oksimleştirme ve sililleme reaksiyonlarının zaman ve sıcaklık fonksiyonuna karşı verdikleri türevlendirilmiş(derivatize) ürünler dğerlendirildi ve her iki basamağın optimizasyonu ile analitlerin kantitatif olarak tayinine olanak verecek bileşikler elde edildi.
- 3-) Altı adet kolik asit için derivatizasyon sonrası analizlerde tR değerleri ve bileşiklerin fragmentasyon iyonları derivatizasyon moleküllerinden  $-CH_3$ ,  $-TMSO$ ,  $-TMSOH$ ,  $-Si(CH_3)$  ve diğer grupların ayrılması ile spektrometrik olarak belirlendi.
- 4-) Katı faz ekstraksiyonları pH, konsantrasyon, kartuş türü, numune hacmi parametreleri ile optimize edildi.
- 5-) Optimize edilen metod ile yeni bir kirletici bileşik grubun tayini atıksular ve nehir sularına uygulandı

## 5. DENEYSEL KISIM-2

### Kullanılan Araç ve Gereçler

Salisilik asit (Supelco Aldrich)	Hekzan (Supelco)
Propanolol (Supelco Aldrich)	Metanol (Supelco)
Benzoik asit (Supelco Aldrich)	Etil asetat (Supelco)
Estron (Supelco Aldrich)	Hekzametildisilazan (HMDS) (Merck)
Kafein (Supelco Aldrich)	Trifloro asetik asit (TFAA) (Merck)
Klofibrik asit (Supelco Aldrich)	Cartridge Oasis HLB
Fenoprofen (Supelco Aldrich)	Cartridge Oasis MCX
Bezafibrat (Supelco Aldrich)	Cartridge Lichrolut (Merck)
Metoprolol (Supelco Aldrich)	Cartridge Florisil (Supelco)
İbuprofen (Supelco Aldrich)	Pyridine (Merck)
Naproksen (Supelco Aldrich)	Hidroksilamin hidroklorür (Merck)
Ketoprofen (Supelco Aldrich)	
Diklofenak (Supelco Aldrich)	
Dietil ftalat (Supelco Aldrich)	
Dibutil ftalat (Supelco Aldrich)	
Bis-2-etil heksil ftalat (Supelco Aldrich)	
HMDS: Hekza metil di silazan (Supelco-Aldrich)	
BSTFA: N-metil-N-terciyer –butil dimetil silil-trifloroasetamid (Supelco-Aldrich)	
MSTFA: N-metil-N-terciyer (trimetil silil) trifloroasetamid	
GC-MS (Trace GC-DSQII Quarupole analyser) Thermo	
Vakum sistemi: Visiprep DL vacuum manifold for 12 sample (Supelco, Bellefonte, USA)	
Stuart SBH 150D: Blok ısıtıcı (12 Hazneli)	
Mars X-Traction: Mikrodalga hızlandırılmış reaksiyon sistemi (24 Hazneli-CEM)	

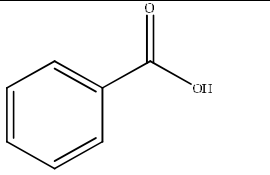
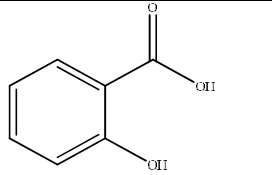
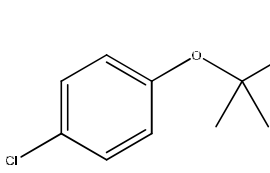
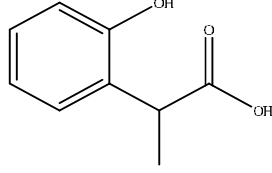
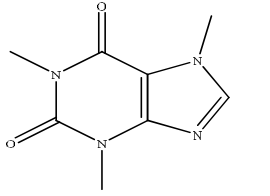
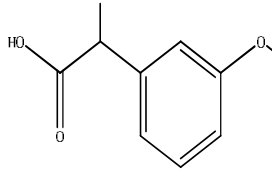
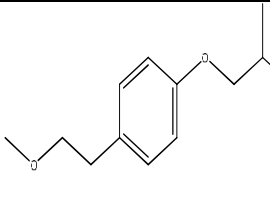
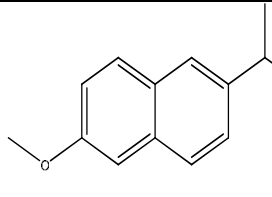
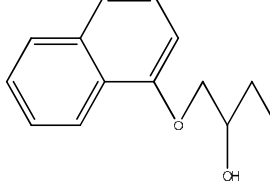
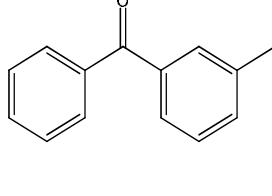
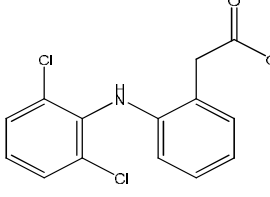
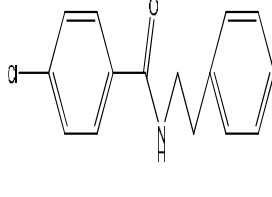
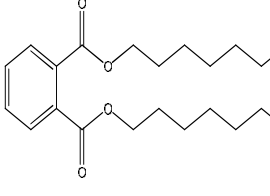
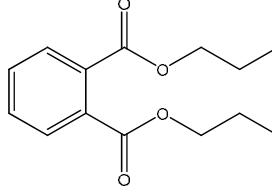
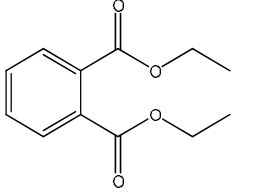
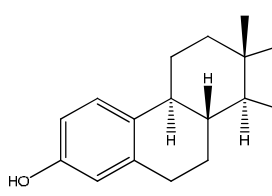
### 5.1. EDC ve PhAC Bileşiklerin Seçimi

Bu bölümde sanayi kuruluşlarının ve yerleşim birimlerinin yoğun olduğu Tekirdağ ili Çerkezköy-Çorlu-Lüleburgaz ilçelerinde ilk olarak EDC ve PhAC bileşiklerinin varlıklarını belirlemesi amaçlandı, çalışılan bileşiklerin tamamına yakını farmasötik aktif maddelerden seçilmiştir bu bileşikler ateş düşürücü (Naproksen, Ketoprofen), lipid regülatörleri (Klofibrinik asit), stimulantlar (Kafein), analjezik(salisilik asit) ve endokrin bozucu (di-n-oktil ftalat, bis-2-etilheksil ftalat, di-etil ftalat) gibi farklı sınıflara ait olup, bu bileşiklerin varlıkları sanayi atıksularında belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışılan analitler suda düşük buhar basıncına sahip olup asidik ve bazik karakterli olarak sınıflandırılmaktadır.

İlaç bileşiklerinin ve metabolitlerinin su havzalarında ve nehirlerde varlıklarının belirlenmesi önemli bir çevre konusudur. Dünya genelinde reçeteli ve reçetesiz ilaçların yıllık kullanılan miktarının binlerce ton olduğu tahmin edilmektedir(Kosjek v.d, 2005). Farmasötik maddelerin çevreye salınımları insanlar ve hayvanlar üzerindeki tıbbi ve tedavi amaçlı uygulamalarından kaynaklanmaktadır. İlaçlar genellikle vücut tarafından absorbe edilir ve arta kalan aktif bileşenler ve metabolit kısımları idrar ve dışkı ile atılır. Bu artıklar genellikle evsel atıksularla arıtma tesislerine veya arıtılmadan çevreye geçer. Son çalışmalar insan tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir kısmının su havzalarına geçişi ile sonlanan atıksu ve çamur arıtma tesislerinde bertaraf edilemediğini göstermektedir(Robert ve Thomas, 2006). Buna benzer çalışmalarda büyük miktarlarda ilaç aktiflerinin çeşitli nedenlerle kullanılmadan atıldığını da ortaya koymaktadır. Araştırmalar aktif ve inaktif metabolitleri içeren 80'den fazla ilacın Avrupa, Kanada, Brezilya ve Amerikadaki yüzey sularında tespit edildiğini not etmiştir. Çizelge 5.1'de tarafımızdan seçilen ve tayin çalışmaları yapılan EDC ve PhAC analitlerinin kimyasal yapıları verilmiştir.

Çizelge 5.1. Analit olarak seçilen EDC ve PhAC bileşiklerinin kimyasal yapıları

1-) Benzoik Asit		
2-) Salisilik Asit	1	2
3-) Klofibrik Asit		
4-) ibuprofen	3	4
5-) Kafein		
6-) Fenoprpfen	5	6
7-) Metoprolol		
8-) Naproksen	7	8
9-) Propanolol		
10-) Ketoprofen	9	10
11-) Diklofenak		
12-) Bezafibrat	11	12
13-) Di-n-oktil ftalat		
14-) Dibutil ftalat	13	114
15-) Dietil ftalat		
16-) Estron	15	16

## 5.2. EDC ve PhAC bileşiklerinin kromatografik ve kütle spektrum özelliklerinin optimizasyonu

### 5.2.1. EDC ve PhAC bileşiklerinin alıkonma zamanları ve kütle fragmentlerinin belirlenmesi

Seçilen 16 bileşiğin ana standart çözeltilerinden istenilen hacimlerde alınarak bu bileşiklerin tümünü içeren çalışma çözeltisi (587–2291pg/ $\mu$ L konsantrasyon aralığında) hazırlandı. Bu çözeltiden alınan 250  $\mu$ L'lik hacimler 4 mL'lik reaksiyon viallerine alınarak rotavaporatör yardımıyla kuruluğa kadar uçuruldu.

Bileşiklerin derivatizasyonunu gerçekleştirmek için kuruluğa kadar uçurulan viallere:

Sililleme işlemlerinde: 125  $\mu$ L piridin + 250  $\mu$ L heksametildisilazan + 30  $\mu$ L trifloro asetik asit konuldu.

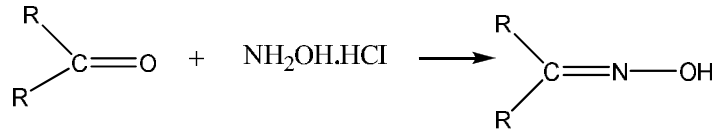
Oksimleştirme + Sililleme işlemlerinde: 125 $\mu$ L (Piridin içinde % 2.5 hidroksilamin hidroklorür) + 250  $\mu$ L heksametildisilazan + 30  $\mu$ L trifloro asetik asit konuldu.

**Oksimleştirme + sililleme işleminde:** Oksim oluşum reaksiyonunda (125 $\mu$ L % 2.5 NH<sub>2</sub>OH.HCl varlığında) 70<sup>0</sup>C–60 dk reaksiyon şartları altında vialin konulduğu blok ısıtıcıda uygulandı. Daha sonra oksimleştirme reaksiyonuna tabi tutulan bileşikler sililleme için heksametildisilazan ve trifloro asetik asit konarak yine 70<sup>0</sup>C–60 dk reaksiyon şartları altında silillemeye tabi tutuldu.

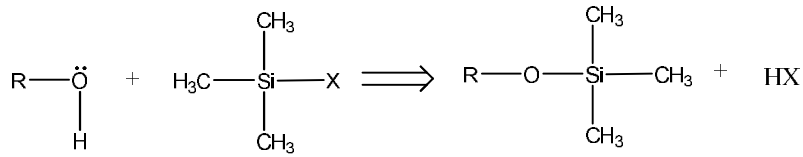
**Sililleme işleminde:** 125  $\mu$ L piridin + 250  $\mu$ L heksametildisilazan + 30  $\mu$ L trifloro asetik asit konularak blok ısıtıcıda 70<sup>0</sup>C–60 dk reaksiyon şartları uygulandı.

Oksimleştirme işleminde amaç karbonil grubuna sahip bileşiklerin önce oksim türevine dönüştürmek daha sonra da sililleme işlemi ile bu oksim grubundaki hidroksil grubunun hidrojeni yerine alkil silil bağlayarak molekülün daha iyi kromatografik özellikler göstermesini sağlamaktır. Aşağıda oksimleştirme ve onu takip eden sililleme reaksiyonlarının mekanizması verilmiştir.

Oksimleştirme reaksiyonu:



Sililleme reaksiyonu:



X: NHSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

Derivatizasyon işlemlerinden sonra elde edilen trimetilsilil (-TMS) türevlerinin kromatografik ayrımı ve kütle fragmentlerinin belirlenmesi amacıyla çözeltiler 1µL hacminde aşağıdaki şartları taşıyan GC-MS (Trace GC-DSQ II MS) sistemine enjekte edildi.

İnjektör modu ve sıcaklığı: Splitless – 270<sup>0</sup>C

Kolon tipi: TR-5 (60m x 0.25mm x 0.25µm)

Kolon sıcaklık programı: 100<sup>0</sup>C'den 280<sup>0</sup>C'ye (15<sup>0</sup>C/dk), 280<sup>0</sup>C'de 25 dk.

Helium akışı: 1ml/dk

İyon Kaynağı: 200<sup>0</sup>C

GC-MS arayüzü: 280<sup>0</sup>C

Kütle analizörü: Full Scan (m/z:50-650)

Analit bileşikler için elde edilen kolon alıkonma zamanları ve bileşiklerin kütle fragmentleri aşağıdaki Çizelge 5.2.'de verilmiştir. Oksim ve sililleme reaksiyonlarının birlikte yapıldığı viallerdeki bileşiklerin GC-MS kromatogramları, düşük tekrarlanabilirlik özellikleri nedeniyle bu ikili reaksiyonun yerine sadece sililleme reaksiyonunun kullanılmasına karar verildi

Çizelge 5.2. EDC ve PhAC bileşiklerinin oksim-silil türevlerinin tutunma zamanı (tR) ve kütle fragment yapıları

Bileşik	pKa	Mw	t <sub>R</sub> (dk)	m/z[M] <sup>+</sup>	[M-15] <sup>+</sup>	Diğer iyon(m/z)
1-Benzoik asit	4.20	122.1	5.53	194	179	134,105
2-Salisilik asit	3.00	138.1	5.88	282	267	105,73
3-Dietil ftalat	7.84	222.09	7.08	222	-	149,177
4-Klofibrik asit	3.00	214.7	7.22	287	272	128
5-İbuprofen	4.91	206.3	7.27	278	263	160,234
6-Dibutil ftalat	3.79	278.3	8.56	223	-	149,205
7-Kafein	10.40	194.2	8.80	194	-	109
8-Fenoprofen	4.50	242	9.18	314	299	91,103
9-Metoprolol	9.60	267.4	9.22	411	396	324,339
10-Naproksen	4.20	230.3	9.32	302	287	185,243
11-Propanolol	9.45	259.3	9.38	331	316	215,216,259
12-Ketoprofen	4.45	254.3	9.44/9.55	413	398	324
13-Diklofenak	4.15	295	11.19	367	352	214,242,277
14-Di-n-oktil ftalat	4.21	390.05	11.70	390	-	149,279
15-Bezafibrat	-	361.83	12.33	456	441	260,168
16-Estron	-	370.6	13.43	429	414	341,342

Çizelge 5.2.'de elde edilen alıkonma zamanları ve kütle fragmentleri ftalatlar ve kafein gibi analitlerin derivatizasyon reaksiyonuna uygun fonksiyonel gruplar taşımamasından dolayı orijinal molekül yapısından gerçekleştirildi.

### 5.2.2. Optimum derivatizasyon reaktifinin belirlenmesi

Seçilen analitler için en uygun derivatizasyon reaktifinin belirlenmesi işleminde üç farklı reaktif aynı reaksiyon şartları altında iki farklı biçimde kullanıldı. Birinci reaksiyonlarda sadece HMDS reaksiyon ortamına piridin ilave edildi, ikinci reaksiyonlarda üç reaktife de piridin ilave edildi.

**1. ve 2. HMDS reaksiyonu:** 12 bileşiği içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 250 µL alınarak rotevaporatörde 40<sup>0</sup>C'de kuruluğa kadar uçuruldu ve vialere 125 µL piridin + 250 µL HMDS + 25 µL trifloroasetik asit konularak (toplam çözelti hacmi 400µL) 70<sup>0</sup>C-60 dk süreyle blok ısıtıcıda tutuldu.

**1. BSTFA reaksiyonu:** 12 bileşiği içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 250 µL alınarak rotevaporatörde 40<sup>0</sup>C'de kuruluğa kadar uçuruldu ve vialere 400 µL BSTFA konularak 70<sup>0</sup>C-60 dk süreyle blok ısıtıcıda tutuldu.

**2. BSTFA reaksiyonu:** 12 bileşiği içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 250 µL alınarak rotevaporatörde 40<sup>0</sup>C'de kuruluğa kadar uçuruldu ve vialere 150 µL piridin +250 µL BSTFA konularak 70<sup>0</sup>C-60 dk süreyle blok ısıtıcıda tutuldu.

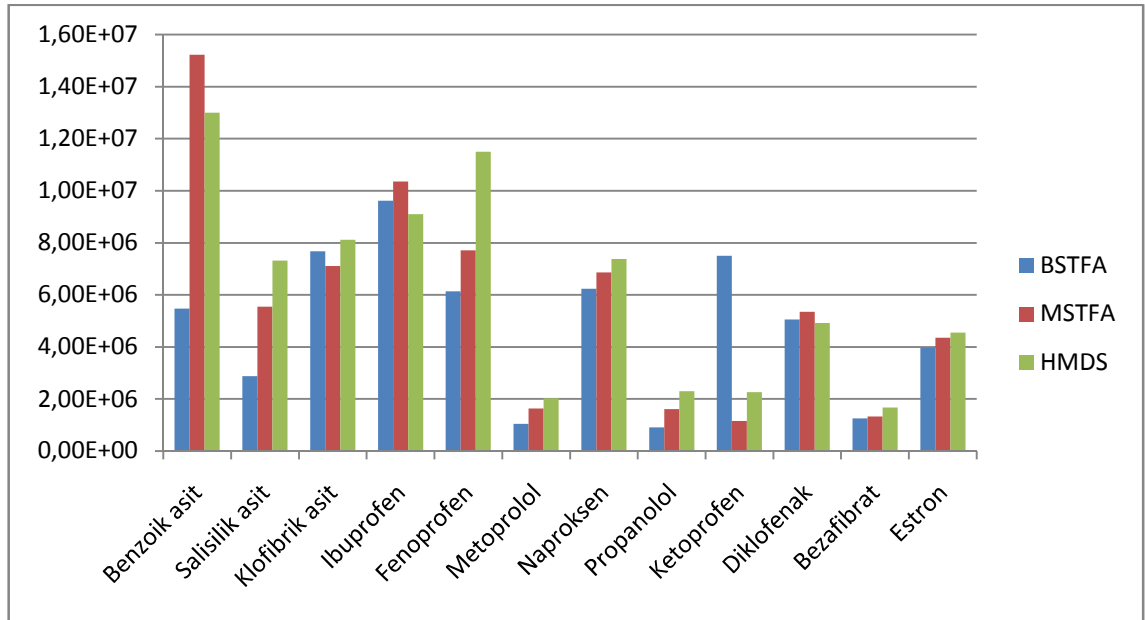
**1. MSTFA reaksiyonu:** 12 bileşiği içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 250 µL alınarak rotevaporatörde 40<sup>0</sup>C'de kuruluğa kadar uçuruldu ve vialere 400 µL MSTFA konularak 70<sup>0</sup>C-60 dk süreyle blok ısıtıcıda tutuldu.

**2. MSTFA reaksiyonu:** 12 bileşiği içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 250 µL alınarak rotevaporatörde 40<sup>0</sup>C'de kuruluğa kadar uçuruldu ve vialere 125 µL piridin + 250 µL MSTFA konularak 70<sup>0</sup>C-60 dk süreyle blok ısıtıcıda tutuldu.

Birinci denemelerin sonucu Şekil 5.1. (A)'da tablo şeklinde özetlenmiştir. Farklı reaktiflerle gerçekleştirilen derivatizasyon sonucunda analitler için elde edilen pik alanlarına paralel olarak reaksiyon etkinlikleri gösterilmektedir. HMDS için 12 analitin içerisinde 5 tanesi için en iyi pik cavabı verdiği ondan sonra MSTFA için bu bileşiklerin 3 tanesi için en etkin olduğu görülmektedir. BSTFA analitinin özellikle



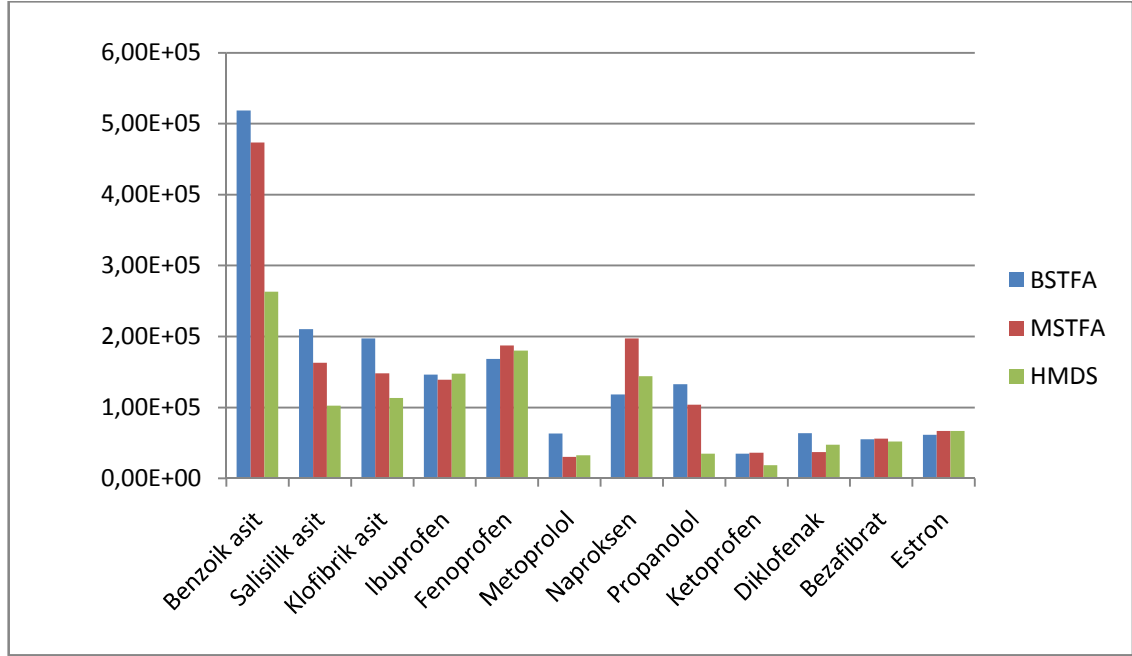
ketoprofen için etkin olduğu ortaya çıkmaktadır. Benzer çalışmalarda en popüler reaktif olarak BSTFA seçilmesine rağmen bizim denemelerimizde MSTFA daha etkin olarak görülmektedir, bu durumun açıklanması BSTFA reaktifinin solvent bağımlı reaksiyon etkinliği göstermesi (Li ve Park.,2001) ve bizim denemelerde sadece reaktifin kendisinin kullanılması olarak açıklanabilir. Ayrıca BSTFA reaktifinin nemden çok çabuk etkilenmesi de düşük reaksiyon etkinliğine sebep olabilir (Rodriguez v.d, 2003). HMDS reaktifinin diğer iki reaktife göre daha zayıf reaktif özellikleri taşımasına rağmen geri parçalanma reaksiyonunun az olması, piridin çözücüsünün kullanılması buna bağlı olarak daha iyi pik alanları vermesi ile açıklanabilir.



Şekil 5.1. PhAC bileşiklerinin derivatizasyonunda reaktif etkinlikleri (A)

İkinci denemelerin sonuçları Şekil 5.1. (B)'de görülmektedir. Buradaki en önemli farklılık pirdinsiz ortamda HMDS reaktifine göre düşük etkinlik gösteren BSTFA ve MSTFA reaktiflerinin ikinci denemelerde estron dışında bütün bileşikler için daha iyi reaksiyon verimi göstermesidir. BSTFA 13 bileşikten 7 tanesi için en yüksek etkinliği gösterirken MSTFA, fenoprofen, naproksen, ketoprofen ve bezafibrat için daha

yüksek verimler göstermiştir. Sonuç olarak gerçek numunelerdeki tayinler için BSTFA en etkin reaktif olarak seçilmiştir.



Şekil 5.1. PhAC bileşiklerinin derivatizasyonunda reaktif etkinlikleri (B)

### 5.2.3. Optimum reaksiyon şartlarının belirlenmesi

Reaksiyon şartlarının optimizasyonu işleminde reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve reaksiyonun gerçekleştirildiği sistem parametreleri gibi değişkenler arasından en uygun kombinasyon belirlenmeye çalışıldı. Bunun için blok ısıtıcılı ve mikro dalga eşlenik reaksiyon sistemi gibi iki farklı reaksiyon cihazı farklı sıcaklık ve sürelerde çalıştırıldı.

1-) Blok Isıtıcılı Reaksiyon Sistemi: 12 analiti içeren (kafein ve ftalatlar hariç) stok çözeltilerden 3 adet reaksiyon vialine 250µL alınarak rotevaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu, her birine 125µL piridin +250 µL HMDS + 30µL trifloroasetik asit konularak

sırasıyla 15, 30 ve 60 dk. süreyle 70°C’de reaksiyona tabi tutuldu. Analitlerin pik alanları integre edildi.

2-) Mikrodalga Eşlenik Reaksiyon Sistemi: 12 analiti içeren (kafein ve flatlatlar hariç) stok çözeltiden 3 adet reaksiyon vialine 250 µL alınarak rotevaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu, her birine 125 µL piridin + 250 µL HMDS +30 µL trifloroasetik asit konularak 800W mikrodalga enerjisi varlığında sırasıyla 15, 30 ve 60 dk. süreyle 70°C’de reaksiyona tabi tutuldu. Analitlerin pik alanları integre edildi.

Çizelge 5.3’de farklı reaksiyon sistemlerinde ve farklı parametrelerde elde edilen pik alanlarının toplamına karşılık her bir reaksiyondan elde edilen pik alanları % kesir olarak gösterilmektedir.

Çizelge 5.3. Farklı reaksiyon sistemlerinde ve parametrelerde reaksiyon etkinliği

Reaksiyon parametre	Pik alan % kesirleri						Toplam alan kesri
	B 15 dk	MW 15 dk	B 30 dk	MW 30 dk	B 60 dk	MW 60 dk	
Benzoik asit	9.2	13.3	11.1	16.1	24.5	25.9	100
Salisilik asit	8.8	13.3	17.3	17.6	19.9	23.1	100
Klofibril asit	17.6	16.4	15.2	16.6	16.7	17.6	100
Ibuprofen	14.9	18.8	15.6	16	16.8	17.8	100
Fenoprofen	11.6	16.1	15.7	15.5	17.3	23.8	100
Metoprolol	18.1	16.4	15.5	13.1	17.9	19.1	100
Naproksen	14.8	14.5	15.3	15.4	17.4	22.5	100
Propanolol	21.2	13.6	14.8	17.7	16.6	16.1	100
Ketoprofen	5.8	13	15	19.4	18.8	27.9	100
Diklofenak	7.1	13.2	17.3	18.8	22.4	21.3	100
Bezafibril	14.1	14.8	14.3	14.8	20.6	21.4	100
Estron	13.3	14.3	15	16.5	19.4	21.5	100

B: Blok Isıtıcı reaksiyon sistemi, MW: Mikrodalga eşlenik reaksiyon sistemi

Çizelge 5.3.’de elde edilen sonuçlara göre benzoik asit, salisilik asit, ketoprofen ve diklofenak gibi analitlerde 15 dakika blok ısıtıcılı reaksiyona göre aynı süredeki mikrodalga eşlenik reaksiyon oldukça yüksek sililleme oranı sağlamakta, buna karşın klofibril asit, metoprolol, propanolol ve bezafibril bileşiklerinde her bir reaksiyon benzer verimler sağlamaktadır. Genel olarak 60 dk blok ve aynı süredeki mikrodalga eşlenik reaksiyonlar birbirine yakın pik alanları vermektedir. Metoprolol ve propanolol

için reaksiyon parametrelerinin pik alanı üzerinde önemli bir etkisi görülmemektedir bu da sterik engelli moleküllerde elektrotermal enerji veya mikrodalga enerjili reaksiyonun belirleyici bir faktör olmadığını ortaya koymaktadır.

#### 5.2.4. Analitlerin atıksulardaki ekstraksiyon verimleri

Analitlerin ekstraksiyon verimleri metodun hassasiyetini belirleyen en önemli parametrelerden biridir. Yapılan denemelerde gerçek atıksu numunelerine farklı konsantrasyonlarda analit ilave edildi ve daha sonra üç farklı sorbent (Lichrolute RP-18, Oasis MCX ve Oasis HLB) kullanılarak katı faz ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

##### *SPE kartuşlarının şartlandırılması:*

Kartuşların şartlandırılması üretim esnasında sorbent üzerinde meydana gelebilecek kirlilikleri uzaklaştırmak ve sorbentin fonksiyonel uçlarını etkin hale getirme amacı taşır. Şartlandırma işlemi aşağıdaki sırayla yapıldı:



##### *Analitlerin SPE ekstraksiyonu:*

Her birinin konsantrasyonu 1, 4, 16 µg/L olacak şekilde ana stok çözeltilerden alınan belirli hacimler, whatmann süzgeç kağıdı ile filtrelenmiş 3 adet 1L hacminde gerçek atık su numunesine karıştırıldı, %5 HCl - %5 NH<sub>3</sub> çözeltilerinin kullanımıyla pH 4 olarak ayarlandı, analitlerin su fazındaki çözünürlüğünü artırmak için % 5 oranında (50 mL) metanol ilave edildi.

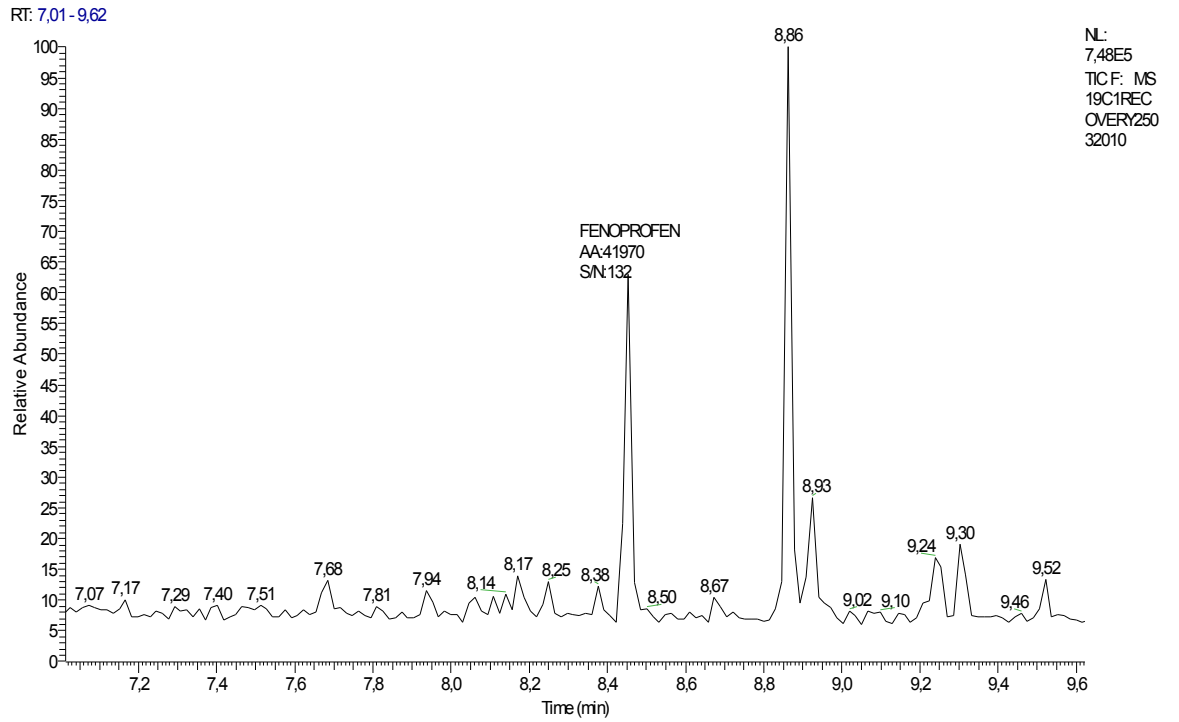
İstenilen konsantrasyona sahip 1L hacmindeki çözeltilerden 250ml hacimler alınarak vakum altında Lichrolut RP-18, Oasis MCX ve Oasis HLB kartuşlarından 4-5 ml/dk akış hızında geçirildi. SPE işlemi tamamlandıktan sonra kartuşlar vakum uygulanarak hava akımı altında kurutuldu.

*Analitlerin elüsyonu:*

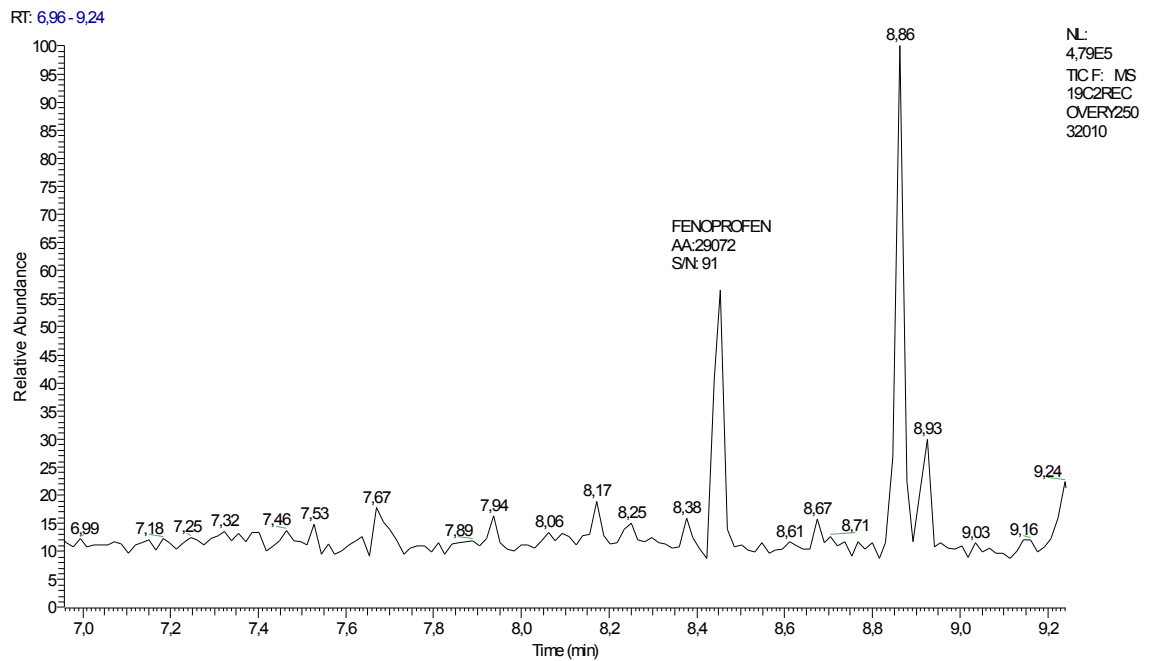
Oasis HLB kartuşu ve 250 ml hacim ve 4µg/L konsantrasyonda pH4 olacak şekilde başaklanmış analitlerin elüsyonunda farklı polaritede çözücüler denendi, benzer çalışmalarda farmasötik bileşiklerin elüsyonunda daha polar olan metanol içeren çözücü serileri yaygın biçimde kullanıldığını ve analitlerin elüsyonunda etkin olduğu belirtilmiştir (W.C. Linn v.d. 2005). Çalışmamızda aseton, etil asetat, asetonitril ve metanol çözücüleri ile yapılan elüsyon işlemlerinde genel olarak bütün bileşikler için metanol içeren çözücü serileri varlığında elüsyon veriminin arttığı saptandı. Aşağıda bu çözücü serileri verilmiştir.

- 1-) Aseton + Metanol (5ml +10ml)
- 2-) Aseton + Etil asetat (5ml + 10ml)
- 3-) Etil asetat + Metanol (5 + 10ml)
- 4-) Etil asetat + Asetonitril (5ml + 10ml)

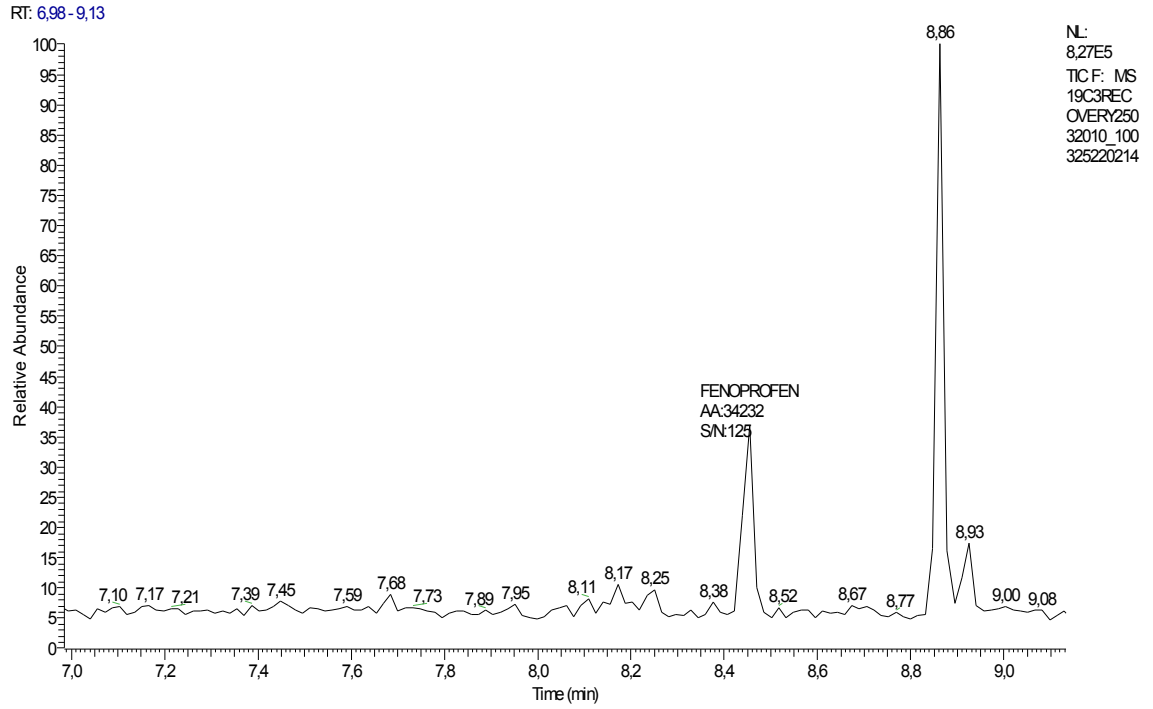
Özellikle pKa değeri küçük bileşenlerin metanol varlığında daha iyi elüsyon özellikleri gösterdikleri saptandı. Buna karşın gerçek atıksu numunelerinde tekstil boyar maddelerinin yüksek konsantrasyonda bulunması ve kartuşlar tarafından tutulması sonucunda elüsyon işleminde analitlerle birlikte gelen bu polar yapılı (asidik azo boyalar) bileşikler bir sonraki derivatizasyon basamağında kromatogramlarda kaynağı belirsiz ve analit pikleri ile örtüşen pikler verdi. Bu problem nedeniyle gerçek numunelerin analizinde boyar maddelerin elüsyonuna neden olmayan 2 no'lu aseton-etil asetat serisi kullanıldı. Aşağıda verilen kromatogramlar asidik özellik gösteren fenoprofen için elde edilen pik alanları ve S/N (sinyal/gürültü) değerlerini vermektedir. Kromatogramlarda en yüksek elüsyon veriminin 1 no'lu aseton-metanol serisi ile sağlandığı görülmektedir. Seri1-Şekil 5.2., Seri2-Şekil 5.3., Seri3-Şekil 5.4. ve Seri4-Şekil 5.5. fenoprofenin farklı elüsyon serilerinde pik alanına bağlı olarak elde edilen elüsyon verimini ortaya koymaktadır.



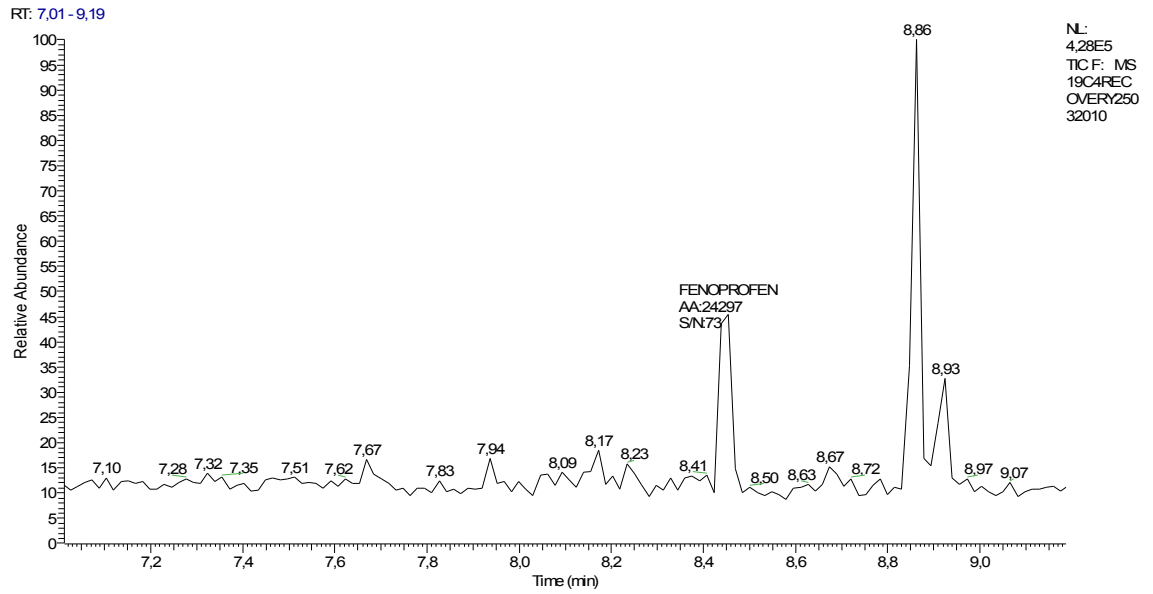
Şekil 5.2. Aseton-metanol elüsyonu



Şekil 5.3. Aseton-etil asetat elüsyonu



Şekil 5.4. Etil Asetat-metanol elüsyonu



Şekil 5.5. Etil Asetat-asetonitril elüsyon

### 5.2.5. Katı faz ekstraksiyonunda sorbent seçimi

Analit bileşiklerin çalışılan atıksu ortamından yüksek verimle izolasyonunu sağlamak için farklı sorbent tipleri değerlendirildi. Bu amaçla 16 adet analit whatmann kâğıdından filtrelenmiş 250 ml atıksuya 1, 4, 16 µg/L olacak şekilde ana standart çözeltilerden başaklandı, pH 4'e ayarlanan çözeltiler önceden şartlandırılan 3 farklı tipteki sorbentten 4-5 ml/dk akış hızında geçirildi. Kurutulan kartuşlar aseton-etil asetat çözücü serisi ile elüe edildi, elüent kuruluğa kadar uçuruldu ve 70<sup>0</sup>C-60 dk şartlarında HMDS ile derivatizasyon gerçekleştirildi reaksiyon çözeltilisinden 1µL GC-MS'e enjekte edildi.

Çizelge 5.4.'de verilen sonuçlara göre 1µg/L konsantrasyondaki atıksuların katı faz ekstraksiyonunda benzoik asit, salisilik asit, metoprolol ve propanolol analitleri için Lichrolut sorbenti ile elüsyon gerçekleşmemiş MCX sorbentinde benzoik asit ve salisilik asit için sırasıyla % 8 ve % 9 gibi çok düşük ekstraksiyon verimleri elde edilirken metoprolol ve propanolol için % 22 ve % 43 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. HLB sorbentinde bu dört bileşik için sırasıyla % 44, % 40, % 25 ve % 38 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Klofibrik asit için her üç sorbent düşük geri kazanım özellikleri göstermiştir (% 18, % 21, % 18). Asidik özellikli bileşikler için düşük konsantrasyonlarda elde edilen düşük ekstraksiyon verimleri atıksudaki olabilecek muhtemel hümik asit ve yüksek boyar madde konsantrasyonları ile açıklanabilir (H. Hühnerfuss v.d. 2004)

Oasis HLB sorbentinin diğer iki sorbente kıyasla ftalatlar, estron ve kafeinde daha iyi ekstraksiyon verimi göstermesi sorbent kütlelerinin büyük olması ve gelişkin lipofilik özellikleri göstermesi sonucudur. Buna karşın asidik karakterli klofibrik asit, bezafibrat ve ibuprofende MCX verimleri daha yüksek olmuştur.

Analizlerin tekrarlanabilirliğini ifade eden rölatif standart sapmalara bakıldığında asidik özellikli benzoik, salisilik, klofibrik asit ve metoprolol ile propanolol analitlerinde yüksek % RSD değerleri elde edilmiştir.



Çizelge 5.4. Analitlerin farklı sorbent tipleri ve farklı konsantrasyonlarda atıksulardan ekstraksiyon verimleri

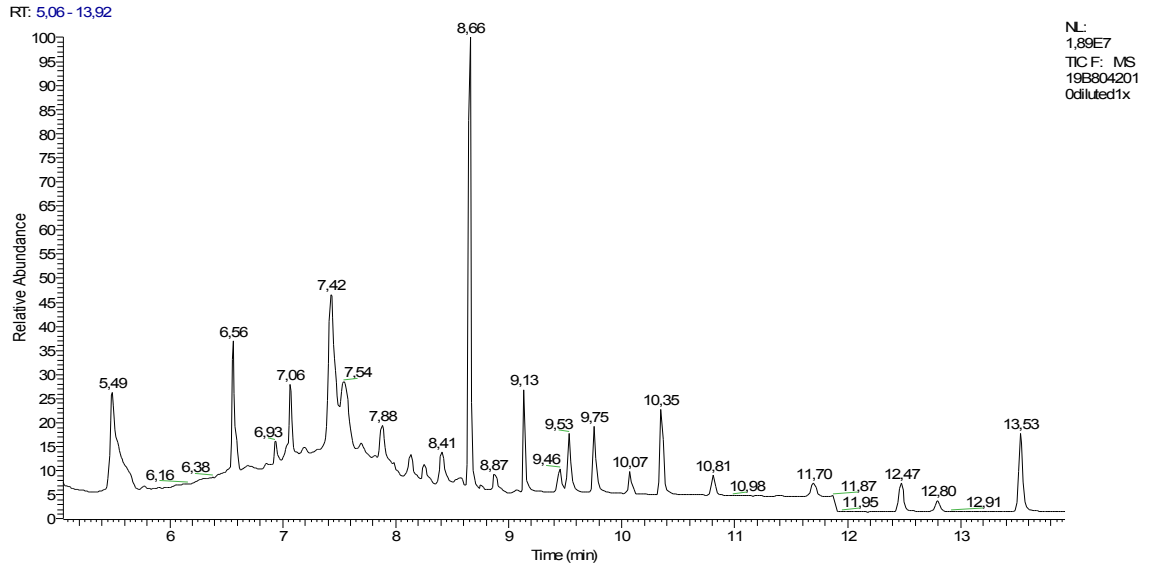
SPE Polimer Polimer tipi Yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) Miktar (mg)	Lichrolute RP-18 PS-DVB-EVB 1200 200				Oasis MCX PS-DVB-NVP (-SO <sub>3</sub> ) 806 60				Oasis HLB PS-DVB-NVP 831 1000			
	% Ekstraksiyon verimi				% Ekstraksiyon verimi				% Ekstraksiyon verimi			
Konsantrasyon (µg/L)	1	4	16	%RSD*	1	4	16	%RSD*	1	4	16	%RSD*
				↓				↓				↓
Benzoik asit	yok	8	21	18.4	8	14	32	14.3	44	54	65	16.4
Salisilik asit	yok	36	45	15.2	9	30	45	8.0	40	66	71	8.9
Klofibrik asit	18	26	28	16.0	21	32	58	11.4	18	26	54	12.5
Ibuprofen	43	56	72	5.4	49	90	93	3.1	45	84	89	3.6
Kafein	45	50	72	8.5	43	49	68	6.4	88	144	133	7.0
Fenoprofen	65	93	98	3.3	84	90	94	2.1	91	95	98	1.8
Metoprolol	yok	35	48	25.5	22	43	72	18.9	25	62	85	16.3
Naproksen	23	38	53	4.3	52	67	78	3.2	85	112	102	4.4
Propanolol	yok	40	51	13.3	43	76	83	10.4	38	73	80	11.0
Ketoprofen	23	38	67	5.6	80	92	99	6.0	84	96	105	4.0
Diklofenak	28	41	63	2.0	48	58	72	1.3	70	88	96	0.8
Bezafibrat	41	56	59	8.5	67	75	92	7.1	55	71	83	7.8
Dietil ftalat	75	86	98	8.8	82	94	108	6.1	77	84	112	5.0
Dibutil ftalat	83	96	99	9.2	78	89	98	5.3	88	96	118	5.6
Di-n-oktil ftalat	65	79	83	12.8	55	73	79	10.1	66	83	97	8.0
Estron	41	42	66	5.2	55	68	85	4.0	77	82	91	4.6

% RSD\* değerleri 16µg/L konsantrasyonda 3 paralel kartuş ekstraksiyonu ve her bir kartuş elüentinin 3 defa enjeksiyonu ile elde edilmiş değerlerdir

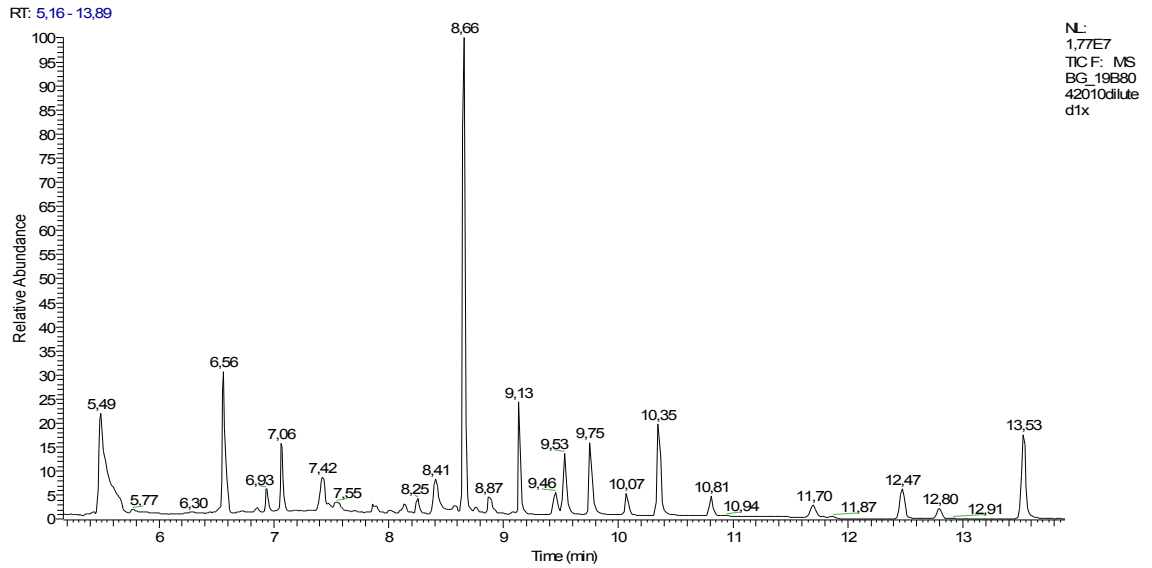
### 5.2.6. Analit bileşiklerin atıksulardaki LOD ve LOQ değerleri

Analizde metodun duyarlılığını belirleyen önemli safhalardan biri enstrümental LOD - LOQ ve metot LOD - LOQ değerleridir. LOD sınırı cihazda üretilen pik sinyal yüksekliği değerinin aynı pik için cihazda üretilen zemin gürültü sinyaline oranı olarak tanımlanan S/N (Signal to Noise Ratio) değerinin 3'e eşit olduğu andaki ilgili bileşiğin konsantasyon değeridir. LOQ ise kantitatif tayin sınırı olup kısaca S/N=10 değerindeki konsantrasyona karşılık gelmektedir.

Analitler için LOD ve LOQ tayininde 16 bileşiği içeren stok çözeltiden 250µL hacim alınarak 250 ml whatmann kağıdında filtrelenmiş 250 ml atık suya karıştırıldı (analit konsantrasyonları 12,3 – 16,6 µg/L aralığında) ve pH 4'e ayarlandı. Çözeltiyeye % 5 oranında metanol ilave edildi ve çözelti daha önce SPE işlemi ile optimize edilen Oasis HLB kartuştan geçirildi, derivatizasyon reaksiyonunda 150 µL piridin ve 250 µL BSTFA ile 70<sup>0</sup>C-60dk reaksiyon şartları uygulandı final reaksiyon karışımından alınan hacimler BSTFA ile 10, 100 ve 1000 defa seyreltilerek istenilen konsantasyon aralıkları elde edildi ve analizlendi. GC-MS cihazında SIM modunda ilgili bileşiğin fragment kütleleri yazılarak ve elde edilen bileşik kromatogramlarından sadece BSTFA ile elde edilen kromatogramlar çıkartılarak (background subtraction) piklerin S/N oranları iyileştirildi ve bu şekilde daha düşük LOD ve LOQ değerleri elde edildi. Zemin sinyalinin kromatogramlardan çıkarılmadan elde edilen pik profilleri ve zemin sinyali çıkarıldıktan sonra elde edilen pik profilleri Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.'de verilmektedir.



Şekil 5.6. Zemin sinyali varlığında analit kromatogramı



Şekil 5.7. Zemin sinyali olmadan elde edilen analit kromatogramı

Çizelge. 5.6. Analit bileşiklerin enstrümental ve metot LOD-LOQ değerleri.

Bileşik	ILD (pg/ $\mu$ L)	ILQ (pg/ $\mu$ L)	MLD (ng/L)	MLQ (ng/L)
Benzoik asit	32.0	106.6	51.2	172.6
Salisilik asit	1.05	3.5	1.7	5.7
Klofibrin asit	10.0	33.2	15.9	53.8
Ibuprofen	24.8	82.8	39.7	134.1
Kafein	3.5	11.7	5.6	19.0
Fenoprofen	2.1	7.1	3.4	11.6
Metoprolol	0.8	2.8	1.3	4.5
Naproksen	0.4	1.3	0.6	2.1
Propanolol	10.4	34.5	16.6	55.9
Ketoprofen	2.1	6.8	3.3	11.1
Diklofenak	0.8	2.7	1.3	4.3
Bezafibrat	15.5	51.7	24.8	83.8
Dietil ftalat	19.6	65.5	7.8	26.2
Dibutil ftalat	6.5	21.7	2.6	8.7
Di-n-oktil ftalat	11.9	40	4.7	15.8
Estron	0.7	2.2	1.0	3.5

Çizelge 5.6.'da analitler için elde edilen enstrümental ve metot tayin sınırları ve kantitatif tayin sınırları verilmektedir, en düşük değer naproksen, diklofenak ve estron için elde edilirken benzoik asit, ibuprofen, bezafibrat ve propanol analitleri için metot kantitatif tayin sınırı 53.8 ng/L ve üzerindedir. Meksiko City'de yapılan benzer çalışmada kaynak sularında bulunan asidik ilçalar için 0.25 – 1.0ng/L aralığında LOD değerleri, ftalatlar için 0.5 ng/L ve estron yapılı bileşikler için 0.005 – 0.05 ng/L aralığında LOD değerleri elde edilirken aynı çalışmada endüstriyel ve evsel atık su karışımlarında elde edilen LOD değerleri asidik ilaçlar için 5 – 100 ng/L, ftalatlar için 50 ng/L ve östrojenler için 0.5 – 2.5 ng/L aralığındadır (R.Gibson v.d., 2007) Bu bulgular bizim çalışmada elde edilen LOD ve LOQ değerleri ile paralellik gösterirken aynı zamanda atıksulardaki toplam kirletici miktarı ve organik madde miktarının metot tayin sınırlarını keskin bir biçimde etkilediğini ortaya koymaktadır.

## 5.2.7. Analit bileşiklerin çamur-toprak matrislerinde tayini

### 5.2.7.1. Analitlerin çamur-toprak matrislerinden geri kazanım ve LOD değerleri

PhAC ve EDC analitlerinin atıksu sedimentlerinden tayinleri ile ilgili çalışmalar sınırlı olmakla beraber özellikle asidik farmasötikler için çamur numunelerinde mikro dalga eşlenik ekstraksiyon (MAE) metodu ile izole edilen ve GC-MS ile analizlenen numunelerdeki analit konsantrasyonlarının ng/g - µg/g aralığında olduğu rapor edilmiştir (Cueva-Mestanza v.d.,2008).

#### *Sedimentlerin hazırlanması ve analit ilavesi:*

Analitlerin atıksu sedimentlerinden geri kazanım verimlerini elde etmek için analiz çalışmasının yapıldığı noktalardan su ile temasta olan kıyı kesiminde 5 cm derinlikten alınan sediment numuneleri etüvde 100<sup>0</sup>C'de 24 saat süre ile kurutuldu. Kurutulan sedimentlerden alınan 5 g'lık kısımlar havanda öğütüldü ve elekten geçirildi. Sediment kütlelerinde var olabilecek analit ve organik kirleticileri uzaklaştırmak için sedimentler beherlerde 3x10 mL hekzan + 3x10 ml diklormetan + 5x10 ml metanol ile yıkandı. Elde edilen temiz sedimentlere 10, 25 ve 50 µg/g analit konsantrasyonuna sahip olacak şekilde analitlerin sediment içindeki homojen dağılımını artırmak için 10 ml metanol–asetonitril (1:1) varlığında *spike* işlemi yapıldı. Çözücü çeker ocakta uzaklaştırıldı.

#### *Analitlerin sedimentlerden ekstraksiyonu:*

Spike edilen sedimentler MAE kaplarına konulduktan sonra ekstraksiyon solventi olarak 10 mL Aseton + Etil asetat karışımı kullanıldı (J.Xu v.d., 2008). Ekstraksiyon işlemi manyetik karıştırıcılı balık kullanılarak mikrodalga eşlenik reaksiyon sisteminde sıcaklık programı ile gerçekleştirildi.

- 1-) MAE 800W, 5 dk içinde oda sıcaklığından (25<sup>0</sup>C)- 60<sup>0</sup>C'ye ısıtma ve 5 dk bekleme  
 2-) MAE 800W, 60<sup>0</sup>C'den 90<sup>0</sup>C'ye ısıtma (10<sup>0</sup>C/dk) ve 20 dk ekstraksiyon.

Soğutulan sediment çözücü karışımı behere alınarak çözücü whatmann kağıdı ile 50 mL'lik erlene süzüldü, sediment 2x10 ml aseton + etil asetat (1:1) ile yıkandı ve bir önceki ekstrakt ile birleştirildi.

Analitlerin saflaştırılması ve derivatizasyonu:

Birleştirilen ekstraktın üzerine ön saflaştırma amacıyla 1g silika jel ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda 5 dk süreyle karıştırıldı. Mikro fiber süzgeç kağıdı kullanılarak silika jel ayrıldı. Analitleri içeren ön saflaştırılmış ekstrakt 250ml saf su ile karıştırıldı ve daha önce optimize edilen SPE (Oasis HLB kartuşu için) metodu ile ekstrakte edildi. Kurutulan kartuşun elüsyonu etil asetat-aseton çözücüsü ile yapıldı, elüent kurutuldu ve BSTFA-piridin (250 µL : 150 µL), 70<sup>0</sup>C – 60dk reaksiyonu ile derivatize edildi. Reaksiyon çözeltisinden 1 µL GC-MS'e enjekte edildi (Çizelge 5.7.).

Çizelge 5.7. Sedimentlerde bulunan analitlerin ekstarksiyon verimleri ve LOD değerleri

Bileşik	% Ekstraksiyon verimi			%RSD*	LOD (ng/g)
	10	25	50		
Konsantrasyon (µg/g)					
Benzoik asit	65	68	76	13,7	236
Salisilik asit	43	46	57	9,0	188
Klofibrin asit	53	59	66	8,8	345
Ibuprofen	77	83	88	5,7	78
Kafein	88	93	97	6,0	54
Fenoprofen	56	61	68	11,2	53
Metoprolol	13	18	25	18,9	985
Naproksen	68	72	77	6,6	34
Propanolol	18	25	29	22,3	1043
Ketoprofen	63	68	74	8,3	133
Diklofenak	34	38	42	7,0	118
Bezafibrat	77	81	88	16,1	1240
Dietil ftalat	34	41	49	10,1	86
Dibutil ftalat	37	43	55	13,3	90
Di-n-oktil ftalat	26	31	38	8,9	97
Estron	77	82	86	5,5	19

%RSD\* değerleri 25 µg/g konsantrasyondaki 3 paralel ekstraksiyondan elde edilmiştir.

### 5.3. PhAC ve EDC analitlerinin gerçek numunelerde tayini

#### 5.3.1. Numune alma işlemi

PhAC ve EDC analitlerinin atık sularında ve sediment matrislerindeki tayin optimizasyonları yapıldıktan sonra analizlenmek üzere Trakya Bölgesinin yoğun sanayi yerleşim noktaları olan Çerkezköy-Çorlu-Lüleburgaz hattında Ergene nehri ve kollarını içeren 6 farklı noktadan atıksu – sediment örnekleri Kasım 2009 – Mart 2010 döneminde aylık bazda birer defa olmak üzere toplandı.

Atıksu örnekleri nehir yada nehir kollarının orta kısmından anlık örnekleme (grab sampling) yöntemi ile 1L'lik numune şişelerine alındı ve hiçbir işlem yapılmadan 24 saat içinde analizlendi. Sediment örnekleri su ile temasta olan kıyı şeridinin 5 cm derinlikteki kısımlarından spatül ile alındı ve analiz işlemine kadar – 15°C'de tutuldu. Örnekleme noktaları aşağıdaki Şekil 5.8.'de görülmektedir.



Şekil 5.8. Atıksu – sediment numune alma noktaları

Numune alma noktaları:

S1- Çerkezköy Organize Sanayi Bölgesi Atıksu Arıtma Tesisi (Giriş)

S2- Velimeşe Sinan Dere Kolu

S3- Yulaflı

S4- Çevre Mühendisliği Fakültesi

S5- Çorlu Çıkış

S6- İnanlı

### **5.3.2. Analizi yapılan PhAC ve EDC bileşiklerinin atıksu-sediment numunelerindeki varlıkları**

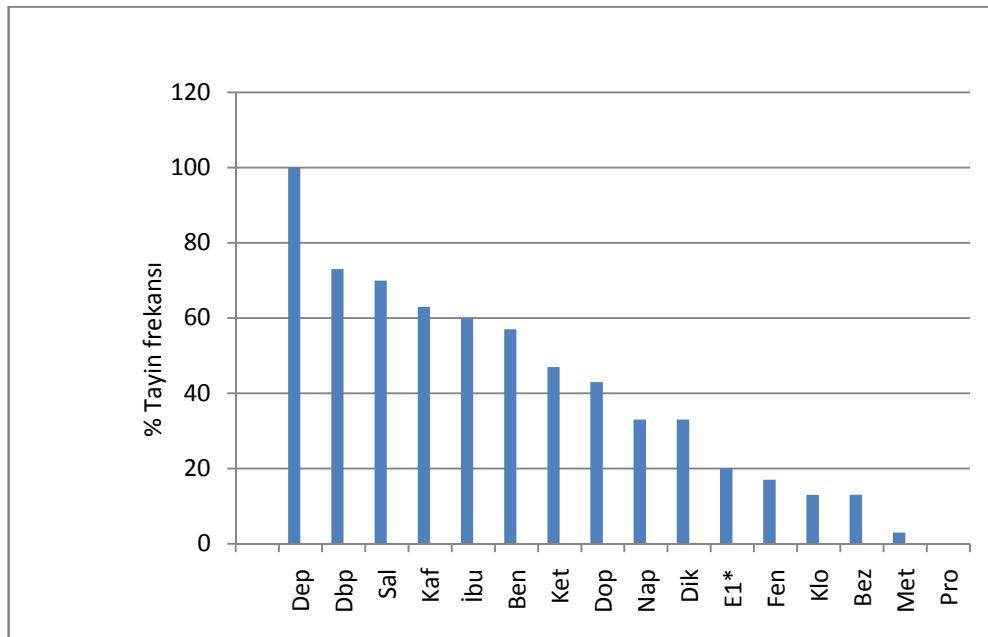
*Atıksularda Tayin:* Optimize edilen metotlarla Kasım 2009- Mart 2010 döneminde aylık bazda analizlenen atıksu numunelerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 5.8.'de yer almaktadır.

Analizlenen analitler arasından dietil ftalat bütün atık su numunelerinde en sık ve toplam konsantrasyon olarak en yüksek değerlerde (338,31µg/L) tayin edildi. Ftalat varlığının özellikle boya üretim tesislerinin yerleşik olduğu S1 ve S3 noktaları arasında en yüksek konsantrasyona ulaştığı görülmektedir (S3'de Dep için 55,8 µg/L) Anti-enflamatuvar ilaç bileşiklerinden ibuprofen, ketoprofen ve diklofenak toplam konsantrasyonları sırasıyla 71,99 – 60,41 ve 25,18 µg/L olarak tayin edildi. Özellikle bu üç farmasötik aktif maddenin S1 numune noktasındaki örnekleme yapıldığı bütün aylarda yüksek konsantrasyonda olması bu bileşiklerin ilaç sanayi atıksuları kaynaklı olabileceğini göstermektedir. Örnekleme yapıldığı S6 noktası da bu bileşiklerin S1'e göre düşük ama sürekli emisyonla sahip olduğunu göstermekte. D.G.J Larsson (2007). ve arkadaşlarının Hidistanın Hiberabad kenti yakınlarında yer alan büyük ölçekli jenerik ilaç üretm atık sularında yaptığı tayinlerde bezer biçimde fakat çok daha yüksek konsantrasyonlarda (90–31,000µg/L) antibiyotik varlıklarını saptamıştır. Mexico City'de R. Gibson ve arkadaşlarının (2007) endüstriyel - evsel ayık su karışımlarında seçimli elüsyon GC-MS analizlerinde ibuprofen, salisilik asit, naproksen, ketoprofen ve diklofenak için elde edilen değerler: 5.09, 29.06, 16.65, 0.26, 6.36µg/L seviyesindedir. Benzer çalışmalarda naproksen için elde edilen konsantrasyon değerleri diğer asidik ilaç bileşiklerine göre yüksek olmasına rağmen bizim çalışmamızda naproksenin yerini



ibuprofen ve ketoprofen almıştır. Metoprolol için elde edilen tek veri S5 noktasındaki 0.03 µg/L olurken proanolol analizlerin hiç birinde tayin edilemedi. Estron varlığı S1 ve S5 noktalarında en çok 9.3 ve 1.1ng/L konsantrasyonlarda tayin edildi. Estronun S5 noktasındaki düşük frekanslı varlığı nüfus yoğunluğunun yüksek olduğu Çorlu ilçesi evsel atık kaynaklı olabileceğini göstermektedir, S1 noktası ise yine endüstriyel kaynaklı varlığa işaret etmektedir. B.L.L Tan v.d., (2006) tarafından Avustralya - Queensland endüstriyel atıksu arıtma girişinde belirlenen estron konsantrasyonu 3.6 – 37.5ng/L aralığında rapor edilmiştir.

Gıda, gıda katkı maddeleri ve ağı kesici olarak kullanılan benzoik asit, salisilik asit ve kafeinin atıksulardaki toplam konsantrasyonu 1.96, 21.83 ve 18.87µg/L olarak tayin edilmiştir. Salisilik asit ve kafein ftalik asit esterlerinden sonra en sık tayin edilen bileşikler olarak ortaya çıkmaktadır. Aşağıdaki Şekil 5.9.'da atıksularda analizi yapılan analitlerin % tayin frekansı verilmiştir, burada en sık tayin edilen bileşikler fatalatalar, salisilik asit, kafein ve ibuprofendir. Dietil ftalatın bütün noktalardaki sürekli varlığı asıl kirlenici kaynağın endüstriyel atık suların olduğunu ortaya koymaktadır. S1 noktasındaki yüksek tayin frekansı da Çerkezköy OSB'den arıtılmak üzere gelen atıksuyun yüksek kirlilik taşıdığını göstermektedir. Benzer şekilde S6 noktasındaki ilaç aktif maddelerin tayin frekansı S2, S3, S4 ve S5'e göre daha yüksektir.



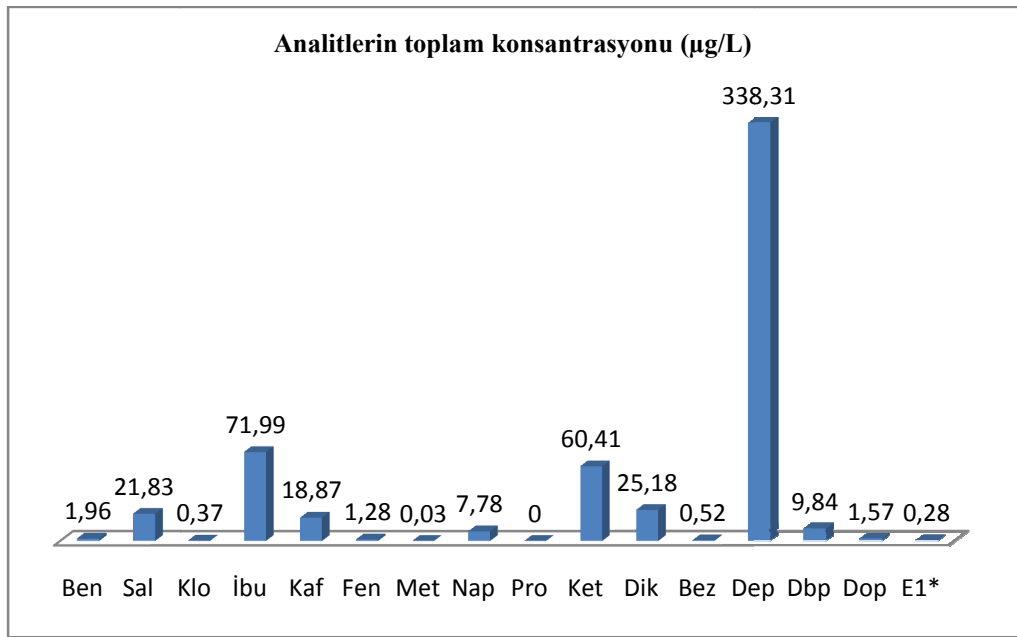
Şekil 5.9. Atıksularda analizlenen analitlerin tayin frekansları

Çizelge 5.8. Atıksu numnelerinde aylık bazda tayin edilen analitler ve konsantrasyonları

N.	Ay	Atıksularda analit konsantrasyonu (µg/L)															
		Ben	Sal	Klo	İbu	Kaf	Fen	Met	Nap	Pro	Ket	Dik	Bez	Dep	Dbp	Dop	E1*
S1	K	0.33	2.34	t.e	8.34	4.32	t.e	t.e	1.38	t.e	10.9	7.43	0.07	34.3	0.18	t.e	t.e
	A	0.21	1.18	t.e	18.3	4.88	0.07	t.e	0.99	t.e	9.93	t.e	t.e	28.2	0.34	t.e	7.9
	O	0.28	3.22	t.e	9.23	1.30	0.98	t.e	0.72	t.e	17.3	5.56	0.19	13.8	3.43	0.08	9.3
	Ş	t.e	2.05	t.e	11.2	0.22	t.e	t.e	2.65	t.e	8.54	4.23	0.17	23.6	0.36	0.06	t.e
	M	0.44	5.09	t.e	14.3	3.32	0.19	t.e	1.88	t.e	13.0	7.83	0.09	12.5	0.28	0.06	8.8
S2	K	t.e	0,03	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	6,34	0,03	t.e	t.e
	A	0.08	0.18	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	3.42	0.08	0.09	t.e
	O	0.05	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	3.50	t.e	t.e	t.e
	Ş	t.e	0.02	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	3.76	t.e	0,10	t.e
	M	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	12.4	0.34	0.12	t.e
S3	K	0.09	1.43	t.e	0.11	0.98	t.e	t.e	t.e	t.e	0.07	t.e	t.e	18.9	0.68	0.32	t.e
	A	0.06	2.54	t.e	t.e	0.63	t.e	t.e	t.e	t.e	0.02	t.e	t.e	38.3	0.72	t.e	t.e
	O	0.12	0.95	t.e	0.23	0.30	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.01	t.e	55.8	0.92	0.43	t.e
	Ş	t.e	t.e	t.e	0.56	0.87	t.e	t.e	0.02	t.e	0.05	0.04	t.e	17.0	0.07	t.e	t.e
	M	0.03	1.20	t.e	0.04	0.05	t.e	t.e	0.03	t.e	t.e	t.e	t.e	43.2	0.74	0.28	t.e
S4	K	t.e	0.01	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.83	t.e	t.e	t.e
	A	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	1.22	0.02	t.e	t.e
	O	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.96	0.04	t.e	t.e
	Ş	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.77	t.e	t.e	t.e
	M	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.78	t.e	t.e	t.e
S5	K	0.01	t.e	t.e	0.02	0.21	0.03	t.e	0.03	t.e	t.e	0.04	t.e	1.34	0.01	t.e	t.e
	A	0.03	0.02	0.12	0.01	0.39	0.01	0.03	0.01	t.e	0.01	0.01	t.e	0.98	0.03	t.e	0.7
	O	t.e	0.02	0.14	0.12	0.35	t.e	t.e	0.07	t.e	0.01	0.01	t.e	0.99	0.03	t.e	1.1
	Ş	0.04	0.05	0.05	t.e	0.11	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.02	t.e	1.21	0.08	0.01	0.98
	M	0.04	t.e	0.06	0.01	0.28	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.56	t.e	t.e	t.e
S6	K	0.01	0.54	t.e	1.12	0.23	t.e	t.e	t.e	t.e	0.03	t.e	t.e	2.12	0.43	0.01	t.e
	A	0.03	0.34	t.e	0.96	0.28	t.e	t.e	t.e	t.e	0.12	t.e	t.e	5.55	0.55	0.03	t.e
	O	t.e	0.18	t.e	3.22	0.11	t.e	t.e	t.e	t.e	0.23	t.e	t.e	3.30	0.48	t.e	t.e
	Ş	t.e	0.21	t.e	3.45	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.20	t.e	t.e	1.80	t.e	0.01	t.e
	M	0.11	0.23	t.e	0.77	0.04	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	0.88	t.e	t.e	t.e

\*: Estron için kullanılan konsantrasyon birimi ng/L olarak alınmıştır.

Yapılan bütün atıksu analizlerinde tayin edilen analit konsantrasyonlarının toplamı aşağıda Şekil 5.10.'da verilmektedir. En yüksek konsantrasyona sahip olan bileşik dietil ftalat olarak belirlenirken onu takip eden bileşikler ibuprofen, ketoprofen salisilik asit ve kafeindir. Bu sonuçlara bakıldığında tekstil boyama, plastik ve kozmetik ürünlerde kullanılan ftalat miktarları ve onu takip eden ilaç aktif bileşikleri, analizlerin yapıldığı bölgedeki kirletici kaynaklarını ortaya çıkarmaktadır.



Şekil 5.10. Atıksularda tayin edilen analitlerin toplam konsantrasyonları

#### *Sedimentlerde tayin:*

Numune noktalarından alınan sediment (toprak-çamur) örneklerinde yapılan analizler sonucunda atıksulara benzer şekilde ftalatlar için (özellikle dietil ftalat) bütün noktalarda tayin gerçekleştirildi (Çizelge 5.9.). Anti – enflamatuvar ilaç aktif maddeleri için S1 ve S6 tayinlerin yapıldığı noktalar olurken diğer noktalarda sedimentlerdeki varlıkları saptanamadı. Benzoik asit, salisilik asit ve kafein için sedimentlerdeki tayin sıklığı 4/6 – 5/6 aralığındadır. S.L Rice ve S. Mitra, (2007) yaptıkları çalışmada toprak ve çamurdaki naproksen, kafein, ketoprofen ve diklofenak konsantrasyonlarını 50 – 10,000 ng/g aralığında rapor etmişlerdir. Başka çalışmalarda nehir sedimentlerindeki asidik ilaç konsantrasyonunun 60 – 320 ng arasında değiştiğini ortaya koymuştur (J. Antonic., 2007). Saptanan en yüksek konsantrasyon 455 ng/g ile S3 noktasındaki dietil

ftalat bileşiği içindir. S1 noktasında 16 bileşiğin içinden 9 tanesi için tayin gerçekleştirilmiş olup S2 noktasında 2 bileşik, S3 noktasında 6 bileşik, S4 noktasında 2 bileşik S5 noktasında 5 bileşik ve S6 noktasında 7 bileşiğin tayini gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.9. Analitlerin sedimentlerdeki varlıkları ve konsantrasyonları

N.	Sedimentlerde analit konsantrasyonu (ng/g)															
	Ben	Sal	Klo	İbu	Kaf	Fen	Met	Nap	Pro	Ket	Dik	Bez	Dep	Dbp	Dop	E1*
S1	23.4	38.1	t.e	88.5	43.8	t.e	t.e	18.8	t.e	154	38.9	t.e	346	128	t.e	t.e
S2	t.e	10.3	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	198	75	t.e	t.e
S3	13.2	18.2	t.e	t.e	11.3	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	455	224	92	t.e
S4	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	136	66	t.e	t.e
S5	8.8	11.3	t.e	t.e	18.8	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	t.e	98	36	t.e	t.e
S6	5.6	7.2	t.e	54.6	17.3	t.e	t.e	13.5	t.e	t.e	t.e	t.e	230	68	t.e	t.e

#### Tartışma ve Sonuçlar:

Tayin optimizasyonları yapılan 16 adet PhAC ve EDC yapılı bileşiğin Trakya Bölgesinde biri OSB atıksu arıtma tesisi girişı olmak üzere seçilen altı farklı noktadaki atıksu ve sediment analizlerinde özellikle plastik, boya ve kozmetik sanyinde kullanılan ftalat konsantrasyonunun bütün noktalarda hem su hem sediment matrikslerinde yüksek olduğu saptanmıştır. Sadece sanayi atıksuyu deşarj noktaları olarak kullanılan S1, S2 ve S4 noktalarından, OSB atıksu arıtma girişinde bulunan S1 noktası dışındaki noktalarda ilaç kalıntılarına rastlanılmamıştır. Anti- enfalmatuvar PhAC bileşiklerinin de OSB atıksu arıtma girişinde bulunan S1 noktasındaki su-sediment örneklerinde benzer çalışmalarla paralel olarak yüksek konsantrasyonları saptandı. Bu iki bileşik sınıfının ardından en sık tayin edilen bileşikler gıda ve gıda katkı maddelerinde geniş kullanım bulan benzoik asit, salisilik asit ve kafeindir. Bu veriler doğrultusunda endüstriyel atıksularla karışan evsel atıksulardaki endokrin bozucu organik kirleticilerin varlıklarının zirai sulama amaçlı kullanılan yer altı ve içme sularındaki muhtemel varlıklarının saptanması insan sağlığı açısından değerlendirilmeli ve bu kirleticilerin kaynağı tam olarak tespiti için çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

Adler, P., T. Steger-Hartmann, W. Kalbfus, 2001. Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from southern and middle Germany. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* (29) 227-241.

Antonic, J., E. Heath, 2007. Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (387) 1337-1342.

Balakrishnan, V.K., K.Terry, J. Toito, 2006. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater : A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A* (1131) 1-10.

Baronti, C., C. Roberta, C. Giuseppe, G. Alessandra, R.Samperi, 2000. *Environmental Science and Technology* (24) 5059-5066.

Bernstein, H., C. Bernstein, C.M. Payne, K. Dvorakova, H. Garewal, 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (589) 47-65.

Bolz, U., W. Korner, H. Hagenmaler, 2000. Development validation of GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Chemosphere* (40) 929-935.

Brun, G.L., M. Bernier, R. Losier, K. Deo, P. Jackman, H-B. Lee, 2006. Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian Sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* (25) 2163-2176.

Bull, I.D., M.J. Lockheart, M.M. Elhmmali, D.J. Roberts, R.P. Evershed, 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* (27) 647-654.

Buser, H.R., T. Poiger, M.D. Muller, 1998. Occurrence and fate of Pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid biodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology* (32) 3449-3456.

Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* (142) 185-194.

Danzinger, R., Hofmann A, L. Schoenfield, L. Johnson, 1972. Dissolution of cholesterol gallstones by Chenodeoxycholic acid. *English Journal of Medicine* (286) 1-8

Daughton, C.G. and T.A. Ternes, 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* (107) 907 – 938.

Desbrow, C., E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.1. Chemical fractionation and vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* (32) 1549-1558.

Ding, W-H., C-T. Chen, 1999. Analysis of nonylphenol polyethoxycarboxylates and their related metabolites by on-line derivatization and ion trap gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (862) 113-120.

Elhmmali, M., D. Roberts, R.P. Evershed, 2000. Combined Analysis of Bile Acid and Sterols/Stanol from Riverine Particulates to Assess Sewage Discharges and Other Fecal Sources. *Environmental Science and Technology* (34) 39-46.

Evershed R.P., M. Elhmmali, D. Roberts, 1997. Bile Acids as a new Class of Sewage Pollution Indicator. *Environmental Science and Technology* (31) 3663-3668.

Farre, M., I. Ferrer, I. Ginebreda, 2001. Determination of drugs in surface waters and wastewater samples by LC-MS: methods and preliminary results including toxicity test with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* (938) 187-189.

Ferrari, B., N. Paxeus, R.L. Giudice, A. Pollio, J. Garric, 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewater: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (55) 359-370.

Foster M.D., V. Shultz, S. Philips, M. Sar, K. Gaido. 2001. Altered Gene Profiles in Fetal Rat Tests after In Utero Exposure to di (n-butyl) Phthalate. *Toxicological Sciences* (64) 233-242.

Furlong, E.T., I. Ferrer, S. Glassmeyer, J. Jeffery, D. Cahill, S.D. Zaugg, D.W. Kolpin, 2003. Distributions of organic wastewater concentrations between water and sediment in surface water samples of the United States. *Proceedings of 3rd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*.

Garrison, A.W., J.D. Pope, F.R. Allen, 1976. Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. *Ann Arbor Science*, MI:517-566.

Ghijsen, R.T. and W. Hoogenboezem, 2002. Endocrine disrupting compounds in the Rhine and Meuse basin – occurrence in surface, process and drinking water; *RIWA report*.

Gibson, R., E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jimenez, 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine, disrupting compounds in wastewaters by selective elution and analysis by gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (1169) 31-39.

Grimalt J.O., P. Fernandez, J.M Bayona, J. Albagies, 1990. Assessment of fecal sterols and ketones as indicator of urban sewage inputs to coastal waters. *Environmental Science and Technology* (24) 357-363.

Hajkova, K., J. Pulkrabova, J. Schurek, J. Hajslova, J. Poustka, M. Napravnikova, V. Kocourek, 2007. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (387) 1351-1363.

Halling-Sorensen, B., S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten, S.E. Jorgensen, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere* (36) 357-393.

Hansen, P.D., H. Dizer, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. Mc Allester, 1998. Vitellogenin a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry* (17) 448-451.

Heberer, T., I.M Verstraeten, M.T Mayer, A. Mechlinski, K. Reddersen, 2001. Occurrence and fate of pharmaceuticals during bank filtration-preliminary results from investigation in Germany and the United States. *Water Resources Update* (120) 4-17.

Heberer, T., D. Feldmann, K. Reddersen, A. Mechlinski, 2002a. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in aquatic environment in urban areas. *Water Science Technology* (46) 81-88.

Heberer T., Stan H.J, 1997. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (67)113-124.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* (131) 5-17.

Hewitt, M., M. Servos, 2001. An Overview of Substances Present in Canadian Aquatic Environments Associated with Endocrine Disruption. *Water Quality Research Journal of Canada* (36) 48-55.

Hignite, C., D.L. Azarnoff, 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Science* (20) 337-341.

Hilton, M.J., K.V Thomas, 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by HPLC electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (1015) 129-141.



Hirsch, R., T.Ternes, K. Haberer, K-L. Kratz, 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of Total Environment* (225) 109-118.

Janex, M.L., A. Bruchet, Y. Levi, T. Ternes, 2002. Pharmaceutical compounds: occurrence in the environment and fate in drinking water treatment. *Proceedings of Water Quality Technol. Conference*.

Jeannot, R., H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, 2002. Determination of endocrine disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (974) 143-59.

Jobling, S., M.Nolan, C.R. Tyler, G.C. Brighty, J.P Sumpter, 1998. Widespread sexual disruption in wild fish . *Environmental Science and Technology* (32) 2498-2506.

Keller, S., G. Jahresis, 2004. Determination of underivatised sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography mass spectrometry single ion monitoring in faeces. *Journal of Chromatography B* (813) 199-207.

Kelly, C., 2000. Analysis of steroids in environmental samples using solid phase extraction and ion trap gas chromatography mass spectrometry and gas-chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (827) 309-314.

Kolpin, D., E. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999 – 2000: A National reconnaissance. *Environmental Science and Technol.* (36), 1202-1211.

Kubas, A., 2003. Industry and Environmental Problems in Thrace Area. *World Newspaper*.

Kuch, H.M, K. Balchmitter, 2001. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking waters by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology*. (35) 3201-3206.

Larrson, D.G.J., C. de Pedro, N.A. Paxeus, 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* (148) 751-755.

Lerch, O., P. Zinn, 2003. Derivatisation and gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry of selected synthetic and natural endocrine disruptive chemicals. *Journal of Chromatography A* (991) 77-97.

Li, D., J.Park, J.R. Oh, 2001. Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination. *Analytical Chemistry* (73) 3089-3095.

Lindsey, M., M.E Meyer, E.M Thurman, 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid phase extraction and liquid chromatography /mass spectrometry. *Analytical Chemistry* (73) 4640-4646.

Lopez de Alda, M., D. Barcelo, 2001. Use of solid phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A* (938) 145-153.

Mackenzie, A.S., S.C. Brasell, G. Eglinton, J.R. Maxwell, 1982. Chemical fossils: The geological fate of steroids. *Science* (217) 491-504.

Marce, R.M., A. Penalver, E. Pocurull, F. Borrull, 2000. Determination of phthalate esters in water samples by solid phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* (872) 191-201.

Metcalf, C.D., B.G. Koenig, D.T. Bennie, M. Servos, T.A. Ternes, R. Hirsch, 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry* (22) 2872-2880.

Miao, X., J. Yang, C.D. Metcalfe, 2005. Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology* (39) 7469-7475.

Mouatassim- Souali, A., S.L Karolak, D. Perdiz, M. Carquet, Y. Levi, 2003. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. *Journal of Separation Science*. (26) 105-111.

Musteata, F.M., J. Pawlyszin, 2007. In vivo sampling with solid phase micro extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (70) 181-193.

Nasu, M., M.Goto, H.Kato, Y.Oshima, H. Tanaka, 2001. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* (43):101-108.

Nes, W.R, W.D. Nes, 1980. Lipids in evolution. *New York Plenum Press*.

Ollers, S., H.P Singer, P. Fassler, R.S. Muller, 2001. Simultaneous quantification of natural and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low ng/L level in the surface and waste water. *Journal of Chromatography A* (911) 225-234.

Parrot, J., M. Wade, 2001. An Overview of Testing Procedures and Approaches for Identifying Endocrine Disrupting Substances. *Water Quality Research Journal of Canada* (36) 273-291.

Petrovic, M., E. Eljaart, M. Lopez de Alda, D. Barcelo, 2002. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A* (974) 23-51.

Petrovic, M., M.D. Hermandó, M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, 2005. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A Review. *Journal of Chromatography A* (1067) 1-14.

Pomati, F., S. Castiglioni, E. Zucatto, R. Fanelli, D. Vigetti, C. Rosetti, D. Calamari, 2006. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology* (40), 2442-2447.

Quintana, J.B., T. Reemtsma, 2004. Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reversed phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (18) 765-774.

Raven, P.H., G.B. Jhonson .1999. *Biology 5th Edition. Mc Graw-Hill.*

Rice, S.L., S. Mitra, 2007. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (589) 125-132.

Rodriguez-Mozaz, S., M.J Lopez de Alda, D. Barcelo, 2004. Monitoring of estrogen, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (378) 588-598.

Sedlak, D.L., Pinkston K.E, Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals realased to the aquatic environment. *Water Resource Update* (120) 56-64.

Servos, M.R., M. Smith. 2007. Presence and removal of acidic drugs in drinking water in Ontario, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada* (42) 130-137.

Shore, S., K. Yoram, G. Michael, W. Smadar, B. Hanna, S. Mordechai, 1995. Induction of phytoestrogen production in Medicago sativa leaves by irrigation with sewage water. *Environmental and Experimental Botany* (35) 363-369.

Snyder, S.A., P. Westerhoff, Y. Yoon, D.L. Sedlak, 2003. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environmental Engineering Science* (20) 449-469.

Spengler, P., W. Körner, J. Metzger, 1999. Hardly degradable substances with estrogenic activity in effluents of municipal and industrial sewage plants. *Vom Wasser* (93) 141-157.

Stackelberg, P.E., E.T. Furlong, M.T. Meyer, S.D. Zaugg, A.K. Henderson, D.B. Reismann, 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic contaminants in a conventional drinking water treatment plant. *Science of the Total Environment* (329) 99-113.

Stan, H.J., T. Herberer, 1997. Pharmaceuticals in the aquatic environment. *Dossier Water Analysis* (25) 20-23.

Stoob, K., H.P. Singer, S. Stettler, N. Hartmann, S.R. Mueller, C.H. Stamm, 2006. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* (1128) 1-9.

Stumpf, M.A., T.A. Ternes, K. Heberer, P. Seel, W. Baumann, 1996. Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser* (86) 291-303.

Tabata, A., S. Kashiwa, Y. Ohnishi, H. Ishikawa, N. Myamoto, M. Itoh, 2001. Estrogenic influence of estradiol-17 $\beta$ , p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Science and Technology* (43) 109-116.

Tan, B.L.L., D.W. Hawker, J. F. Muller, F.D.L. Leusch, L.A. Tremblay, H.F. Chapman, 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment International* (33) 654-699.

Ternes, T.A., 2001. Analytical Methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* (20) 419-434.

Ternes, T.A., R. Hirsch, J. Mueller, K. Haberer, J. Fresenius, 1998. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and  $\beta$ 2-symphathomymetics in aqueous matrices. *Analytical Chemistry* (362) 329-340.

Ternes, T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers: *Water Research* (32) 3245-3260.

Tixier, C., H.P Singer, S. Oellers, S.R Muller, 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* (37) 1061-1068.

Toppari, J., N.E. Skakebaek, J.C Larsen, 1995. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Miljøprojekt 290. *Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen*.

Trenholm, A., B. Vanderford, J. Holady, D. Rexing, S. Snyder, 2006. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* (65) 1990-1998.

Watbe, J., H. Bernstein, 1985. The mutagenity of bile acid using flucutation test. *Mutation Research/Genetic Toxicology* (158) 45-51

Weigel, S., U. Berger, E. Jansen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfüss, 2004. Determination of selected pharmaceuticals in sewage and sea water from Tromso/Norway with emphasis on ibuoprofen and its metabolites. *Chemosphere* (56) 583-592.

Xiao, X-Y., D.V Mc Calley, J. Mc Evoy, 2001. Analysis of estrogens in water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A* (923) 195-204.

Zucatto, E., D. Calamari, R. Fanelli, 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* (355) 1789-1790.

Zwiener, C. and F.H. Frimmel, 2000. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research* (34) 1881-1885.

## ÖZGEÇMİŞ

1977 Bulgaristan – Şumnu doğumluyum. İlkokulu Şumnu’da bitirdikten sonra ortaöğrenimimi 1989 -1995 yılları arasında Vefa Poyraz Lisesi (İstanbul) ve Çerkezköy Lisesi (Tekirdağ)’da tamamladım. 1996 Yılında Trakya Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım ve 2000 yılında lisansımı tamamladım. Yüksek Lisans eğitimim 2000 – 2004 dönemlerinde Trakya Üniveritesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tamamladıktan sonra Doktora eğitimime 2004 yılında aynı Enstitüde başladım. 2002 yılından bu yana Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir kızım var.