



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BAZI FTALATLARIN DÜZEYLERİNİN BİYOLOJİK
SIVI ÖRNEKLERİNDE BELİRLENMESİ

Burçin KOÇ

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI

2012- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI FTALATLARIN DÜZEYLERİNİN BİYOLOJİK
SIVI ÖRNEKLERİNDE BELİRLENMESİ**

Burçin KOÇ

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

**DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI**

2012– ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

31.01.2012



Jüri Başkanı
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
Ank.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



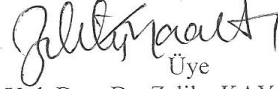
Üye
Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK
Ank.Ü. Eczacılık Fakültesi



Üye
Prof. Dr. Ahmet SAYAL
G.A.T.A.



Üye
Prof. Dr. Birsen KAPLAN
Gazi.Ü. Sağlık Hiz. Mes. Yüksekokulu



Üye
Yrd. Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
Ank.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler Kısaltmalar	vii
Tablolar	ix
Şekiller	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.2. Ftalatların Kimyası ve Özellikleri	3
1.3. Maruziyet Yolları	6
1.3.1. Oral	6
1.3.2. İnhalasyon	8
1.3.3. İntravenöz	9
1.3.4. Deri	9
1.4. Toksikokinetik	10
1.4.1. Absorbsiyon	10
1.4.2. Dağılım	11
1.4.3. Biyotransformasyon ve Atılım	12
1.5. Toksikoloji	15
1.6. Kimyasal Ayırım Yöntemleri	17
1.6.1. Katı Faz Ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE)	18
1.6.2. Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (GC-MS)	20
1.6.2.1. Gaz Kromatografisi	20
1.6.2.2. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri	22
1.6.2.2.1. Taşıyıcı Gaz	22
1.6.2.2.2. Enjeksiyon Bölümü	23
1.6.2.2.3. Kolon ve Fırın	23

1.6.2.2.4. Dedektör	24
1.6.2.3. Kütle Spektrometresi	24
1.6.2.3.1. İyon Kaynağı	25
1.6.2.3.2. Kütle Analizör	26
1.6.2.3.3. Dedektör	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Prensi	28
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
2.3. Kullanılan Aletler ve Alet Şartları	29
2.4. Çözeltiler	30
2.4.1. Stok ve Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	30
2.4.2. Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması	30
2.5. Numunelerin Ekstraksiyonu	30
2.6. GC-MS Koşulları	31
2.7. Validasyon	32
2.7.1. Metot Validasyonu	32
2.7.2. Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	33
3. BULGULAR	34
3.1. Kalibrasyon Grafikleri	34
3.2. Tekrarlanabilirlik	38
3.3. Dedeksiyon ve Ölçüm Limitleri (LOD ve LOQ)	42
3.4. Geri Kazanım (Recovery)	43
3.5. İdrar Numuneleri Sonuçları ve İstatistiksel Verileri	45
3.5.1. İstatistiksel Değerlendirme	49
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZET	62
SUMMARY	63

KAYNAKLAR	64
EKLER	73
ÖZGEÇMİŞ	75

ÖNSÖZ

Günlük hayatta kozmetiklerden farmasötiklere gıda ambalajlarından evimizdeki yapı malzemelerine kadar birçok ftalat içeren ürünlere çevresel olarak maruz kalınmaktadır. Bu çalışmayla maruz kalınan ftalatların biyolojik materyalde düzeylerinin belirlenmesi için gaz kromatografisi kütle spektrometresinde metot oluşturulup validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışmamda tecrübe ve motive edici gücünü benden esirgemeyen danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Zeliha Kayaaltı'na;

Hayalimi gerçekleştirmeme fırsat tanıyan çok değerli hocam Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü, Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na;

Laboratuvar çalışmalarında, titizliği, dikkati, işine ve insanlara olan saygısıyla her zaman örnek aldığım, emeğini, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Biyolog Emrah DURAL'a;

Tez yazım sırasında her zaman yanımda olan arkadaşlarım Kim.Müh. Özlem TUNA'ya, Arş.Gör. Betül İŞİNER'e ve Biyolog Esmâ SÖYLEMEZ'e;

En zorlu zamanlarımda her zaman yanımda olan hayat yoldaşım Osman ALKAN'a;

Sabrı ve ilgisiyle her zaman yanımda olan ANNEME, bir gülüşüyle bütün sıkıntımı gideren biricik kardeşim Ömeralp'e, uzakta da olsa manevi desteğini her daim hissettiren ABLAMA ve benim için her zaman en iyisini isteyen, ayaklarımın üstünde durmamı sağlayan canım BABAMA;

Teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%CV	% Değişim katsayısı (Coefficient of variation)
2cx-MMHP	mono(2-karboksimetil hekzil) ftalat
5cx-MEPP	mono(2-etil-5-karboksipentil) ftalat
5OH-MEHP	mono(2etil-5-hidroksihekzil) ftalat
5okso-MEHP	mono(2-etil-5oksoheksil) ftalat
BBzP	butil benzil ftalat
CERHR	Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction
DBP	di-n-bütil ftalat
DEHP	di(2-etilhekzil) ftalat
DEP	dietil ftalat
DIBP	di-isobutil ftalat
DiDP	di-isodesil ftalat
DiNP	di-isononil ftalat
DMP	dimetil ftalat
DnHP	di-n-hekzil ftalat
DnOP	di-n-oktil ftalat
DPHP	di(2-propil heptil) ftalat
ECD	Electron Capture Dedector (Elektron Yakalama Dedektörü)
ECMO	Ekstrakorporeal Membran Oksijenlendirme
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector (Alev İyonizasyon Dedektörü)
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)
GLC	Gas Liquid Chromatography (Gaz Sıvı Kromatografisi)
GSC	Gas Solid Chromatography (Gaz Katı Kromatografisi)
LOD	Limit of Dedection (Dedeksiyon Limiti)
LOQ	Limit of Quantitation (Ölçüm Limiti)
MAFF	The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food
MEHP	mono(2-etilhekzil) ftalat
mg	miligram

mL	mililitre
MS	Mass Spectrometer (Kütle Spektrometresi)
MSD	Mass Selective Detector (Kütle Seçici Dedektör)
ppb	Parts Per Billion (Milyarda Bir Ölçü)
ppm	Parts Per Million (Milyonda Bir Ölçü)
PVC	Polivinil Klorür
RRF	Relative Responce Factor
RSS	Relatif Standart Sapma
RT	Retention Time
SS	Standart Sapma
SIM	Selected Ion Monitoring (Seçilmiş İyon İzleme)
SPE	Solid Phase Extraction (Katı Faz Ekstraksiyonu)
TCD	Thermal Conductivity Detector (Termal İletkenlik Dedektörü)
t_R	Retention Time (Tutulma Süresi)
US EPA	United States Environmental Proteciton Agency
µL	Mikrolitre

TABLULAR

Tablo.1.1. Ftalatlar ve Potansiyel Maruziyet Kaynakları (Heudorf Ve Ark., 2007)	3
Tablo.1.2. BBzP'nin Fizikokimyasal Özellikleri	4
Tablo.1.3. DBP'nin Fizikokimyasal Özellikleri	5
Tablo.1.4. DEHP'nin Fizikokimyasal Özellikleri	5
Tablo.2.1. GC Fırın Program	31
Tablo.2.2. Ftalatlara Ait Başlangıç Zaman ve İyonları	32
Tablo.3.1. ISTD Alan ve Konsantrasyon Değerleri	34
Tablo.3.2. DBP Alan ve ISTD'ye Oranlanmış Değerleri	35
Tablo.3.3. BBzP Alan ve ISTD'ye Oranlanmış Değerleri	36
Tablo 3.4. DEHP Alan ve ISTD'ye Oranlanmış Değerleri	37
Tablo3.5. DBP, BBzP ve DEHP Kalibrasyon Grafiklerinin R ² Değerleri	37
Tablo.3.6. DBP'in SS ve RSS Değerleri	39
Tablo.3.7. BBzP'in SS ve RSS Değerleri	40
Tablo.3.8. DEHP'in SS ve RSS Değerleri	41
Tablo.3.9. DBP'a Ait LOD ve LOQ Değerleri	42
Tablo.3.10. BBzP'a Ait LOD ve LOQ Değerleri	42
Tablo.3.11. DEHP'a Ait LOD ve LOQ Değerleri	43
Tablo.3.12. DBP'ye Ait Geri Kazanım Değerleri	43
Tablo.3.13. BBzP'ye Ait Geri Kazanım Değerleri	44
Tablo.3.14. DEHP'ye Ait Geri Kazanım Değerleri	44
Tablo.3.15. % Geri Kazanım Değerleri	45
Tablo.3.16. İdrar Numunelerindeki Ftalatların Değerleri (ppb)	45
Tablo.3.17. Tanımlayıcı İstatistikler	50
Tablo.3.18. Normallik Testleri	50

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Bütil Benzil Ftalatın Kimyasal Yapısı	4
Şekil 1.2. Di-n-bütil Ftalatın Kimyasal Yapısı	4
Şekil.1.3. Di(2-Etilhekzil) Ftalatın Kimyasal Yapısı	5
Şekil.1.4. SPE Yöntemi ile Maddelerin Ayrılma Şekli	20
Şekil.1.5. Gaz Kromatografisinin Şematik Gösterimi	22
Şekil.1.6. Kolon ve Fırın	23
Şekil.1.7. Kuadropol GC-MS Sisteminin Şematik Gösterilişi	25
Şekil.1.6. İyon Kaynağı	25
Şekil.1.8. QP Tipi Kütle Spektrometresi	26
Şekil.3.1. DBP Kalibrasyon Grafiği	35
Şekil.3.2. BBzP Kalibrasyon Grafiği	36
Şekil.3.3. DEHP Kalibrasyon Grafiği	37
Şekil.3.1. İdrar Numunesinde Ftalat Analizine Ait Kromatogram	48
Şekil.3.2. DBP'nin Histogramı	51
Şekil.3.3. DBP'nin Normal Q-Q Grafiği	51
Şekil.3.4. DBP'nin Kutu Grafiği	52
Şekil.3.5. BBzP'nin Histogramı	53
Şekil.3.6. BBzP'nin Normal Q-Q Grafiği	53
Şekil.3.7. BBzP'nin Kutu Grafiği	54
Şekil.3.8. DEHP'nin Histogramı	55
Şekil.3.9. DEHP'nin Normal Q-Q Grafiği	55
Şekil.3.10. DEHP'nin Kutu Grafiği	56

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgi

Ftalatlar (ftalat esterleri), ftalik asitin dialkil ya da alkil aril esterleridir. İlk olarak 1920'lerde üretilen ftalatlar, 1950'lerde ilk defa geliştirilen ftalat esterleriyle yumuşatılmış polivinil klorürün (PVC) büyük ölçekli ticari üretimiyle piyasaya sürülmüştür (Kimber ve Dearman, 2010).

Ftalatlar, PVC ürünlerine esneklik ve dayanıklılık veren plastikleştirici gibi birçok amaç için kullanılan endüstriyel kimyasalların bir üyesidir. Çözücülerde, motor yağlarında, fiksaj maddelerinde ve deterjanlar gibi kişisel bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır. PVC'ye katıldığı zaman, ftalatlar kovalent olarak bağlı olmadığından kolayca çevreye salınarak insan ve hayvanlarda maruziyete neden olurlar (Lyche ve ark., 2009).

Yıllık 3 milyon tondan daha fazla küresel olarak kullanılan ftalatlara (Bizzari ve ark., 2000), kullanımın yaygınlaşması, her yerde bulunabilmesi ve sürekli çevresel olarak varlığı nedeniyle insanların, evcil hayvanların ve yaban hayatın maruziyeti neredeyse kaçınılmazdır (Lyche ve ark., 2009).

Ftalatların kullanımı başlıca molekül ağırlıklarına bağlıdır. Yüksek molekül ağırlıklı di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP), di-isononil ftalat (DiNP) ve di-isodesil ftalat (DiDP) inşaat malzemelerinde, kıyafet, gıda ambalajlama, çocuk ürünleri ve tıbbi cihazlar gibi birçok PVC ürünlerinde kullanılmaktadır (Lyche ve ark., 2009). Düşük molekül ağırlıklı dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP) ve di-n-bütül ftalat (DBP) gibi ftalatlar ise daha çok çözücü olarak, kozmetikler, insektisitler ve farmasötiklerde kullanılmaktadır (Heudorf ve ark., 2007).

Uygulamalarda ftalatlar içinde en çok kullanılan DEHP ve bunun yanında bütül benzil ftalat (BBzP), di-isobutil ftalat (DIBP) ve DEP iken son zamanlarda DEHP yerine DIDP, DINP ya da di(2-propil heptil) ftalat (DPHP) gibi uzun zincirli ftalatların kullanımı artmıştır (Kimber ve Dearman, 2010).

İnsan maruziyetinin genelindeki ana kaynak üretim, işleme ve paketlenme esnasında kontamine olmuş gıdaların alımıdır. Diğer önemli kaynaklar ise iç mekan hava maruziyeti ve kozmetiklerdir (Koo & Lee, 2004; Kavlock ve ark., 2006). Ayrıca insanlar kan verme gibi tıbbi uygulamalar sırasında da tıbbi cihazlardan ftalatlara yüksek dozlarda maruz kalabilirler (Calafat ve ark., 2004). Ftalat esterleri ve onların metabolitleri kapalı mekanda, tüketim ürünlerinde, insan idrarında, anne sütünde ve amniyotik sıvıda belirlenmiştir. Dahası ftalatlara plasentada rastlamak mümkündür. Fetal maruziyet maternal maruziyetle yakından ilişkilidir (Lyche ve ark., 2009).

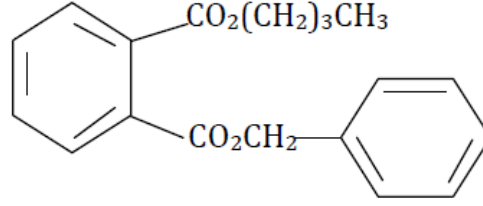
Tablo.1.1. Ftalatlar ve potansiyel maruziyet kaynakları (Heudorf ve ark., 2007).

Ftalat Diester	Potansiyel Maruziyet Kaynakları
Dietil ftalat (DEP)	Kişisel bakım ürünleri, kozmetikler
Bütülbenzil ftalat (BBzP)	Plastik yer karoları, gıda taşıyıcı bantlar, suni deri, trafik konileri
Di-n-bütüil ftalat (DBP)	PVC plastikler, lateks yapıştırıcılar, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, selüloz plastikler, boya çözücüleri
Di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)	Yapı malzemeleri (duvar kağıdı, elektrik teli ve kablo yalıtımı), araba ürünleri, giysi (ayakkabı, yağmurluk), gıda ambalajlaması, çocuk ürünleri (oyuncak), tıbbi cihazlar
Din-n-hekzil ftalat (DnHP)	Alet sapları, döşeme, vinil eldivenler, pire tasmaları, gıda proseslerindeki taşıyıcı bantlar
Di-n-oktil ftalat (DnOP)	C6-C10 ftalat karışımlarında, bahçe hortumları, yer karoları, tente, taşıyıcı bantlar
Di-isononil ftalat (DINP)	Bahçe hortumları, yer karoları, tenteler, oyuncaklar
Di-isodesil ftalat (DIDP)	PVC plastikler, tel ve kablo kaplama, suni deri, oyuncaklar

1.2. Ftalatların Kimyası ve Özellikleri

Ftalatlar, benzen halkasına iki fonksiyonel grubun bağlı olduğu diester yapısındaki maddeler olup ftalik asitin alkolle reaksiyonuyla oluşmaktadır (Autian, 1973; Lyche ve ark., 2009). Esterlerin çoğu renksiz sıvılardır. Sudaki çözünürlüğü düşük olup, zincir uzunluğu arttıkça diğer bir ifadeyle molekül ağırlığı arttıkça çözünürlükte azalmaktadır. Sonuç olarak, DMP ve DBP gibi kısa alkil gruplara sahip düşük molekül ağırlıklı ftalatların suda çözünürlüğü uzun zincirli ftalatlara oranla daha fazladır (Lyche ve ark., 2009). Standart sıcaklıkta uçuculuk özellikle DEHP ve BBzP gibi uzun zincirli ftalatlar için genellikle düşüktür (Rusyn ve ark., 2006). Düşük uçuculuğa sahip ve suda çözünürlüğü az olmasına karşın organik çözücülerde ve yağlarda çözünürler (Autian, 1973).

Bütil benzil ftalat (BBzP); butanol ve benzil klorürün ftalik anhidridle sıralı reaksiyonu ile oluşur (NTP-CERHR, 2003).

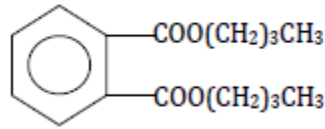


Şekil 1.1. Bütil Benzil Ftalatın kimyasal yapısı.

Tablo.1.2. BBzP'nin Fizikokimyasal Özellikleri.

Özellikler	Değer
Kimyasal Formülü	$C_{19}H_{20}O_4$
CAS No	85-68-7
Moleküler Ağırlığı	312.35 g/mol
Buhar Basıncı	6×10^{-7} mmHg (25°)
Erime Noktası	-40.5 °C
Kaynama Noktası	370 °C
Suda Çözünürlüğü	Az 2.7 mg/L

Di-n-bütil ftalat (DBP); n-butanol ile ftalik anhidridin reaksiyonuyla oluşur (NTP-CERHR, 2000b).

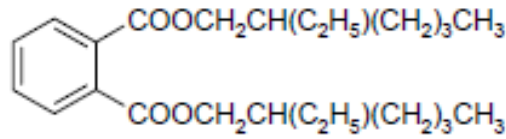


Şekil 1.2. Di-n-bütil ftalatın kimyasal yapısı.

Tablo.1.3. DBP'nin Fizikokimyasal Özellikleri.

Özellikler	Değer
Kimyasal Formülü	$C_{16}H_{22}O_4$
CAS No	84-74-2
Moleküler Ağırlığı	278.35 g/mol
Buhar Basıncı	2.7×10^{-5} mmHg (25°)
Erime Noktası	-35 °C
Kaynama Noktası	340 °C
Suda Çözünürlüğü	Az 11.2 mg/L

Di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP); bir asit katalizörü varlığında 2-etilhekzil alkol ile ftalik anhidritin esterleşmesiyle oluşur (NTP-CERHR, 2006).

**Şekil.1.3.** Di(2-etilhekzil) ftalatın kimyasal yapısı.**Tablo.1.4.** DEHP'nin Fizikokimyasal Özellikleri.

Özellikler	Değer
Kimyasal Formülü	$C_{24}H_{38}O_4$
CAS No	117-81-7
Moleküler Ağırlığı	390.57 g/mol
Buhar Basıncı	1.0×10^{-7} mmHg (25°)
Erime Noktası	-47 °C
Kaynama Noktası	384 °C
Suda Çözünürlüğü	0.041 mg/L

1.3. Maruziyet Yolları

Ftalatların fizikokimyasal özellikleri kimyasal yapısıyla çeşitlilik gösterir ve genellikle buhar basınçları düşük olmasına rağmen buhar fazı içerebilir. Oral alım, inhalasyon, intravenöz enjeksiyon ve deri absorpsiyonu olası maruziyet yollarıdır. İnsanların ftalatlara maruziyeti ya direk temas sonucu ya da ftalat içeren ürünlerin kullanımıyla gerçekleşebilir (Aurela ve ark., 1999).

1.3.1. Oral

Ftalatların mideden alınımı; yiyecekler, enteral beslenme mamaları, farmasötikler, ek besinler, emen çocukların oyuncakları ve diğer ağız objeleriyle gerçekleşmektedir.

Genel nüfustaki ftalat maruziyetinin en büyük kaynağı kontamine olmuş gıdaların alınımıdır. Ftalatların gıdadaki seviyeleri geniş ölçüde değişken olmasına ve veriler çoğunlukla eski olmasına rağmen şimdiki maruziyet seviyesini gösteremeyebilir. Tahminen, günlük alınımı DBP için maksimum 0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ (MAFF, 1996), DEHP için 4.9–18 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ (Meek & Chan, 1994), BBzP için 0.11–0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ 'dür (MAFF, 1996).

IV çözeltileri, kan, besinsel formüller ve solunum gazlarının verilmesi için DEHP ile yumuşatılmış polivinil yapımı tıbbi cihazlar değişken miktarlarda ftalat özütlemektedir. Yağ içeren çözeltiler özütlemeyi kolaylaştırırlar. PVC/DEHP paketlerde saklanan yağ emilsüyonu içeren ve PVC/DEHP boru sistemiyle iletilen enteral mamadan DEHP maruziyeti tahminen yaklaşık olarak maksimum 9.5 mg/gün'dür. Yetişkinlerde 0.14 mg/kg/gün iken yeni doğan bebeklerde bu yolla maruziyet 2.5 mg/kg/gün olabilir (FDA, 2001).

Farmasötik ilaçlar çoğunlukla ilacın sindirim kanalında dağılım yerini ve zamanını etkileyecek şekilde bir polimerle kaplanırlar. Eudragit, amonyak metakrilat kopolimer kaplaması olup düşük mide pH'sında bozunmadan dururken yüksek pH'lı kalın bağırsakta bozulur (Chourasia ve Jain, 2003). Bağırsakta ilaç dağılımını etkilemek için Eudragit'e DBP ve DEP içeren çeşitli plastikleştiriciler katılabilir. ABD Patent Ofisinin veri tabanındaki bir internet araştırması (<http://www.patentstorm.us/>), kaplamalarında DBP ve DEP içeren ftalat plastikleştiricilere sahip farmasötik ürünlerin birçok örneklerini göstermektedir. Bunlar içinde yaygın olarak kullanılanlar antibiyotikler, antihistaminler ve laksatiflerdir. Gebelik sırasında kullanımı için tasarlanmış olanlar da dahil olmak üzere patentli bitkisel ilaçlar ve ek besinlerde formülasyonlarında ftalatları içerebilirler (Schettler, 2006).

Bir durum raporunda, ülseratif kolit için Asacol alan bir bireyin idrarında yüksek miktarda (16 868 ng/mL) DBP'nin monoester metaboliti tespit edilmiştir (Hauser, 2004). Yaygın olarak kullanılan farmasötikler, bitkisel ilaçlar ve ek besinler genel popülasyonda ftalat maruziyetinin araştırılmamış önemli kaynaklarından olabilir (Schettler, 2006).

Ftalatlarla yumuşaklaştırılmış polimer oyuncaklar çocuklarda potansiyel oral maruziyet kaynağıdır. Avrupa Birliği bütün çocuk oyuncakları, DEHP, DBP ve BBZP içeren çocuk bakım eşyaları bunun yanı sıra DiNP, di-n-oktil ftalat (DnOP) ve DiDP içeren 3 yaş altı çocuklar için tasarlanmış oyuncakların pazarlanmasını geçici olarak yasaklamıştı. Çocukların ağız aktivitelerinden kaynaklanan ortalama DINP maruziyeti tahminen varsayımlar ve istatistiksel tekniklere bağlı olarak 5.7 ile 44 µg/kg/gün aralığındadır (Kavlock, 2002a).

1.3.2. İnhalasyon

Maruziyetin niceliği nadiren denenmiş olmasına rağmen DEHP, PVC borularından geçen solunum gazlarıyla transfer edilebilir. Hill, deneysel koşullar altındaki ölçümlerini baz alarak solunum tedavisi ile DEHP maruziyetinin 28.4–94.6 µg/gün olarak hesaplamıştır (Hill, 1997).

Polimer modelleme kili oluşturulup ardından bir fırında pişirilerek iyileştirilir. Ftalatların kompleks bir karışımı oda sıcaklığında materyale yumuşak bir sabitlik sağlar. Sculpey ve Fimo çamurundan 10 örnek ağırlıkça % 3.5 ile % 14 arasında düzeyde toplam ftalat içermektedir. Pişirme sonrası ftalatların havadaki konsantrasyonu BBzP için (32-2667 µg/m³), DnOP için (ND-6670 µg/m³)dir. DEHP ve/veya kimyasal olarak benzer analogları 6.05-4993 µg/m³ olarak saptanmıştır. Kısa süreli maruziyetlerde US EPA, 18 yaş altı çocuklarda solunum hacminin tahmini olarak değerini ortalama 1.0 m³/sa olarak kullanılmasını önermektedir. 1 saatlik maruziyet süresinde bu BBzP, DnOP ve DEHP için sırasıyla 2667, 6670 ve 4993 µg maksimum soluma maruziyeti ile sonuçlanabilmektedir (Schettler, 2006).

Kapalı mekan hava ve tozları; bina ürünleri, ev döşemeleri, oyuncaklar, kıyafetler ve otomobil içi plastik bileşenlerden sızan ftalatları içermektedir. Ftalatlarla çevrenin kontaminasyonu, bazı belirlenmemiş derecede gıda, su ve kapalı mekan toz seviyelerinde payı bulunmaktadır (Schettler, 2006).

Otake (2004) Tokyo'da 27 evde yaptığı ftalat seviyesi analizinde DEP, DBP, BBzP, disikloheksil ftalat ve DEHP sırasıyla 0.10, 0.39, 0.01, 0.07 ve 0.11 µg/m³ olarak rapor edilmiştir. 20 m³/gün soluyan yetişkin bir birey için, soluma maruziyeti sırasıyla 2, 78, 0.2, 1.4 ve 22 µg/gün olarak sonuçlanmıştır. Kontamine tozları soluma daha geniş soluma maruziyeti ile sonuçlanacaktır.

1.3.3. İntravenöz

DEHP ile plastikleştirilmiş PVC yapımı çeşitli tıbbi cihazlar sağlık bakımında kullanılmaktadır. Poşet ve/veya borular intravenöz sıvıları, besin mamalarını, kanı dağıtmakta ve ekstrakorporeal membran oksijenlendirme ve diyalizde kullanılmaktadır. Cihazlardan sızan DEHP yağ içeriği, sıcaklık, depolama süresi ve çalkalama ile farklılaşmaktadır (FDA,2001). Özgün çalışmalar özel koşullara ve ekipman seçimlerine bağlı olarak maruziyet düzeylerinde varyasyon gösterir. Örneğin; ekstrakorporeal membran oksijenlendirme (ECMO)'den gelen DEHP maruziyeti heparinlenmiş PVC/DEHP borular kullanılarak oldukça azaltılabilir (Karle, 1997).

Calafat (2004), IV aşılama içeren yoğun tıbbi tedavi alan 6 prematüre bebeğin idrarlarında DEHP metabolitlerini ölçümü sonunda genel popülasyondaki ortalamadan (2.7 ng/ml) daha yüksek oranda MEHP metabolitinin (129 ng/ml) olduğunu raporlamıştır. Green (2005) 2 yeni doğan yoğun bakım ünitesinden 54 yeni doğmuş bebekten alınan idrar örneklerinde DEHP metabolitlerini ölçmüştür. Bu çalışma, artan yoğun bakım ve DEHP içeren cihazların daha sık kullanımı ile DEHP'nin idrardaki metabolitlerinin daha yüksek seviyede olduğunu belgelemiştir. Yoğun bakımda bulunan bebeklerdeki ortalama idrar MEHP değerleri düşük, orta ve yüksek seviyeleri sırasıyla 9.3, 41, 139 ng/mL'dir.

1.3.4. Deri

Deri; ftalat içeren kıyafetler, kozmetikler, güneş kremleri, insektisitler, diğer kişisel bakım ürünleri, modelli kiler, oyuncaklar, temizlik malzemeleri ve protez malzemeler ile direk temasla karşı karşıya kalabilir (Munksgaard, 2004).

Genelde transdermal absorpsiyon kimyasal konsantrasyona, kimyasal yapıya, sudaki çözünürlüğe, taşıyıcı formülasyonu ile stratum corneum arasındaki oktanol:su dağılım katsayısına, taşıyıcının formülasyonuna ve uygulamanın anatomik alanına bağlıdır (US EPA, 1992). Kimyasalların yüz, koltuk altı ve skrotumdan absorpsiyonu koldan 10 kat daha fazla olabilir (Schettler, 2006).

Kemiricilerin derileri kullanılarak yapılan çalışmalar ftalatların absorpsiyonunun genellikle düşük olduğunu gösterir. İn vitro olarak yapılan karşılaştırmalı çalışma, insan derisindeki çalışmalar az olmasına rağmen ftatlara karşı insan derisinin fare derisinden daha az geçirgen olduğunu göstermiştir (Scott, 1987; Elsisi, 1989). İnsan üst kolunda in vivo olarak yapılan çalışma, propilen glikolde DBP'in doygun çözeltisi uygulandığında DBP absorpsiyonunun maksimum akışını $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{saat}$ olduğunu göstermiştir (ortalama 3.8) (Hagedorn-Leweke & Lippold, 1995). Yazarlar, oktanol:taşıyıcı dağılım katsayısının deri absorpsiyonunda en geniş dedeterminant olduğu kanısına varmışlardır. Dimetil ftalat (DMP) ve DBP böcek kovucu olarak kullanılırdı (Ware & Whitacre, 2004). DBP, DEP, DMP ve DnOP son zamanlarda US EPA'nın "potansiyel toksik inertler" listesinde olup, dermal ve soluma maruziyetlerine neden olan insektisitler ve kovucular içindeki diğer maddelerle birlikte kullanılabilir (Schettler, 2006).

1.4. Toksikokinetik

1.4.1. Absorbsiyon

İn vivo olarak insanda dermal absorpsiyon çalışmaları mevcut değildir. Buna rağmen rat ve insan derisinden ftalat esterlerinin absorpsiyonunun in vitro karşılaştırması, ftalatların rat derisinde daha hızlı absorbe olduğunu göstermiştir (Scott, 1987). Bununla beraber rodentlerde dermal absorpsiyon nispeten yavaştır (Elsisi, 1989). Ama bir kere absorplandığında bileşiklerin oral olarak alındığı durumda olduğu gibi ftalatlar dağılırlar. Kobaylarda uygulanan dermal dozun sadece

% 3 ile % 21'i absorplanmıştır ve 1-7 gün sonra sırayla vücuttan atılmıştır (Ng, 1992). İnsanlarda inhalasyonla ftalatların absorpsiyonu üzerine uygun bir çalışma mevcut değildir. Buna rağmen PVC solunum boruları ile hava verilen yeni doğanlarda ve ftalatlara mesleki olarak maruz kalan işçilerde akciğerler ile absorpsiyon için dolaylı tespiti gözlenmiştir. İnhalasyon yoluyla alımı gerçekleştiği düşünülen, bebek ve işçilerin idrarlarında önemli ölçüde yüksek seviyelerde MEHP ve ikincil metabolitleri saptanmıştır (Pan ve ark., 2006; Kavlock ve ark., 2002b). Ayrıca, radyoaktif olarak etkilenmiş DEHP inhalasyonla maruziyette ratlarda hızlıca absorbe edilmektedir (General Motors, 1982).

Ftalatlar, bağırsak lipazlarıyla hızlı hidrolize edildiğinden, başlıca monoesterler formunda, geniş konsantrasyon-bağımlı aralığında rat bağırsaklarında hızlıca absorplanırlar. DEHP, çalışılan hiçbir türün idrarında saptanamamıştır ancak feçeste idrardaki metabolitlerin derecesine ters orantı miktarlarda bulunmuştur. Çünkü sindirim sisteminden ana bileşiklerin absorpsiyonu az olmaktadır (Kavlock, 2002b). Rodentlere oral uygulama sonrası, gıdalarda birleşmiş olarak DBP'nin % 90'dan fazlası ve DEHP'nin % 40-50'sinin idrarda tespiti gıdalardaki ftalatların iyi bir şekilde absorplandığını gösterir (Kluwe, 1982). Koch (2006), idrar metabolitlerinin seviyelerini ölçerek sağlıklı Kafkas erkek gönüllülerde DEHP'nin oral absorpsiyonunu değerlendirmiştir. 24 saat sonra dozun % 67'si, takiben ikinci gün % 3.8'lik ilaveyle idrarla atılması midedeki DEHP'nin çoğunun sistematik şekilde absorplanıp idrarda atıldığını göstermektedir.

1.4.2. Dağılım

Absorlandıktan itibaren ftalatlar ve metabolitleri vücudun her yerinde bütün dokularda dağılmaktadır. Farklı türlerde DEHP dağılımıyla ilgili birkaç çalışma karaciğer ve böbreklerde en yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermektedir. Ek olarak, insanlarda ftalatlar seminal sıvı, amniyotik sıvı, tükürük ve plasentada da bulunmaktadır (Koch, 2003a, 2003b; Calafat, 2004; Silva 2004a, 2004b, 2005).

Dokularda anlamlı olmayan kümülatif birikim uygulanmasından birkaç gün sonra dozun % 1'den daha azının kalmış olduğu belirtilmiştir. (Kavlock, 2002b). Ftalatlar plasenta ile fetusa iletilir, buda rahim yaşamı sırasında bu kimyasallara maruziyetin gerçekleştiğini gösterir (Latini, 2003, 2006; Mose, 2007) ve fetal ftalat seviyeleri maternal konsantrasyonlar ile ilişkilidir. Ftalatlar bebeklerin ana besin kaynağı olan anne sütünde de tespit edilmiştir (Mortensen, 2005; Zhu, 2006). Ftalatların plasenta ile fetusa ve anne sütüyle yeni doğmuş bebeğe aktarımı rodentlerde de belgelenmiştir. (Srivastava, 1989).

Oral ya da intravenöz (IV) yoluyla alınan DBP hızlıca temizlenir. Gözlenen biyobirikim çok azdır ya da hiç yoktur. Radyoaktif DBP uygulanmasıyla gastrointestinal (GI) sistemde, boşaltım organlarında (karaciğer ve böbrek) ve yağda bulunabilir. Karaciğer, böbrek ve GI sistemde muhtemelen atılımın bir mekanizması olarak birikebilir (Williams & Blanchfield, 1975).

1.4.3. Biyotransformasyon ve Atılım

Oral alımın ardından diester ftalatlar nonspesifik esterazlar ve sindirim yolundaki lipazlar tarafından hızlı bir parçalanma ile monoesterlerine ayrılırlar. Bebeklerin azalmış metabolik kapasitelerinden dolayı yetişkinlere nazaran pankreas lipaz daha düşük seviyelerdedir. Bebeklerdeki bu düşük pankreas lipaz aktivitesine rağmen anne sütü, tükürük, mide ve karaciğerdeki lipazlar sayesinde ftalatlar metabolitlerine dönüşebilirler. Türler arasında lipaz aktivitesinde anlamlı bir değişkenliğin olabildiğini öneren farklı türlerdeki kinetik çalışmalar biyotransformasyonun birinci basamağında cinsler arası yüksek değişkenliği ispatlamıştır (İto, 2005). Absorpsiyonun ardında monoesterler, çeşitli oksidasyon ve hidroksilasyon reaksiyonlarıyla, idrarla atılan ya da atılım öncesi glukuronik asite konjuge olan ikincil metabolitlerine metabolize olurlar. Yetişkinlerde üriner metabolitlerin hemen hemen %80-90'ı glukuronik asite konguje olurlar (Peck & Albro, 1982). Çocuklarda 3 aylık olana dek glukuronidasyon yolları tam olarak

gelişmediğinden, bu önemli atılım mekanizması yeni doğanlar ve küçük bebeklerde tam olarak uygun değildir (Cresteil, 1998). Ayrıca prematüre ve normal bebeklerde, toksik metabolitlerin dahili dozlarını artırabilen, azalmış glomerüler filtrasyon hızına ve olmamış glukuronidasyona bağlı düşük renal atılıma sahiptirler (Kavlock, 2006). DEHP'nin, başlıca monoesteri mono(2-etilhekzil) ftalat (MEHP) ve dört adet ikincil metabolitleri mono(2etil-5-hidroksihekzil) ftalat (5OH-MEHP), mono(2-etil-5oksohekstil) ftalat (5okso-MEHP), mono(2-etil-5-karboksipentil) ftalat (5cx-MEPP), mono(2-karboksimetil hekzil) ftalat (2cx-MMHP) anlamlı seviyelerde idrarda tespit edilmiştir (Koch, 2006). Döteryumlu DEHP'nin ikincil metabolitleri olarak atılması gerekirken, kontrollü oral dozunun % 10'dan daha azı idrarda MEHP olarak atılmıştır (Koch,2005). Ayrıca ikincil metabolitler, ana monoester MEHP'a kıyasla oldukça uzun eliminasyon yarı ömrü ve daha geç azami üriner atılım göstermiştir. Bu uzun yarı ömürlü eliminasyon, kronik maruziyet koşullarında oksitlenmiş ftalat metabolitlerinin insanlarda birikebildiğini gösterir. DEHP'a maruz kalan işçilerde, iş vardiyası sırasında üriner metabolitleri iki kat artmıştır (Liss, 1985). Diğer bir çalışmada 2 erkek gönüllü DEHP almış ve 24 saat içerisinde idrarda sadece MEHP seviyeleri analiz edildiğinde dozun yaklaşık %13'ü atılmıştır (Schmid ve Schlatter, 1985). Tam tersi, maruziyet belirteçleri olarak ikincil metabolitleri (5OH-MEHP, 5okso-MEHP, 5cx-MEPP, 2cx-MMHP) içerdiğinde gönüllü bir erkeğin idrarında uygulanan dozun % 70 civarında olduğu tespit edilmiş olup, buda sadece monoesterlere odaklanmış olan bir önceki çalışma maruziyet derecesini önemli ölçüde değerini düşürmüştür (Koch, 2003b, 2006; Fromme, 2007). Aynı çalışmada predominant metabolit olarak monoester MEHP ile birlikte beş metabolit kan plazma örneklerinde tespit edilmiştir. Ratlar ve marmosetlerle kıyaslandığında insanda MEHP'in daha yüksek kan seviyelerine yol açtığını varsayarsak, gönüllülerin kanındaki MEHP'in alan konsantrasyon- zaman eğrisi, ratlar ve marmosetlerde önceden bulunandan 15-100 kat daha yüksek hesaplanmıştır (Wittassek & Angerer, 2008).

Radyoaktif olarak etiketlenmiş DEHP'a oral olarak ya da soluma ile maruz kalan ratlar da hemen hemen doza eşit miktarlarda idrar ve feçeste atılmıştır. Dahası

ratlardaki oral çalışmalar 5-7 günde dozun % 80'ninin atıldığını göstermiş ve doz artıkça fekal atılım azalmasına rağmen üriner atılım artmıştır. IV aşılama ile ratların dozlanması oral dozlamada olduğu gibi idrar ve feçeste yakın atılım hızlarıyla sonuçlanmıştır (Koo & Lee, 2007).

Oral olarak ratlarda yapılan çalışmalar BBzP'nin hızlıca monoesterlerine (monobutil ve mono benzil ftalatlar) metabolize olduğunu göstermektedir. Bu metabolitler absorblanıp ya idrarda esterleri olarak ya da glukuronik asitle konjuge olduktan sonra glukuronat olarak idrarla atılırlar (National Toxicology Program, 2000a).

Ratlarda 3 gün boyunca oral uygulamayı takiben (3.6 mmol BBzP/kg/gün) idrar metabolitlerinin % 70'inin monoesterleri olduğu, kalan kısmının ise monoester konjugatları olduğunu göstermiştir. Monobutil esteri genellikle en yüksek miktarda olup bir çalışmada monobutilin mono benzil ftalata oranının 5:3 olduğu gösterilmiştir (Mikuriya ve ark, 1988).

Düşük dozlarda (2-200 mg/kg) absorblanan BBzP ve metabolitlerinin atılımı hızlıca olup, yaklaşık olarak % 90'ı 24 saat içinde elimine olur. Bunun yaklaşık % 80'i idrar, % 20'si ise feçestedir. Kandaki BBzP'nin yarı ömrü 10 dakika olup, metabolitlerinin ise yaklaşık 6 saattir (Eigenberg ve ark., 1986).

Lake ve arkadaşları (1977); rat, babun ve insan bağırsak preparatlarıyla yaptıkları DBP'nin monohidrolizinin görelî oranlarını karşılaştıran çalışmalarında bu türlerin benzer içsel lipaz aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Rodentlerde DBP de dahil olmak üzere dialkil ftalatların birçok dokuda bulunan enzimler tarafından metabolize olduğu bulunmuştur. Genellikle oral olarak alınan

ftalat diesterlerin kantitatif olarak hidrolizinin bağırsak florasıyla değilde, ince bağırsak duvarındaki lipazlar ile pankreas lipazları tarafından olduğu kabul edilir (Rowland ve ark., 1977).

DBP ana metaboliti olan MBP'nin eliminasyonda birincil yolu rodentler ve insanlarda idrar atılımıdır. Rat idrarında monobutil ftalat glukronid tanımlanan birincil metaboliti olarak görünür (Saillenfait ve ark., 1998). Etkin enterohepatik dolaşımın olduğunu belirtir şekilde MBP (yaklaşık % 45) safrayla atılırken sadece yaklaşık % 5'lik kısmı feçesle elimine olur. DBP'nin safra metabolitleri monobutil ftalat, monobutil ftalat glukronid ve okside monobutil ftalat glukronid içermektedir (Tanaka ve ark., 1978). Ratların dermal olarak DBP'ye maruziyeti sonrasında, idrar birincil atılım yolu olup atılım hızı hemen hemen günde dozun % 10-12'sidir (Elsisi ve ark., 1989).

1.5. Toksikoloji

Ftalatların akut olarak toksik olduğu gösterilmemiştir. Kronik toksisitesi sadece laboratuvar hayvanlarında çalışılmıştır. İnsanlarda kronik maruziyetin olduğu birkaç mesleki çalışmada yan etkilerin fazla riskli olduğu öne sürülmüştür. Bir vaka kontrol çalışması prematüre telarşlı kızlardaki bazı ftalatların kontrol grubundaki kızlara kıyasla daha yüksek serum seviyelerinin olduğu bulunmuştur. Uzun süreli takip edilen çalışmalarda tıbbi olarak maruz kalan bebeklerde potansiyel ftalat toksisitesi değerlendirilmiştir. İnsan toksisitesi çok iyi çalışmadığı için, hayvan toksikoloji verileri insan maruziyetleriyle bağıntısı incelenmelidir. Her bir ftalat esterinin toksisitesi ana bileşiğin bir toksik metabolite dönüşümüne bağlıdır. Dönüşümün miktarı maruziyet yolu, hayvan türlerindeki çalışmalar ve maruz kalan hayvanların yaşı ile değişmektedir. Toksikokinetikte bu farklılıklar DEHP hakkında mevcut verilerle iyi şekilde kanıtlanmıştır (Shea, 2003).

Hayvanlarda ftalat çalışmaları hepatik peroksizom proliferasyon ve kanser, böbrek ve tiroide değişimleri içeren çeşitli yan etkiler oluşturmuştur (Kavlock, 2006). Bununla birlikte gözlenen çok ciddi yan etkiler üreme ve gelişimsel etkilerle ilgili görünmektedir. Çok daha az araştırılmasına rağmen ftalatların tiroid sinyali, immün fonksiyonları ve metabolik homeostazis gibi diğer fonksiyonları ve sistemleri ters olarak etkilediğini gösteren raporlar mevcuttur (Jaakkola & Knight, 2008; Meeker, 2007; Stahlhut, 2007). Bir veya daha fazla hayvan türündeki gözlenen etkilerden dolayı DEHP, DBP ve BBzP'nin normal gelişim ve üremeyi bozma potansiyeline sahip olduğuna dair genel fikir birliği vardır (Fabjan, 2006). Rapor edilen yan etkiler, testisler ve erkek üreme mukoz bezlerinde patolojik değişimleri, hipospadias, kriptorşitizm, nipellerin birikimi, azalmış anogenital mesafe (AGD) ve azalmış sperm üretimini içermektedir. Bu doğum sonrası değişimler azalmış testosteron üretimi (Fisher, 2003; Foster, 2006; Latini, 2006; Mylchreest, 2000; Parks, 2000; Sharpe, 2006) ve insülin benzeri faktör 3 (INSL3) mRNA seviyeleri (Wilson, 2004) ile ilişkili fetal Leydig-hücre fonksiyonunun bozulmasıyla oluşmuştur. Ayrıca DBP fetal maruziyeti yetişkinlerde testis Leydig hücre adenomalarıyla sonuçlanmıştır (Mylchreest, 2000; Barlow & Foster, 2003; Barlow ve ark., 2003).

Ftalat maruziyetine bağlı yan etkiler doz ve zamana bağlıdır. 6-15 günlük gebelik süresince maruz bırakılan ratlardaki standart teratolojik çalışmalarda yüksek dozlarda maruziyetleri takip eden etkileri gösterilebilmiştir (Ema, 1993, Hellwig, 1997; Waterman, 1999). Buna rağmen bu çalışmalar üreme sistemleri farklı olan (Gebelik Günü 12-20) gebe bireylerde bu süre içinde gerçeği yansıtmaz. Son çalışmalar, üreme gelişimi üzerine tüm ters cevapların geç gebelikteki maruziyeti takiben düşük dozlarda uyarılmış olduğunu göstermiştir (Mylchreest ve ark., 2000; Foster ve ark., 2001, Foster, 2006; Gray ve ark., 2000; Tyl ve ark., 2004; Ryu ve ark., 2007). DEHP, DBP ve BBzP en çok araştırılan ftalatlar olup DEHP > DBP > BBzP şeklindeki relatif toksik etkisiyle hemen hemen benzer cevaplar verdikleri bulunmuştur (Foster, 2005). Fakat diğer ftalatların üreme toksik potansiyeli ile ilgili sınırlı verilere rağmen, DnHP, DiBP ve DiNP gibi diğer ftalataların üreme toksisitesine sebep olduğunu gösteren bilgiler vardır (Fabjan, 2006; Howdeshell, 2008; Borch, 2006).

Rat çalışmalarında gözlenen etkiler insanlarda testiküler disgenezisi sendromuna benzemektedir. Bu sendrom, insanlarda gözlenen sperm sayısında düşme, yüksek oranda testiküler ve prostat kanserleri, yüksek oranda kriptorşidizm ve hipospadias gibi erkek üreme eksikliklerinin sayısındaki rapor edilen artışı açıklamak için ileri sürülmüştür (Sharpe & Skakkebaek, 2008). Şimdiye kadar insan sağlığı ve çevresel ftalat maruziyeti arasındaki ilişkiyi birkaç çalışma kanıtlamıştır (Kavlock, 2006; Matsumoto, 2008). Mevcut veriler, ftalat maruziyeti ile insan üreme sağlığı yan etkileri arasında bir bağlantı ortaya koymasına rağmen, insanlarda maruziyet ve bunların etkileri arasındaki neden sonuç ilişkisi kurmak için kanıtlar çok sınırlıdır. Fakat hayvan çalışmaları bu hipotezi desteklemektedir (Skakkebaek, 2006; Foster, 2005; Latini, 2006).

T.C. Sağlık Bakanlığı da “Oyuncak ve Çocuk Bakım Eşyalarındaki Phthalatlar Hakkında Tebliğ” (2005) adı altında üç yaşından küçük çocukların ağızlarına götürebilmesi muhtemel olan ve ağırlığının % 0,1’inden fazlasını DINP, DEHP, DNOP, DIDP, DBP ve BBzP’den bir veya birkaçının oluşturduğu kısmen ya da tamamen yumuşak PVC’den üretilen oyuncaklar ile çocuk bakım eşyalarında kullanılmasında sınırlama getirildiğini 20.10.2005 tarih ve 25972 sayılı Resmi gazetede yayınlamıştır. Ayrıca bakanlığın kozmetik yönetmeliğinde yer alan ek-II’de kozmetik ürünlerinin içermemesi gereken maddeler listesinde DEHP, BBzP ve DBP bulunmaktadır.

1.6. Kimyasal Ayırım Yöntemleri

Bir karışımda bulunan bileşiklerin fiziksel veya kimyasal özelliklerindeki farklılıklar kullanılarak bileşenlerine ayrılabilir. Fiziksel ayırmalar genelde büyüklük ve yoğunluk farkı kullanılarak yapılırken, ayırımı sağlayan kimyasal özellikler; çözünürlük, kaynama noktası ve buhar basıncıdır.

Ayırım metodları;

- a) Santrifüj
- b) Kromatografi
- c) Distilasyon
- d) Ekstraksiyon
- e) Elektroforez
- f) Ultrafiltrasyondur.

Kromatografide numune ve içindeki tüm maddeler hareketli bir fazla sürüklenirler veya taşınırlar. Numune içindeki bileşenler sabit fazla aralarındaki ilgiye göre az veya çok tutulurlar. Ancak yürütücü faz tarafından detektöre iletilirler ve spektrumda pik olarak görünürler. Numunedeki analitin durucu ve hareketli faz arasındaki konsantrasyon oranı o bileşiğin dağılma katsayısını verir. Katı faz ekstraksiyonunda aynı prensiple işlediği için özellikle kromatografik analizlerde numune hazırlama aşamasında en çok kullanılan yöntemdir (Söylemezoğlu ve Çeçen, 2003).

1.6.1. Katı Faz Ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE)

Katı faz ekstraksiyon (SPE), numune ön hazırlığı aşamasında kullanılan güçlü bir yöntemdir. SPE proteinler gibi interfere eden matriks bileşenlerini uzaklaştırmak ve metabolitleri ve biyoaktif ilaçların kantitatif tayinlerinde pg/ml düzeyine kadar inebilmek için gereken numune ön hazırlama aşamasıdır.

Ekstraksiyon belli bir matriks içindeki numune(ler)in katı bir desteğe (sorbent) adsorplanması vasıtası ile olur. SPE kartuşlarında ekstraksiyon iki ayrı temel prensip üzerine kuruludur:

- Matrikste interfere eden maddeler adsorplanır, ancak analit adsorban tarafından tutulmaz. Bu strateji eğer aranan analit matriksin içinde yüksek konsantrasyonda bulunursa uygulanır.
- Matrikse interfere eden maddeler yıkanarak toplanırken analit adsorbana tutunur. Eğer aranan madde düşük konsantrasyonda ise veya polariteleri çok farklı maddelerin ayrımı isteniliyorsa ikinci yolun kullanımı daha uygundur. Bu yol özellikle analitin çok düşük düzeylerde olduğu durumlarda ve çok seyreltik bir numunenin konsantre hale getirilmesi için kullanılır.

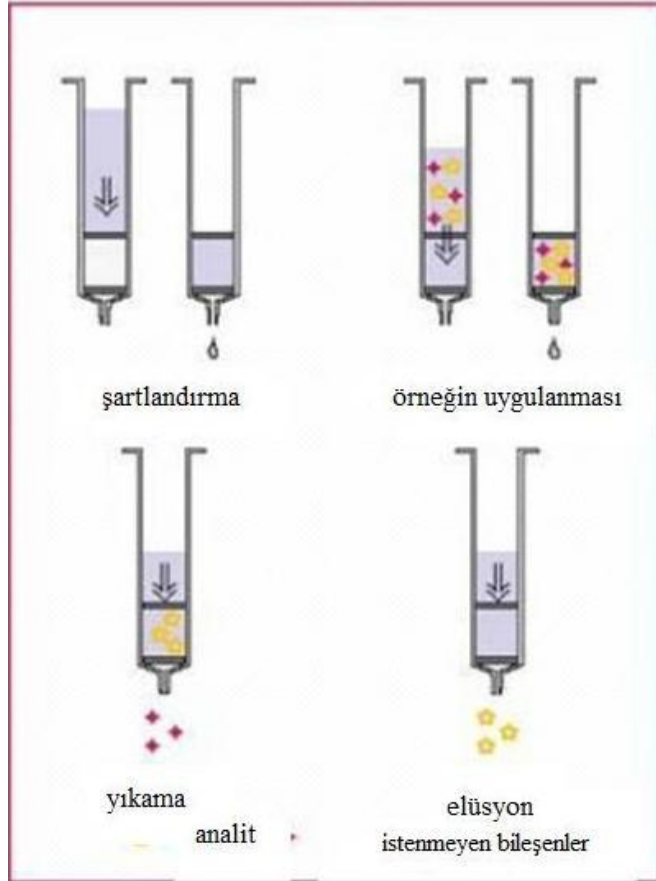
SPE ile yapılan ekstraksiyonun üç ana amacı vardır:

- Analiti daha konsantre hale getirmek: Numune hazırlama esnasında analit daha konsantre hale getirilerek kantitatif tayin sınırları içerisinde çekilmelidir.
- İnterferansların uzaklaştırılması: Numune ortamındaki diğer bileşenler tayin edilmesi gereken analiti maskeleyebilirler. Numune ön-hazırlama aşamasında istenmeyen tüm bileşikler uzaklaştırılarak, aranan analitin temiz ve informatif kromatogramı elde edilir.
- Analitin çözeltiliye çekilmesi: Ekstre edilmiş numune daha sonraki analitik aşamalar için uygun bir çözücü içine alınır.

SPE yöntemi dört ana basamaktan oluşmaktadır:

- a) *Şartlanma*: Analitin adsorbanla etkileşiminin gerçekleşebilmesi için adsorbanın şartlandırılması gerekir. Şartlanma basamağının bir başka ismi de çözücü ile ıslatma, yıkamadır (solvation). Adsorban ıslatılarak analitin adsorblanması kolaylaştırılmış olur.
- b) *Adsorbsiyon (Numune uygulanması)*: Kartuşa uygulanan matriks içindeki analit alıkonulur.

- c) *Adsorbanın yıkanması (Aritma, durulama)*: Potansiyel interferans maddelerin kartuştan geçmeleri sağlanırken, bileşiğin sorbente bağlı kalması temin edilir.
- d) *Elüsyon*: Artık saflaşmış olan numune analiz için toplanır (Söylemezoğlu ve Çeçen, 2003)



Şekil.1.4. SPE yöntemi ile maddelerin ayrılma şekli.

1.6.2. Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi (GC-MS)

1.6.2.1. Gaz Kromatografisi

Kromatografi; bir karışımda bulunan maddelerin, hareketli ve sabit faz arasında dağılıma, adsorpsiyon, iyon değişimine ve bunun gibi bazı mekanizmalara bağlı

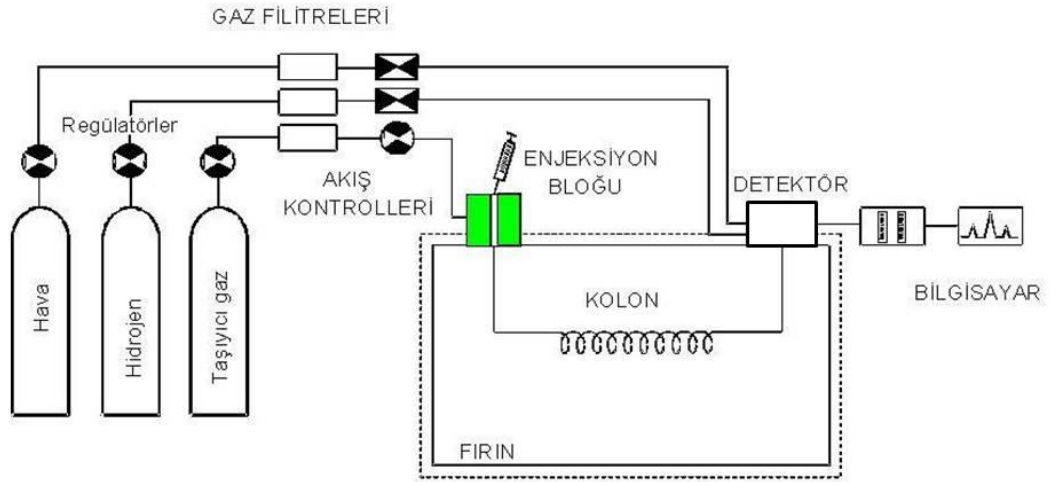
olarak ayrılması esasına dayanır. Gaz kromatografi tekniğinde, numune buharlaştırılır ve kromatografi kolonunun girişine enjekte edilir. İnert bir gaz olan hareketli fazın akışıyla elüsyon gerçekleştirilir. Diğer çoğu kromatografi türlerindeki aksine, hareketli faz analit molekülleriyle etkileşime girmez; tek işlevi, analiti kolon içinde taşımaktır. İki tür gaz kromatografi vardır: *gaz-katı kromatografi* (GSC) ve *gaz-sıvı kromatografi* (GLC). Gaz-sıvı kromatografi yaygın olarak uygulanır ve genellikle gaz kromatografi olarak kısaltılır.

Gaz-sıvı kromatografisinde ayrılma, hareketli faz olan gaz ile inert katı yüzeyine tutulmuş sıvı faz arasındaki bileşiklerin göç etme hızlarının farklı olması prensibine dayanılarak yapılır.

Numunenin enjeksiyonu ile pikin detektöre ulaşması arasında geçen süreye *tutulma süresi* (t_R) denir.

$$t_R = \frac{L \text{ (Kolon Boyu)}}{V_h \text{ (Hareketli Faz Hızı)}}$$

Kolondaki bir çözünen tür için tutulma süresi, dağılma oranına bağlı olup, bu değer ise durgun fazın kimyasal nitelikleriyle ilişkilidir. Gaz-sıvı kromatografide yararlı olabilmesi için, sabit fazdaki tutulmuş sıvının farklı türler için farklı dağılma oranlarına sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte bu oranlar arasındaki farklar çok da fazla olmamalıdır; çok büyük değerler, aşırı uzunlukta tutunma sürelerine, çok küçük değerler ise ayrılmayı imkansız kılacak kadar kısa tutulma sürelerine neden olur (Skoog, D.A. ve ark., 1999, Flanagan R. ve ark.2007, Hites, R.A.).



Şekil.1.5. Gaz Kromatografisinin Şematik Gösterimi.

1.6.2.2. Gaz Kromatografisi Cihazının Bölümleri

1.6.2.2.1. Taşıyıcı Gaz

Gaz kromatografisinde, mobil faz olarak taşıyıcı gaz kullanılır. Taşıyıcı gazın görevi, maddeleri sürüklemektir. Taşıyıcı gazın uygunluğunu ise ayrılacak olan bileşik ve sabit fazla reaksiyona girmemesi, gaz difüzyonunu en düşük düzeyde tutabilmesi, saf, kolay bulunabilir, ucuz olması ve detektöre uygun olması belirler.

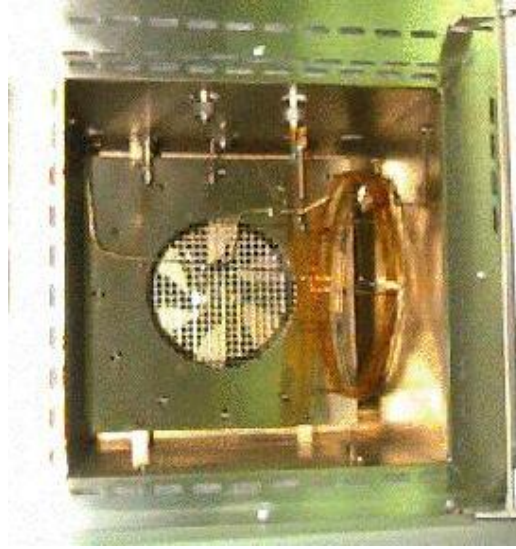
Mobil faz olarak helyum, azot ve argon gibi inert gazlar kullanılır. Yanıcı olmaması ve çok sayıda dedektörle çalışabilmesi helyumun yaygın olarak kullanılmasını sağlar (Skoog, D.A. ve ark., 1999, Flanagan R. ve ark.2007, Hites, R.A.).

1.6.2.2.2. Enjeksiyon Bölümü

Taşıyıcı gaz kaçağını, sisteme hava ve nem girişini önleyen özel bir maddeden yapılmış enjeksiyon bölgesi üzerine yerleştirilmiş septumdan mikro şırınga yardımıyla otomatik olarak numune buharlaştırma kısmına enjekte edilir (Skoog, D.A. ve ark., 1999).

1.6.2.2.3. Kolon ve Fırın

Ayırma işleminin gerçekleştiği kolon, kromatografide en önemli kısımdır. Gaz kromatografisinde, dolgulu ve kapiler kolon olmak üzere iki tür kolon kullanılır (Skoog, D.A. ve ark., 1999).



Şekil.1.6. Kolon ve Fırın.

Başlangıçta kompleks karışımları çözme amacıyla geliştirilen kapiler kolonların büyük ayırma gücü vardır. Kolonlar cam ve paslanmaz çelik kullanılarak hazırlanırken, günümüzde analitik toksikolojinin çoğu uygulamalarında kaynaşık silika kolonları kullanılmaktadır. Genel olarak ölçüleri 0.05-0.53 mm çapında ve 10-50 m uzunluğundadır (Flanagan R. ve ark., 2007).

Tekrarlanabilir çalışmalar için kolon sıcaklığı önemli bir değişken olup, sıcaklık bir derecenin onda bir düzeyinde kontrol edilebilmelidir. Bu nedenle, kolon fırın içinde tutulur (Skoog, D.A. ve ark., 1999).

1.6.2.2.4. Dedektör

Gaz kromatografisinde farklı dedektörler kullanılabilir. Başlıca dedektörler şunlardır:

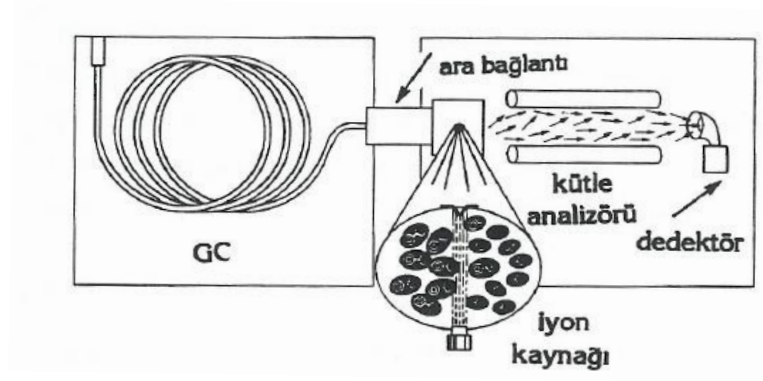
- Termal iletkenlik dedektörü (Thermal conductivity detector TCD)
- Elektron yakalama dedektörü (Electron capture dedector ECD)
- Alev iyonlaştırma dedektörü (Flame ionization detector FID)
- Kütle seçici detektör (Mass selective detector MSD)

1.6.2.3.Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi (MS), iyonize atom veya molekül türlerinin kütle/yük (m/z) oranına göre buhar fazında ayrılmasıyla ilişkilidir. MS diğer tekniklere göre daha az numune kullanarak bir analit hakkında daha fazla bilgi verebilir (Flanagan R. ve ark., 2007).

Bir kütle spektrometresi aranan maddenin iyonlarını üreterek, onları kütle/yük (m/z) oranına göre ayırır ve mevcut her iyon türlerinin bağıl bolluğunu kaydeder (<http://www.forumsci.co.il/HPLC/usp-ms-2spaltet.pdf>).

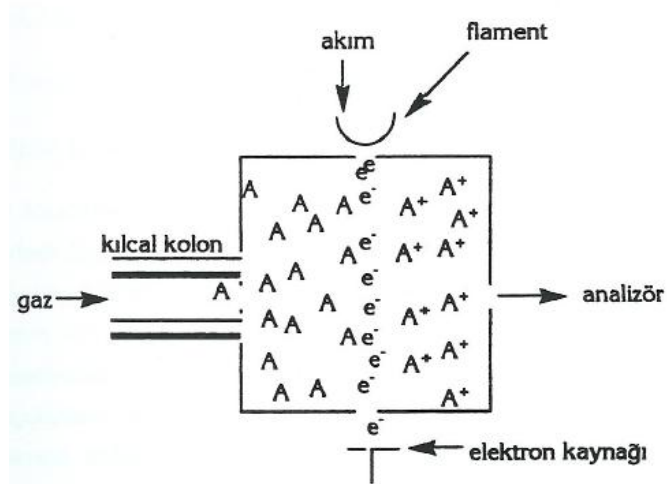
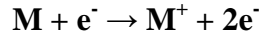
Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri; bir giriş aygıtı, iyon kaynağı, kütle analizörü ve detektördür.



Şekil.1.7. Kuadropol GC-MS Sisteminin Şematik Gösterilişi.

1.6.2.3.1. İyon Kaynağı

İyon kaynağı, son derece düşük basınç altında tutulur ve numuneye uygulanan basınç altında buhar haline geldiği sıcaklığa kadar ısıtılır. Renyum veya tungstenden yapılmış bir filament elektronları yayana kadar ısıtılır. Bu elektronların enerjisi bir molekülün bağlarını kırmak için gerekli olandan daha fazladır. Parçalanmış iyonlar iyon kaynağı dışında elektrik alan tarafından hızlandırılmışlardır (Flanagan R. ve ark., 2007).



Şekil.1.6. İyon Kaynağı.

1.6.2.3.2. Kütle Analizör

Numunelerin iyonlaşmasından sonra kütle analizörü iyonları m/z değerine göre ayırır. En çok kullanılan kütle spektrometresi kuadropol (QP) türüdür. Bir kuadropol kütle analizörü paralel olarak dizilmiş yaklaşık 20 cm uzunluğunda dört çubuk içermektedir (Flanagan R. ve ark.2007).

1.6.2.3.3. Dedektör

Kuadropol kütle filtresiyle ayrılmış iyonlar, iyonları elektronlara (elektrik akımına) dönüştüren detektör tarafından yakalanır. Daha sonra akım yükseltici devre ile işlenir. Sinyal yoğunluğunu artırmak için, iyonların sıkıştırılmasıyla yüzeyden yayılan elektronların sayısını artırmaya yarayan elektron çoğaltıcı en popüler olanıdır.



Şekil.1.8. QP tipi Kütle Spektrometresi.

GC/MS analizlerinde SCAN ya da SIM modlar kullanılabilir. Seçim analizin amacına bağlıdır. Kütle spektrumunu kullanarak numune bileşenlerini tanımlamak önemli ise SCAN mod gereklidir. SIM mod ise kütle spektrumları bilinen eser bileşenlerinin kantitatif analizi için uygundur. SIM modda kütle spektrometresi

sadece belirtilen kütleyi ölçmek için ayarlanır
(<http://www.shimadzu.com/products/lab/ms/tutorial/oh80jt0000007cva.html>).

Çalışmamızda önemli çevre kirleticiler olan ftalatların biyolojik sıvılarda belirlenmesi amacıyla GC/MS cihazında yöntem kurularak, idrar örneklerinde yöntemin validasyonu, standardizasyonu, verimi ve işlerliğinin kontrol edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Prensip

Ftalatların idrarda belirlenmesi amacıyla önce standartlarla yöntem kurulup yöntemin validasyonu yapılmıştır. Daha sonra biyolojik örneklerden izolasyon için katı faz ekstraksiyon sistemleri kurularak verimlilik araştırılarak, en son aşamada ise biyolojik örneklerden izolasyon ve verim çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yöntemlerin kurulmasında daha önce yayınlanmış olan çalışmalardan yararlanılmıştır (Teirlynck ve Rosseel 1985; Sjöberg ve Bondesson 1985; Dirven ve ark. 1993; Blount ve ark. 2000; Kambia ve ark. 2001; Wahl ve ark. 2001; Niino ve ark. 2002; Silva ve ark. 2004c; Silva ve ark. 2005; Sircar ve ark. 2008).

Yapılan çalışmalarla, metodun tekrarlanabilirliği (repeatability), doğrusallığı (linearity), geri kazanımı (recovery), tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) belirlenmiştir.

GC/MS yönteminin kurulması amacıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

- 1) Doğrusallık: Metodun doğruluğunu sağlamak amacı ile standartlarla çalışılarak kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler standardize edilmiştir. Bilinen konsantrasyonlarda hazırlanan stok çözeltiler üçer defa enjekte edilerek, her bir ftalat DEHP, DBP, BBzP için 5 noktalı grafikler hazırlanarak bu grafiklerin RRF (relative response factor) ve R^2 değerleri değerlendirilerek doğrusallık belirlenen konsantrasyon aralığında sağlamıştır. Tüm stok çözeltilere ve numunelere iç standart olarak "Benzil Benzoat" eklenmiştir.
- 2) Tekrarlanabilirlik: Bu amaçla; ftalatların düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarındaki değerleri alınarak hazırlanan çözeltiler, her bir konsantrasyon 5 defa analiz edilmek suretiyle, tekrarlanabilirlikleri %

değişim katsayısı (% CV), standart sapmaları (SS) ve rölatif standard sapmaları (RSS) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

- 3) Verim (Geri Kazanılabilirlik) Hesapları: Matriks etkisini görebilmek amacıyla maruziyetin olmadığı tesbit edilmiş idrar örneği içerisine ml konsantrasyonunda ftalatlar katılarak elde edilen çözeltiler sisteme verilerek ve geri kazanılabilirlik (%) ortalamaları ve aralıkları belirlenmiştir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetik Asit (MERCH)
- Asetonitril (MERCH)
- Benzil Benzoat (SİGMA)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (MERCH)
- Hekzan (MERCH)
- Metanol (MERCH)
- Sodyum Asetat (MERCH)
- BBzP Standartı (EHRENSTROFER)
- DBP Standartı (EHRENSTROFER)
- DEHP Standartı (EHRENSTROFER)

2.3. Kullanılan Aletler ve Alet Şartları

Gereçler ve Sarf Malzemeler

- Gaz Kromatografisi(Agilent 6890 N GC system)
- Kütle Spektroskopisi(Mass Selective Detector G2577A)
- DB-5MS (30m*0,25mm*0,25µm) Kolon
- Vorteks (NÜVE NM 110)
- Santrifüj (HERAUS SEPATECH LABOFUGE 200)
- SPE Düzeneği (Varian)

- SPE Kartuşları (Waters 3 cc Sep-pak Cartridges)
- Mikro Pipet (Rainin)
- Cam malzemeler (Schott)
- Azot Uçurma Sistemi (TECHNE SAMPLE CONCENTRATOR DB- 3 Dri-Block)
- Saf Su Cihazı (NÜVE NS 245)
- Ultra Saf Su Cihazı (HUMAN UP 900 SCHOLAR – UV)
- pH metre (Mettler)

2.4. Çözeltiler

2.4.1. Stok ve Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

DBP (47.6 µl), BBzP (45.5 µl) ve DEHP (51 µl)'den yoğunluklarına göre belli miktarlarda alınıp 10 ml'ye tamamlandıktan sonra elde edilen 5 mg/ml'lik ana stok çözeltilerinden seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlandı.

2.4.2. Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (pH=6) Hazırlanması: 27.216 g sodyum asetat balon jodede distile suda çözülerek 2 l'ye tamamlandı.

0,1 M Fosfat Tamponu (pH=6) Hazırlanması: 6.8045 g KH₂PO₄ balon jodede distile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı.

1M Asetik Asit Hazırlanması: 28.59 ml asetik asit çekilerek 500 ml'ye tamamlandı.

2.5. Numunelerin Ekstraksiyonu

İdrar numunelerinin ekstraksiyonu Söylemezoğlu ve Çeçen tarafından uygulanan metot modifiye edilerek yapılmıştır (Söylemezoğlu ve Çeçen, 2003).

İlgili katı faz uygulaması için idrar numuneleri şu işlemlere tabi tutulmuştur:

- Kartuşun şartlanması için 2 ml MeOH ve 2 ml 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH=6) kullanıldı.
- Numuneler kartuşa uygulandı.
- Kartuş yıkanırken önce (80:20) oranında hazırlanmış 0,1 M fosfat tamponu (pH=6) ve MeOH'den 1 ml, ardından 1M asetik asitten 1 ml uygulandı.
- Kartuştan 4 ml asetonytril geçirilerek flatların toplanması sağlandı.
- Azot uçurma işlemi gerçekleştirildikten sonra kalan örnekler 2 ml hekzan içinde çözüp GC-MS'e verildi.

2.6. GC-MS Koşulları

GC koşulları: G6890A GC System

- Enjeksiyon hacmi:* 1 µL
- İnlet mode:* Splitless
- Taşıyıcı gaz ve akış hızı:* Helyum – 1.2 mL/dk
- Kolon:* DB-5MS (30m*0,25mm*0,25µm)
- Fırın Programı:*

Tablo.2.1. GC Fırın Program.

Fırın Basamakları	°C/dak	°C	Tutma Süresi (dak)	Çalışma Süresi (dak)
Başlangıç		80	1.00	1.00
Basamak 1	50	200	0.00	3.40
Basamak 2	15	325	2.00	13.73

MS koşulları: Mass Selective Detector G2577A

SIM mod

MS Kuad. Sıcaklığı : 150

MS Kaynak Sıcaklığı : 230

Tablo.2.2. Ftalatlara ait başlangıç zaman ve iyonları.

	Başlangıç Zamanı	İyonlar (m/z)
DBP	5	29, 41, 149, 150
BBzP	7	91, 149, 206
DEHP	8	57, 149, 167

2.7. Validasyon

Validasyon, bir cihazın, metodun veya sistemin performansının belirlenen koşullara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerdir.

2.7.1. Metot Validasyonu

Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve güvenilir (tekrarlanabilir) olması gerekmektedir.

Yapılan ölçümün belirlenen amaca uygun doğrulukta sonuç vermesi önemli bir ihtiyaçtır. Bu ise analitik ölçüm yapan laboratuvarın belli koşulları yerine getirmesi ile mümkündür. Bu doğrultuda metot validasyonu, metodun belirlenen amaca uygun olduğunu gösteren çalışma sonuçlarıdır.

2.7.2. Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Validasyonu yapılacak metot performans parametreleri metodun uygulama amacına ve kapsamına bağılı olarak belirlenir. Örneğin safsızlık analizi yapılacak bir metotta lineer ölçüm aralığının belirlenmesine gerek yoktur.

Metot validasyonuna başlamadan önce kullanılacak cihazın performansının standartla test edilmesi ve uygunluğunun saptanması gerekir.

Metot performansı ile ilgili hiçbir bilgi yoksa ön testler yapılarak metodun uygulama amacına uygunluğu kontrol edilir. İlk test sonuçlarına göre metot performans kriterleri belirlenir.

Validasyon deneyleri için belli bir sıralama yoktur. Metoda ve validasyon parametrelerine bağılı olarak belirlenebilir. Kromatografi metodu için su sıra kullanılabilir; standart örnekle seçicilik, pik alanı ve çıkış zamanı (RT) kesinliği, lineer ölçüm aralığı, LOQ, LOD, gerçek örnekle seçicilik, gerçeklik/doğruluk (farklı derişimlerde), metot sağlamlığı.

3. BULGULAR

3.1. Kalibrasyon Grafikleri

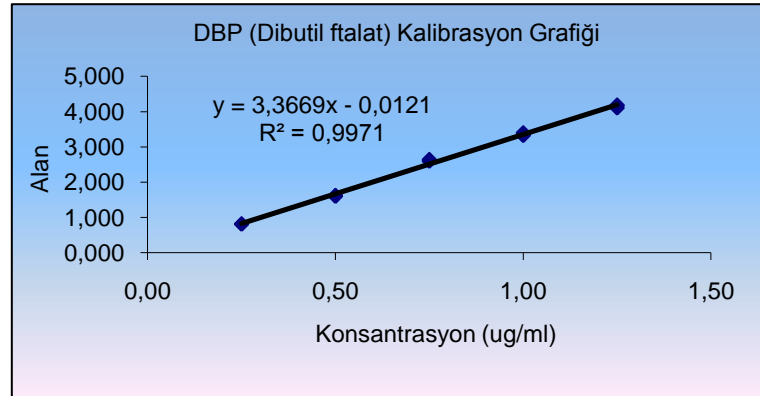
Stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanan konsantrasyonları bilinen ftalat çözeltilerinin alan değerlerinin ISTD alan değerlerine oranı kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerin R^2 değerleri hesaplanmıştır.

Tablo.3.1. ISTD alan ve konsantrasyon değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)
a1	0,25	4.655.205
a2	0,25	4.578.798
a3	0,25	4.556.657
b1	0,50	4.675.285
b2	0,50	4.588.731
b3	0,50	4.587.157
c1	0,75	4.796.974
c2	0,75	4.862.417
c3	0,75	4.910.880
d1	1,00	5.121.843
d2	1,00	5.163.058
d3	1,00	5.107.455
e1	1,25	5.041.371
e2	1,25	5.098.408
e3	1,25	5.095.116

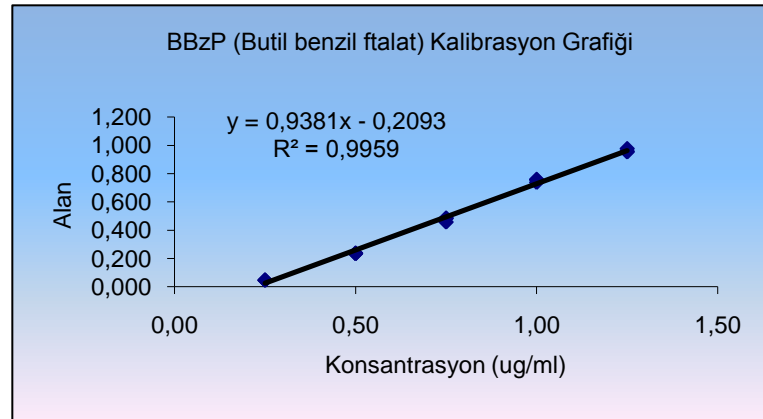
Tablo.3.2. DBP alan ve ISTD'ye oranlanmış değerleri.

	DBP (alan)	DBP/ISTD
a1	3.812.841	0,819
a2	3.717.704	0,812
a3	3.728.598	0,818
b1	7.471.215	1,598
b2	7.430.908	1,619
b3	7.470.785	1,629
c1	12.446.085	2,595
c2	12.880.673	2,649
c3	12.890.231	2,625
d1	17.036.721	3,326
d2	17.230.417	3,337
d3	17.395.447	3,406
e1	21.137.919	4,193
e2	20.928.984	4,105
e3	21.223.314	4,165

**Şekil.3.1.** DBP kalibrasyon grafiği.

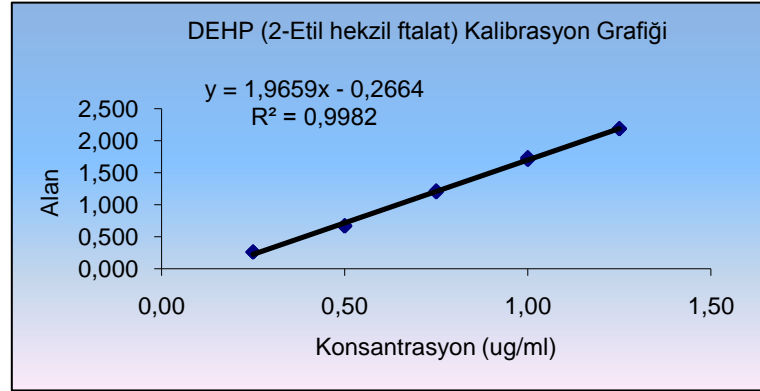
Tablo.3.3. BBzP alan ve ISTD'ye oranlanmış değerleri.

	BBzP (alan)	BBzP/ISTD
a1	214.213	0,046
a2	214.213	0,047
a3	218.701	0,048
b1	1.096.868	0,235
b2	1.077.945	0,235
b3	1.094.548	0,239
c1	2.194.474	0,457
c2	2.350.372	0,483
c3	2.384.333	0,486
d1	3.870.773	0,756
d2	3.808.133	0,738
d3	3.878.392	0,759
e1	4.827.653	0,958
e2	4.856.937	0,953
e3	4.974.368	0,976

**Şekil.3.2.** BBzP kalibrasyon grafiği.

Tablo 3.4. DEHP alan ve ISTD'ye oranlanmış değerleri.

	DEHP (alan)	DEHP/ISTD
a1	1.192.596	0,256
a2	1.188.679	0,260
a3	1.173.219	0,257
b1	3.094.543	0,662
b2	3.054.515	0,666
b3	3.084.335	0,672
c1	5.739.316	1,196
c2	5.906.875	1,215
c3	5.937.239	1,209
d1	8.830.332	1,724
d2	8.792.935	1,703
d3	8.873.354	1,737
e1	11.050.331	2,192
e2	11.140.206	2,185
e3	11.138.977	2,186

**Şekil.3.3.** DEHP kalibrasyon grafiği.**Tablo3.5.** DBP, BBzP ve DEHP kalibrasyon grafiklerinin r^2 değerleri.

	DBP	BBzP	DEHP
r^2	0,9971	0,9959	0,9982

3.2. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik için ftalatların düşük, orta ve yüksek konsantrasyon (0.25 ppm, 0.75 ppm, 1.25 ppm) değerleri alınarak hazırlanan çözeltiler 5 defa analiz edilerek değişim katsayısı (CV), standart sapma (SS) ve rölatif standart sapma (RSS) değerleri aşığıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

n: değerlerin sayısı

x_i : hesaplanan değerler

\bar{x} : hesaplanan değerlerin ortalaması

$$\text{CV} = \text{SS} / \text{Ortalama}$$

$$\text{RSS} = (\text{Ortalama} / \text{Standart Sapma}) \times 100$$

Tablo.3.6. DBP'in SS ve RSS değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DBP (alan)	DBP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	3.812.789	0,819
a2	0,25	4.578.798	3.717.760	0,812
a3	0,25	4.557.641	3.729.217	0,818
a4	0,25	4.557.641	3.812.777	0,837
a5	0,25	4.577.689	3.717.455	0,812
SONUÇ			ORTALAMA	0,820
			SS	0,010
			CV	0,012
			RSS	1,228
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DBP (alan)	DBP/ISTD
c1	0,75	4.799.865	12.446.177	2,593
c2	0,75	4.862.529	12.880.752	2,649
c3	0,75	4.911.074	12.890.371	2,625
c4	0,75	4.795.094	12.446.176	2,596
c5	0,75	4.862.523	12.880.564	2,649
SONUÇ			ORTALAMA	2,622
			SS	0,027
			CV	0,010
			RSS	1,044
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DBP (alan)	DBP/IS
e1	1,25	5.041.465	21.137.827	4,193
e2	1,25	5.098.818	20.928.877	4,105
e3	1,25	5.095.116	21.223.434	4,165
e4	1,25	5.041.461	21.137.784	4,193
e5	1,25	5.098.517	20.928.889	4,105
SONUÇ			ORTALAMA	4,152
			SS	0,045
			CV	0,011
			RSS	1,075

Tablo.3.7. BBzP'in SS ve RSS değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	BBzP (alan)	BBzP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	214.125	0,046
a2	0,25	4.578.798	214.318	0,047
a3	0,25	4.557.641	218.893	0,048
a4	0,25	4.557.641	214.382	0,047
a5	0,25	4.577.689	214.424	0,047
SONUÇ			ORTALAMA	0,047
			SS	0,001
			CV	0,015
			RSS	1,547
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	BBzP (alan)	BBzP/ISTD
c1	0,75	4.799.865	2.194.514	0,457
c2	0,75	4.862.529	2.350.492	0,483
c3	0,75	4.911.074	2.385.333	0,486
c4	0,75	4.795.094	2.194.624	0,458
c5	0,75	4.862.523	2.350.512	0,483
SONUÇ			ORTALAMA	0,473
			SS	0,015
			CV	0,031
			RSS	3,098
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	BBzP (alan)	BBzP/ISTD
e1	1,25	5.041.465	4.827.653	0,958
e2	1,25	5.098.818	4.856.937	0,953
e3	1,25	5.095.116	4.974.368	0,976
e4	1,25	5.041.461	4.827.723	0,958
e5	1,25	5.098.517	4.857.012	0,953
SONUÇ			ORTALAMA	0,959
			SS	0,010
			CV	0,010
			RSS	1,022

Tablo.3.8. DEHP'in SS ve RSS değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DEHP (alan)	DEHP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	1.192.460	0,256
a2	0,25	4.578.798	1.188.729	0,260
a3	0,25	4.557.641	1.173.301	0,257
a4	0,25	4.557.641	1.192.596	0,262
a5	0,25	4.577.689	1.188.679	0,260
SONUÇ			ORTALAMA	0,259
			SS	0,002
			CV	0,008
			RSS	0,829
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DEHP (alan)	DEHP/ISTD
c1	0,75	4.799.865	5.739.256	1,196
c2	0,75	4.862.529	5.906.987	1,215
c3	0,75	4.911.074	5.937.239	1,209
c4	0,75	4.795.094	5.739.316	1,197
c5	0,75	4.862.523	5.906.875	1,215
SONUÇ			ORTALAMA	1,206
			SS	0,009
			CV	0,008
			RSS	0,777
	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DEHP (alan)	DEHP/ISTD
e1	1,25	5.041.465	11.050.425	2,192
e2	1,25	5.098.818	11.140.354	2,185
e3	1,25	5.095.116	11.138.977	2,186
e4	1,25	5.041.461	11.050.331	2,192
e5	1,25	5.098.517	11.140.206	2,185
SONUÇ			ORTALAMA	2,188
			SS	0,004
			CV	0,002
			RSS	0,165

3.3. Dedeksiyon ve Ölçüm Limitleri (LOD ve LOQ)

Dedeksiyon ve ölçüm limitlerini hesaplariken şu formüller kullanılmıştır:

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\text{Standart Sapma} / \text{Eğim})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{Standart Sapma} / \text{Eğim})$$

Tablo.3.9. DBP'a ait LOD ve LOQ değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DBP (alan)	DBP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	3.812.789	0,819
a2	0,25	4.578.798	3.717.760	0,812
a3	0,25	4.557.641	3.729.217	0,818
a4	0,25	4.557.641	3.812.777	0,837
a5	0,25	4.577.689	3.717.455	0,812
SONUÇ			ORTALAMA	0,820
			SS	0,010
			EĞİM	3,367
			LOD (ppm)	0,010
			LOQ (ppm)	0,030

Tablo.3.10. BBzP'a ait LOD ve LOQ değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	BBzP (alan)	BBzP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	214.225	0,046
a2	0,25	4.578.798	219.318	0,048
a3	0,25	4.557.641	218.893	0,048
a4	0,25	4.557.641	214.382	0,047
a5	0,25	4.577.689	212.824	0,046
SONUÇ			ORTALAMA	0,047
			SS	0,001
			EĞİM	0,938
			LOD (ppm)	0,003
			LOQ (ppm)	0,009

Tablo.3.11. DEHP'a ait LOD ve LOQ değerleri.

	STD Kons (ppm)	ISTD (alan)	DEHP (alan)	DEHP/ISTD
a1	0,25	4.655.205	1.192.460	0,256
a2	0,25	4.578.798	1.188.729	0,260
a3	0,25	4.557.641	1.173.301	0,257
a4	0,25	4.557.641	1.192.596	0,262
a5	0,25	4.577.689	1.188.679	0,260
SONUÇ			ORTALAMA	0,259
			SS	0,002
			EĞİM	1,966
			LOD (ppm)	0,004
			LOQ (ppm)	0,011

3.4. Geri Kazanım (Recovery)

Geri kazanım hesabı yapılırken; ftalat standartları eklenen idrar numunelerinden elde edilen sonuçların yine ftalat standartları eklenmiş olan çözeltilerden elde edilen sonuçlara oranı kullanılır. Bu oranın 100 ile çarpımıyla % geri kazanım (verim) değerleri elde edilir.

Tablo.3.12. DBP'ye ait geri kazanım değerleri.

	ISTD	Konsantrasyon (ppm)	DBP	DBP/ISTD
Çözeltiler içerisinde standart numunedan elde edilen sonuçlar (Beklenen)				
c-s1	4.796.974	0,75	12.446.085	2,595
c-s2	4.862.417	0,75	12.880.673	2,649
c-s3	4.910.880	0,75	12.890.231	2,625
c-s4	4.796.974	0,75	12.446.085	2,595
c-s5	4.862.417	0,75	12.880.673	2,649
İdrar numunesine eklenmiş olan standartlardan elde edilen sonuçlar (Gözlenen)				
	ISTD		DBP	DBP/ISTD
c-n1	4.795.956	0,75	12.444.324	2,595
c-n2	4.854.514	0,75	12.879.345	2,653
c-n3	4.909.720	0,75	12.888.422	2,625
c-n4	4.795.523	0,75	12.444.451	2,595
c-n5	4.861.522	0,75	12.878.234	2,649

Tablo.3.13. BBzP'ye ait geri kazanım değerleri.

	ISTD	Konsantrasyon (ppm)	BBzP	BBzP/ISTD
Çözelti içerisinde standart numuneden elde edilen sonuçlar (Beklenen)				
c-s1	4.796.974	0,75	2.194.474	0,457
c-s2	4.862.417	0,75	2.350.372	0,483
c-s3	4.910.880	0,75	2.384.333	0,486
c-s4	4.796.974	0,75	2.194.474	0,457
c-s5	4.862.417	0,75	2.350.372	0,483
İdrar numunesine eklenmiş olan standartlardan elde edilen sonuçlar (Gözlenen)				
	ISTD		BBzP	BBzP/ISTD
c-n1	4.795.956	0,75	2.314.124	0,483
c-n2	4.854.514	0,75	2.338.214	0,482
c-n3	4.909.720	0,75	2.336.975	0,476
c-n4	4.795.523	0,75	2.336.357	0,487
c-n5	4.861.522	0,75	2.338.981	0,481

Tablo.3.14. DEHP'ye ait geri kazanım değerleri.

	ISTD	Konsantrasyon (ppm)	DEHP	DEHP/ISTD
Çözelti içerisinde standart numuneden elde edilen sonuçlar (Beklenen)				
c-s1	4.796.974	0,75	5.739.316	1,196
c-s2	4.862.417	0,75	5.906.875	1,215
c-s3	4.910.880	0,75	5.937.239	1,209
c-s4	4.796.974	0,75	5.739.316	1,196
c-s5	4.862.417	0,75	5.906.875	1,215
İdrar numunesine eklenmiş olan standartlardan elde edilen sonuçlar (Gözlenen)				
	ISTD		DEHP	DEHP/ISTD
c-n1	4.795.956	0,75	5.737.280	1,196
c-n2	4.854.514	0,75	5.904.148	1,216
c-n3	4.909.720	0,75	5.936.480	1,209
c-n4	4.795.523	0,75	5.737.139	1,196
c-n5	4.861.522	0,75	5.904.912	1,215

Tablo.3.15. % Geri kazanım değerleri.

DBP	BBzP	DEHP
100,01	105,47	99,99
100,15	99,64	100,12
100,01	98,04	100,01
100,02	106,50	99,99
100,00	99,53	99,99

3.5. İdrar Numuneleri Sonuçları ve İstatistiksel Verileri

İdrar numuneleri önceden alınıp -20°C’de muhafaza edilmiş olup ftalatların belirlenmesi için kullanıldı. Numunelerdeki ftalat değerleri Tablo.3.15 ppb cinsinden verilmiştir.

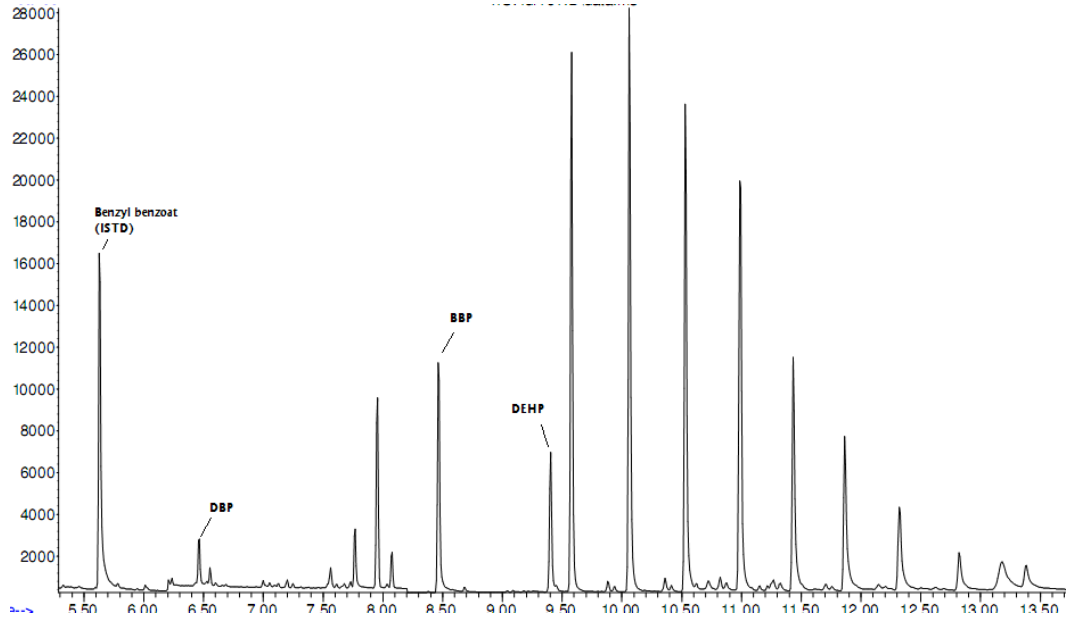
Tablo.3.16. İdrar numunelerindeki ftalatların değerleri (ppb).

İdrar Numuneleri - Sonuç			
	DBP (ppb)	BBzP (ppb)	DEHP (ppb)
1	29,2	555,1	210,7
2	40,1	674,4	212,8
3	-	-	-
4	17,4	611,3	196,0
5	15,8	662,7	185,6
6	16,0	-	190,0
7	84,5	169,7	187,1
8	61,7	354,2	189,2
9	-	-	-
10	24,9	-	196,8
11	70,0	-	235,0
12	19,5	-	178,4
13	95,4	110,4	211,0
14	23,7	142,7	208,8
15	20,8	415,8	189,0
16	-	-	-
17	-	-	-
18	31,9	-	197,1
19	-	-	-
20	-	-	-
21	25,7	155,4	310,8

Tablo.3.16. (Devamı) İdrar numunelerindeki ftalatların değerleri (ppb)			
22	-	-	-
23	81,7	536,8	298,7
24	45,0	-	271,4
25	26,8	473,7	280,6
26	99,2	491,8	199,0
27	71,0	-	296,7
28	43,0	-	300,0
29	55,3	-	204,9
30	-	-	-
31	80,7	-	148,9
32	22,8	563,8	195,1
33	73,9	-	252,0
34	51,7	-	-
35	67,5	302,9	189,7
36	32,7	-	212,0
37	46,0	523,7	247,9
38	52,0	-	187,4
39	87,9	600,2	155,0
40	42,1	424,3	198,9
41	88,1	201,8	261,0
42	109,3	489,1	231,7
43	57,3	-	238,3
44	97,7	643,9	186,0
45	18,8	363,7	222,3
46	35,8	133,9	158,6
47	30,0	-	218,9
48	94,7	-	183,7
49	60,6	125,8	193,1
50	71,4	-	180,7
51	47,1	-	211,4
52	56,5	185,9	313,0
53	76,4	-	225,2
54	-	-	-
55	-	-	-
56	95,8	274,9	180,4
57	85,0	-	182,0
58	38,9	88,5	203,1
59	75,7	-	177,3
60	48,0	-	240,0
61	27,2	-	197,7
62	66,0	-	208,0
63	50,2	321,2	205,8
64	-	-	-

Tablo.3.16. (Devamı) İdrar numunelerindeki ftalatların değerleri (ppb)			
65	70,0	-	190,4
66	-	171,1	-
67	85,9	-	187,8
68	58,1	-	224,0
69	78,2	431,8	193,3
70	62,0	-	221,0
71	-	-	-
72	34,2	444,0	266,2
73	64,8	91,9	203,7
74	-	392,0	-
75	41,9	241,2	177,8
76	33,3	192,1	140,2
77	49,2	385,7	243,7
78	97,8	315,1	190,8
79	116,8	634,3	183,0
80	102,0	215,6	218,8
81	44,4	583,0	291,0
82	-	-	-
83	54,5	653,1	191,7
84	69,8	283,7	187,0
85	-	-	-
86	92,7	342,9	230,8
87	91,7	253,7	199,0
88	28,8	405,0	250,2
89	37,7	-	-
90	59,9	456,0	199,7
91	113,3	621,0	220,1
92	110,0	-	-
93	-	-	-
94	105,4	293,7	204,2
95	-	-	-
96	63,8	371,3	139,4
97	-	-	-
98	36,6	225,9	275,2
99	21,0	263,1	169,9
100	-	-	-
101	85,5	-	330,0
102	68,1	234,2	195,1
103	91,4	353,8	223,4

Ortalama	59,70	367,03	213,78
SD	27,66	173,09	40,48
RSD	0,46	0,47	0,19



Şekil.3.1. İdrar numunesinde ftalat analizine ait kromatogram.

3.5.1. İstatiksel Değerlendirme

İdrar numunelerinin ftalat analiz sonuçlarının SPSS’te istatiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Buna göre tanımlayıcı istatistikleri, normallik testi ve tanımlayıcı grafikleri (histogram, normal Q-Q plot ve box plot) oluşturulmuştur.

Tek bir değişkenin dağılımını göstermek için kullanılan histogramda çubukların genişliği aralıkların genişliğini ve çubukların yüksekliği ise her bir aralığın sıklığını temsil eder.

Normal Q-Q grafiğinin çizilebilmesi için gözlenen değerler küçükten büyüğe doğru sıralanmakta ve beklenen normal dağılım değerleriyle karşılaştırılmaktadır. Q-Q grafiğinde, normal dağılım formu doğrusal bir çizgi şeklindedir. Grafiği çizilen değişken doğrusal çizgiyle karşılaştırılmakta ve dağılım normal ise, gözlenen değerler doğrusala yakın bir dağılım göstermektedir.

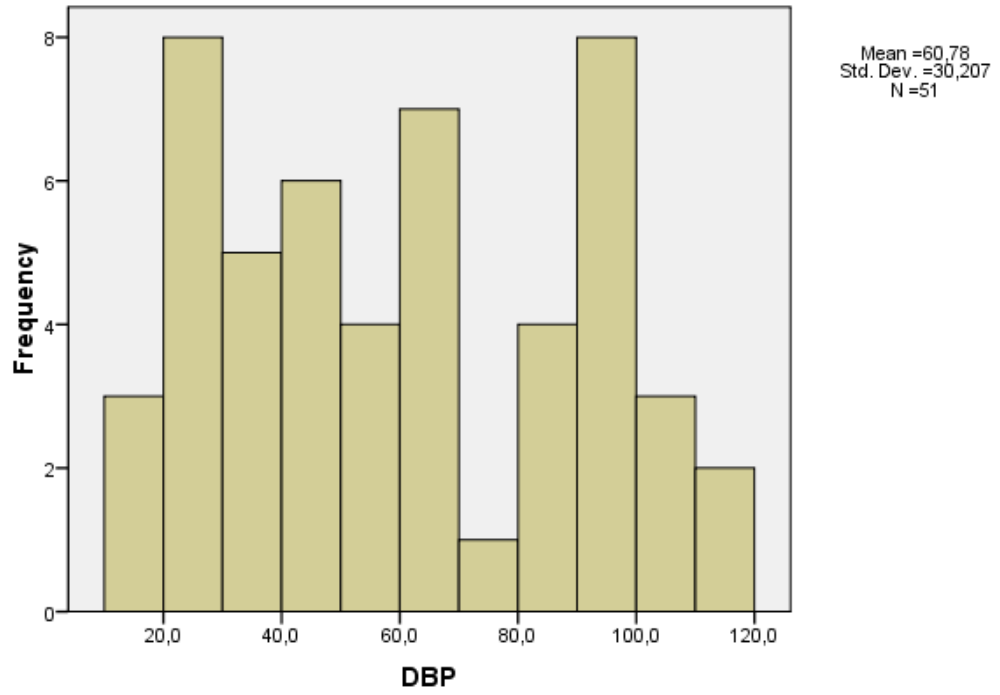
Kutu grafiğinde (box plot) kutunun üst ve alt sınırları sırasıyla Q3 (% 75’lik değer) ve Q1’i (% 25’lik değer) temsil etmektedir. Değerler, şeklin sol eksenini üzerindeki ölçeğe karşılık gelmektedir. Dolayısıyla kutunun kendisi, IQR’ı (çeyrekler arası aralık) göstermektedir. Kutunun içindeki çizgi, % 50’lik değerde çizilmiştir. Kutunun yukarısına ve aşağısına uzanan çizgiler “sınır” olarak anılır. Üst sınırın sonunda azami puan işaretlenmiştir. Asgari değer, alt sınırın sonunda bulunabilir.

Tablo.3.17. Tanımlayıcı istatistikler.

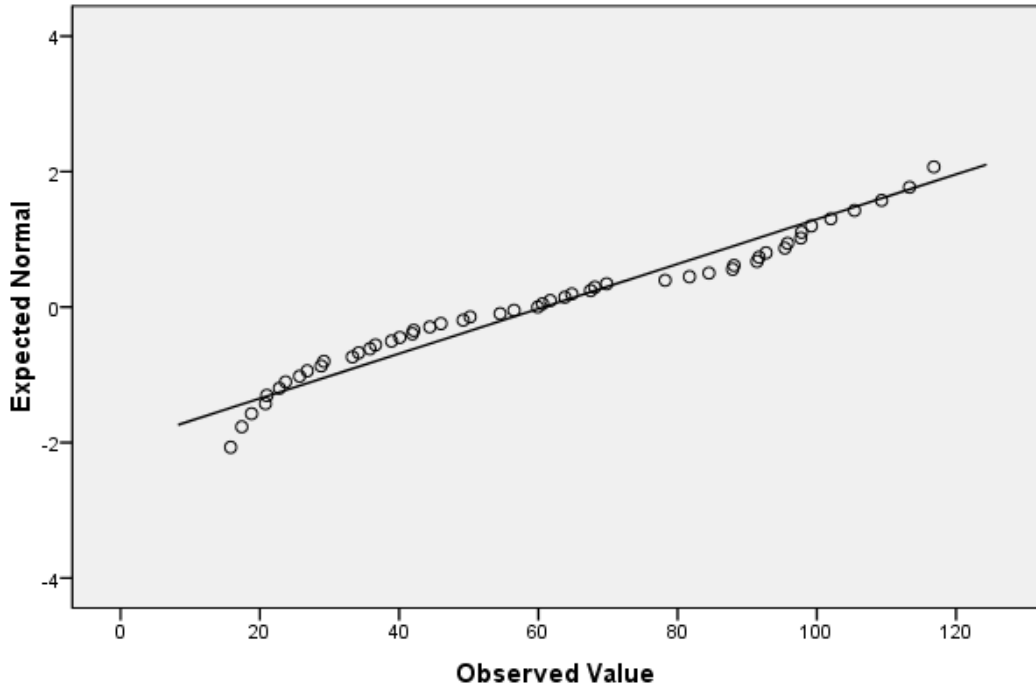
	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
DBP	83	15,8	116,8	59,701	27,6591
BBP	53	88,5	674,4	367,034	173,0873
DEHP	80	139,4	330,0	213,776	40,4753
Valid N (listwise)	51				

Tablo.3.18. Normallik testleri.

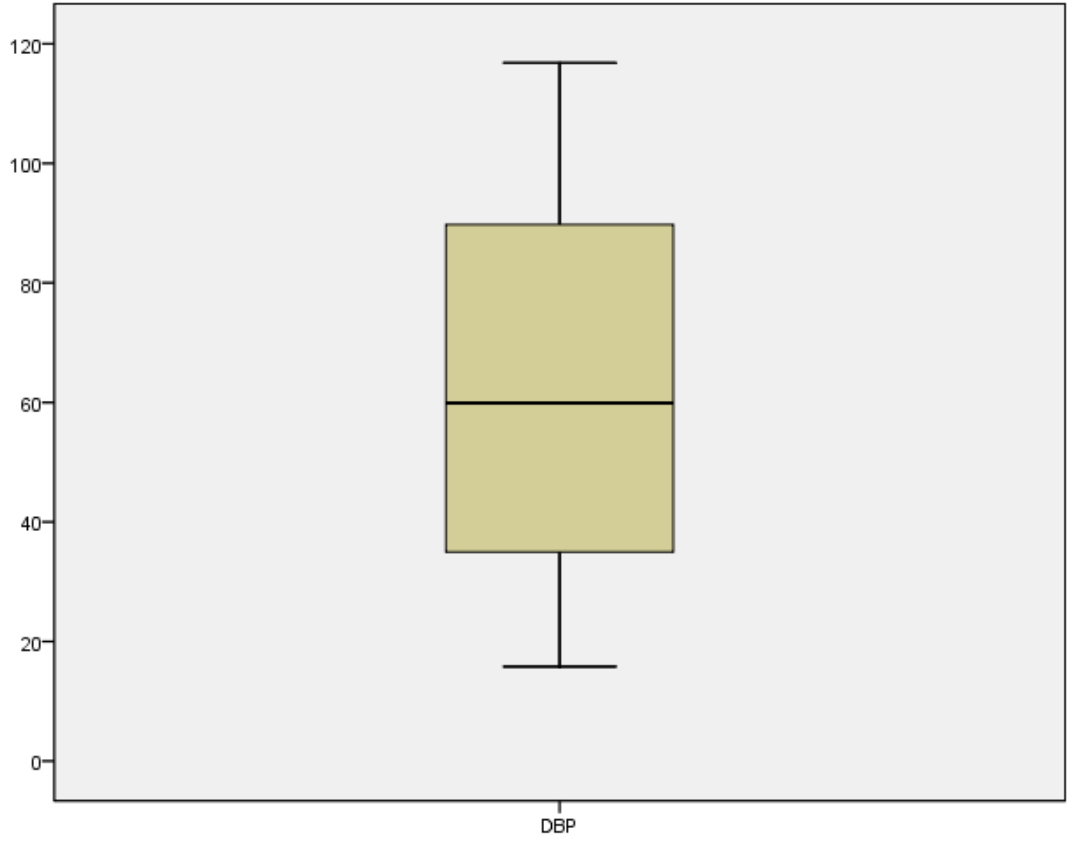
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DBP	,110	51	,178	,938	51	,011
BBP	,071	51	,200	,955	51	,050
DEHP	,159	51	,002	,919	51	,002



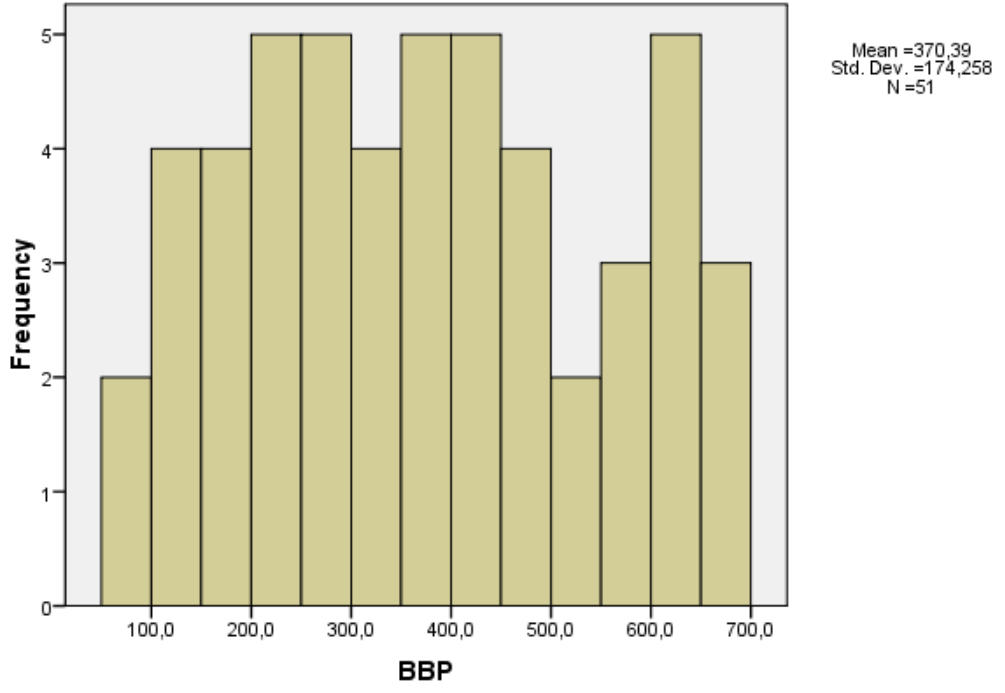
Şekil.3.2. DBP'nin histogramı.



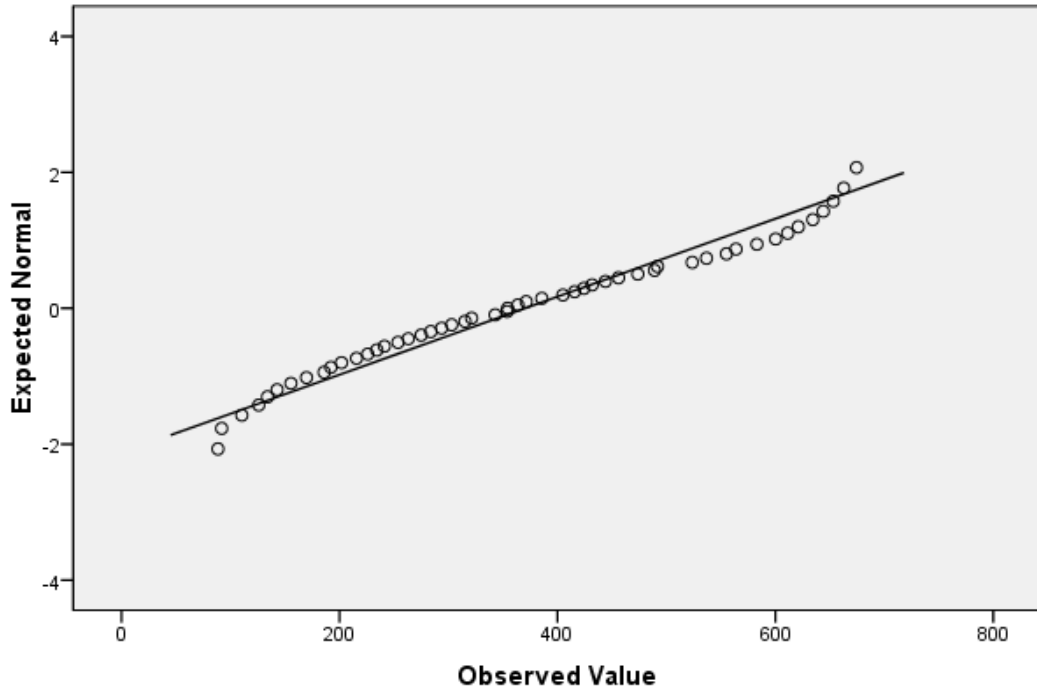
Şekil.3.3. DBP'nin normal Q-Q grafiği.



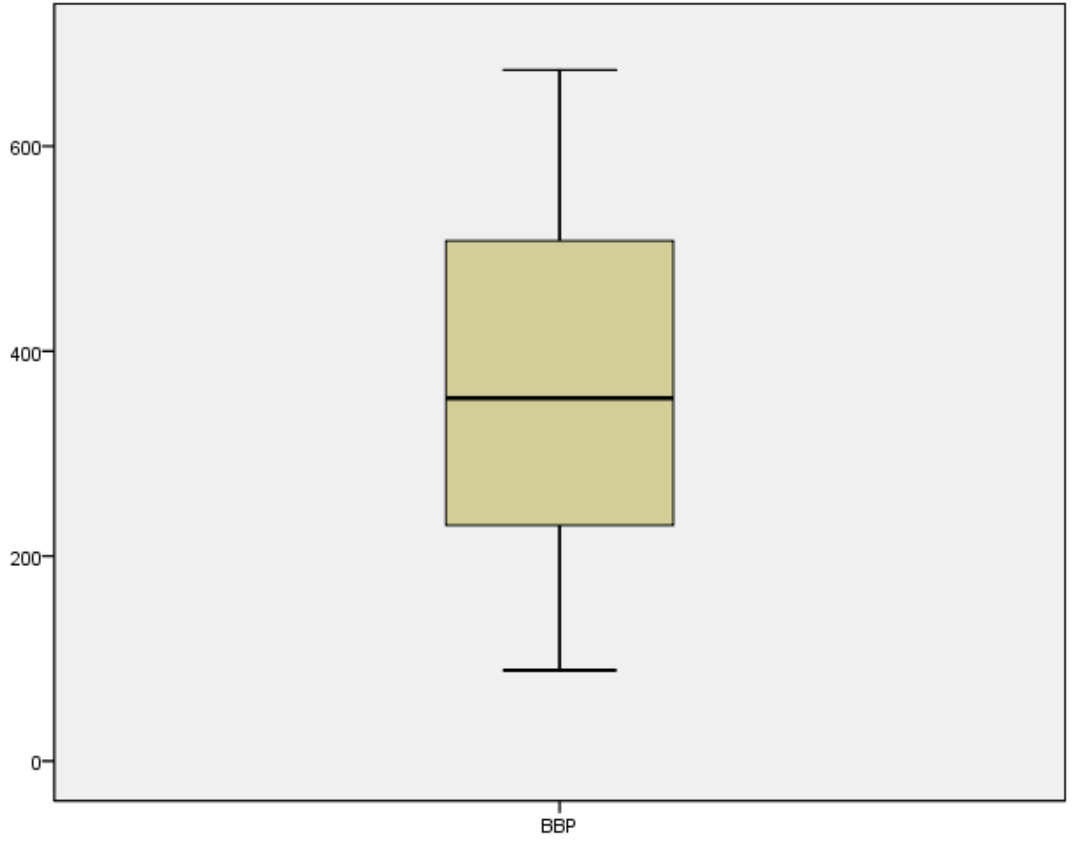
Şekil.3.4. DBP'nin kutu grafiği.



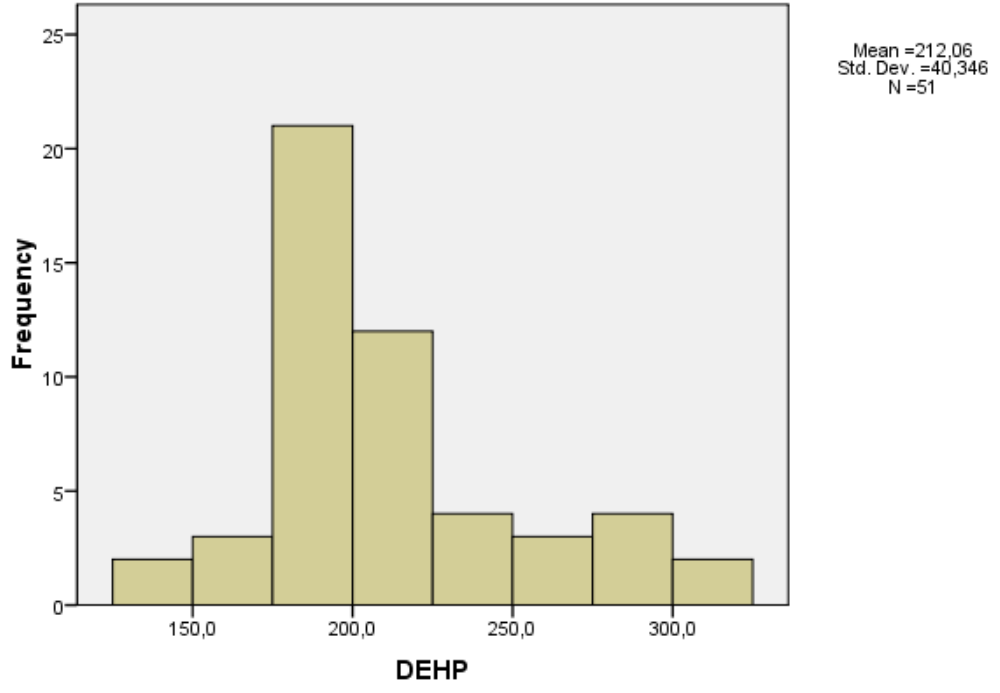
Şekil.3.5. BBZP'nin histogramı.



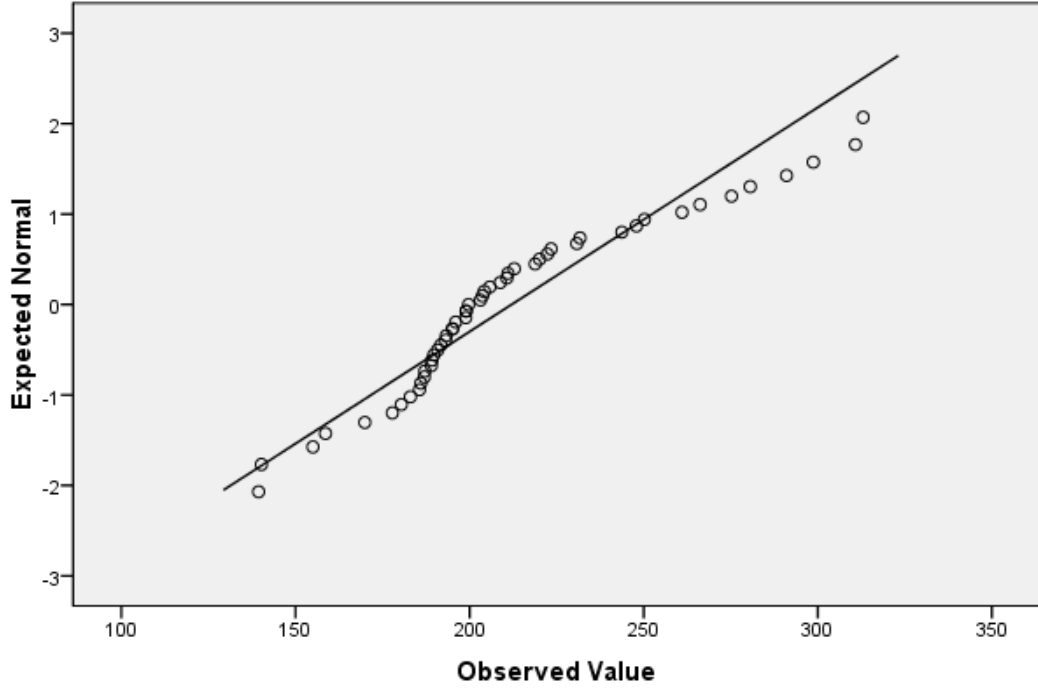
Şekil.3.6. BBZP'nin normal Q-Q grafiği.



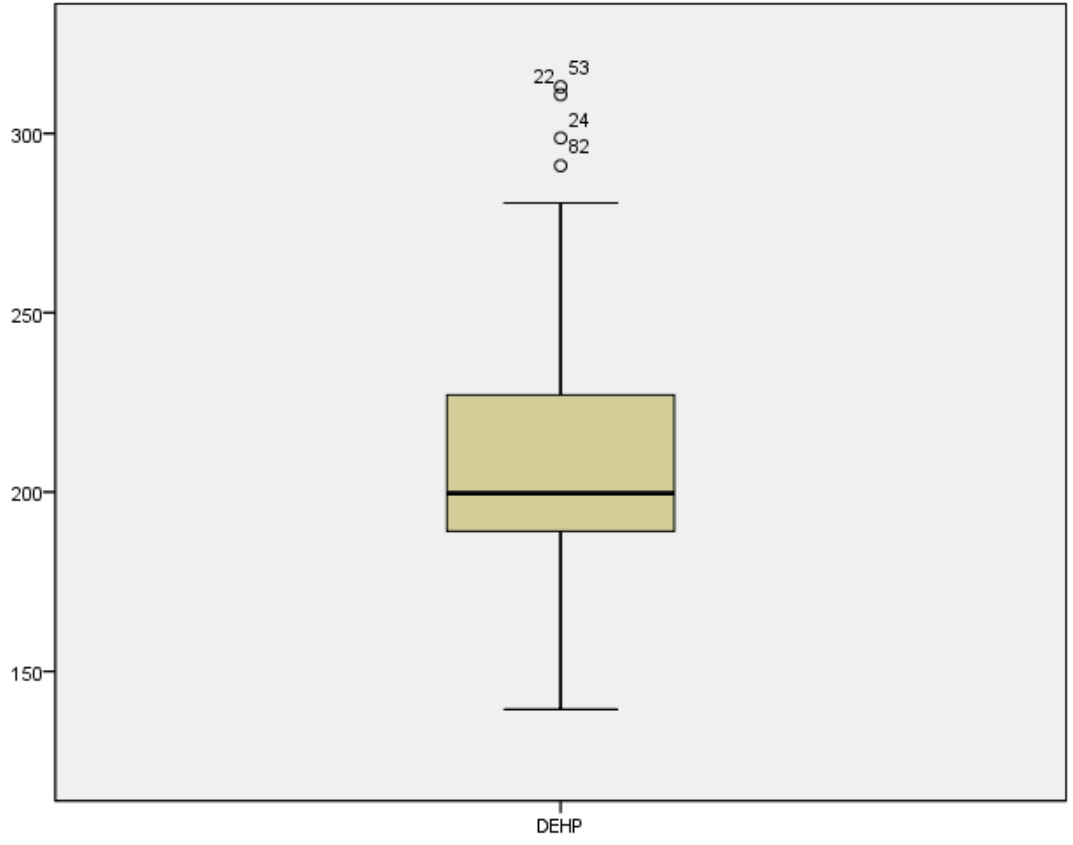
Şekil.3.7. BBZP'nin kutu grafiği.



Şekil.3.8. DEHP'nin histogramı.



Şekil.3.9. DEHP'nin normal Q-Q grafiği.



Şekil.3.10. DEHP'nin kutu grafiği.

4. TARTIŞMA

Ftalik asit esterleri olan ftalatlar, plastikleştirici ve çözücü olarak endüstriyel, tıbbi ve tüketim ürünlerinde kullanılır. Ayrıca oyuncaklar, çeşitli kişisel bakım ürünlerinde (kozmetik, deterjan, sabun gibi), böcek ilaçları ve gıda ambalajlarında da bulunmaktadır (Guoy ve ark., 2011).

Ftalatlar, üreme sağlığı ve gelişimi üzerinde etkileri gösterilmiş olan endokrin sistem bozuculardır. Kısırlık, azalmış sperm sayımı, kriptorşidizm, üreme yolu malformasyonları, hipospadias ve testis tümörleri yanı sıra testosteron düzeyleri, anogenital mesafe ve üreme organ ağırlıklarında azalma hem hayvan hem de insan çalışmaları ile tanımlanmıştır (Lopez- Carrillo ve ark., 2010).

Çalışmamızın ilk bölümünde gaz kromatografisi – kütle spektrometresi yöntemiyle idrarda ftalat tayini yöntemi validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Öncelikle kalibrasyon eğrisini çizmek amacıyla DBP, BBzP ve DEHP'nin 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.25 ppm stok çözeltileri hazırlandı. İnternal standart olarak benzil benzoat eklendi. Tüm çözeltiler üçer defa enjekte edilerek bulunan konsantrasyonlardan kalibrasyon grafikleri çizilip eğrilerin denklemleri elde edildi. Bu denklemler DBP için $y=3.3669x-0.0121$, $r^2=0.9971$; BBzP için $y=0.9381x-0.2093$, $r^2=0.9959$ ve DEHP için $y=1.9659x-0.2664$, $r^2=0.9982$ olarak hesaplandı. Bu sonuçlar bize elde ettiğimiz kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Tekrarlanabilirliğin hesaplanabilmesi için bir düşük (0.25 ppm), bir orta (0.75 ppm) ve bir de yüksek konsantrasyonda (1.25 ppm) hazırlanan çözeltiler tekrar analiz edildi. Bu amaçla 5'er defa analiz edilen çözeltilerin relatif standart sapma (RSS) değerleri hesaplandı. Buna göre çıkan sonuçlar DBP, BBzP ve DEHP için 0.165-3.098 olarak bulundu. Standart sapma dağılımdaki değerlerin ortalamaya olan

uzaklığın bir göstergesi olup, standart sapma büyüdükçe dağılım yaygınlaşır. Buna göre elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda $RSS < 5$ olması tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu göstermektedir.

Yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Bu değer kalibrasyon eğrisinin eğimiyle verilmekte olup, eğim arttıkça duyarlılıkta artacaktır. Alt tayin limitin küçük olması da duyarlılığın yüksek olduğunu gösterir. LOD ve LOQ değerleri DBP için sırasıyla 0.010 ppm ve 0.030 ppm; BBzP için 0.003 ppm ve 0.009 ppm; DEHP için 0.004 ppm ve 0.011 ppm olarak hesaplandı.

Geri kazanım için yapılan analizlerin sonucunda verim DBP, BBzP ve DEHP için sırasıyla ortalama % 100.04, % 101.84 ve % 100.02 olarak bulundu. Bu da bize yöntemin uygunluğunu göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmaları incelediğimizde Shintani (1985) HPLC kullanarak yaptığı çalışmada DEHP için lineer aralığı 5-400 $\mu\text{g/ml}$, dedeksiyon limitini ise 8.8 ng/10 μl olarak belirlemiştir. İnsan ve hayvan serumunda DEHP detekte edilmezken, plazmalarında sırayla 72.5 ve 2.2 $\mu\text{g/ml}$ değerlerini bulmuştur.

Sjoberg ve Bondesson (1985) kan plazmasında GC-MS ile yaptığı çalışmada DEHP geri kazanımını % 93 olarak hesaplamıştır. 500 ng DEHP/0.5 ml plazma için CV değerini % 3.7 ve dedeksiyon limitini de 75 ng/0.5ml plazma bulmuştur.

Teirlynck (1985) plazma ile yaptığı çalışmada kalibrasyon lineer aralığı 5-200 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0.9990$) olup, 0.8 μg DEHP/100ml plazmadan geri kazanımı ortalama % 90.6 ($RSS = \%2.2$), LOQ 5 $\mu\text{g/ml}$ ve LOD değeri ise 1.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

Penalver ve arkadaşları (2000) suda ftalat esterleri ile yaptıkları çalışmada DBP, BBzP ve DEHP için lineer aralıkları sırasıyla 0.02-10 ($r^2 = 0.9986$), 0.05-10 ($r^2=0.9965$) ve 0.02-10 $\mu\text{g/l}$ ($r^2 = 0.9990$) belirlemişler. LOD değerleri 0.007, 0.02 ve 0.006 $\mu\text{g/l}$, tekrarlanabilirlik için RSS değerleri ise % 17, % 19 ve % 7 olarak hesaplamışlardır.

Casajuana ve Lacorte (2004) sütte ftalat esterlerinin GC-MS'le belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada kullandıkları methodla 0.002-4 $\mu\text{g/ml}$ aralığında iyi lineerlik (r^2 değerleri > 0.990) elde etmişler. DBP, BBzP ve DEHP için sırayla geri kazanım değerlerini % 111, % 88, % 86 ve LOD değerlerini ise 0.09, 0.12 ve 0.06 $\mu\text{g/kg}$ olarak hesaplamışlardır. Farklı süt numuneleriyle yapılan ölçüm sonuçlarına göre DBP 7.3-50.3 $\mu\text{g/kg}$, BBzP 1.11-2.93 $\mu\text{g/kg}$, DEHP ise 15.1-27.2 $\mu\text{g/kg}$ aralıklarında bulunmuştur.

Zhu ve arkadaşlarının (2006) anne sütünde GC-MS'le ftalatların belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada dedeksiyon limitleri DBP, BBzP ve DEHP için 0.12, 1.5 ve 1.2 ng/g olarak belirlenmiş, ölçüm sonuçlarına göre anne sütünde BBzP belirlenemezken DBP ortalama 0.87 (0.62-1.2) ng/g , DEHP ise 222 (156-398) ng/g olarak bulunmuştur.

Farahani ve arkadaşlarının (2007) GC-MS ile yaptıkları metod geliştirme çalışmasında DBP, BBzP ve DEHP için 0.02-50 $\mu\text{g/l}$ ($r^2=0.9940$), 0.02-100 $\mu\text{g/l}$ ($r^2=0.9901$), 0.03-100 $\mu\text{g/l}$ ($r^2=0.9951$) lineer aralıkları belirlenmiştir. % 72.3, % 88.9 ve % 70.7 oranında geri kazanım elde edilirken LOD değerleri sırayla 0.005, 0.002 ve 0.005 $\mu\text{g/l}$ olarak bulunmuştur.

Feng ve arkadaşlarının (2005) sütte yaptıkları çalışmada metodun dedeksiyon limitleri % yağ oranı göre farklılık göstermekle birlikte % 0 yağ için LOD değerleri

DBP, BBzP ve DEHP için sırayla 0.02, 0.23 ve 0.31 ng/g olarak bulunmuştur. 0.1 µg/g süttten elde edilen geri kazanım değerleri ise % 90, % 91 ve % 95'tir. İneklerden elle ve PVC borularla toplanan süt numunelerinde ftalat değerleri karşılaştırılmış BBzP dedeksiyon limiti altında kalırken DBP için sonuçlar arasında çok fark görülmemiştir (6.38 ng/g ve 5.79 ng/g). Ancak ortalama DEHP değerleri arasında 10 kat üstünde fark bulunmuştur (16.04 ng/g ve 215.36 ng/g).

Guo ve arkadaşlarının (2010) insan serumunda ftalatları belirlemek için GC-MS kullanarak yaptıkları çalışmada DBP, BBzP ve DEHP için ekstraksiyon verimini ortalama % 102.01, % 95.98 ve % 94.84 olarak bulmuşlardır. DBP (2-1000 ng/ml), BBzP ve DEHP (10-1000 ng/ml) lineer aralıklarında r^2 değerleri sırasıyla 0.9973, 0.9904 ve 0.9912 olarak hesaplanmıştır. LOD ve LOQ DBP için 0.7 ng/ml ve 2.3 ng/ml, BBzP için 3.5 ng/ml ve 11.6 ng/ml, DEHP içinse 3.2 ng/ml ve 10.6 ng/ml bulunmuştur. İnsan serumunda DBP, BBzP ve DEHP konsantrasyonları ortalama 135.4 ng/ml (26.1-214.8), 37.6 ng/ml (15.7-54.8) ve 218 ng/ml (80.1-342.1) olarak belirlenmiştir.

Shen ve arkadaşları (2007) kozmetik ürünlerinde kullanılan ftalatların belirlenebilmesi için geliştirdikleri yöntemde DBP, BBzP ve DEHP'ye ait tekrarlanabilirlik (RSS) değerleri sırasıyla % 7.2, 8.3 ve 7.4 bulunmuştur. Elde edilen geri kazanım sonuçları ise % 95.2, 95.4 ve 89.5'tir. korelasyon katsayıları (r^2) ise 0.998, 0.998 ve 0.997 olarak hesaplanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılmış olan çalışmalarda idrarda ftalatların metabolizleri incelenirken bu çalışmayla ilk olarak metabolize olmadan atılan ftalatların varlığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla gaz kromatografi kütle spektrometre yöntemi geliştirilip validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvarımız koşullarında, kalibrasyon çalışmaları, tekrarlanabilirlik, verim ve hassasiyet çalışmaları ile yöntem valide edilmiş ve yöntemin güvenilirliği kanıtlanmıştır. Daha sonra toplanmış olan idrar örneklerinde ftalat analizleri yapılmıştır. Bunların sonuçlarına göre tayin edilen ftalatların alt ve üst limitleri DBP için 15.8-116.8 ppb, BBzP için 88.5-674.4 ppb ve DEHP için 139.4-330 ppb olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, kurduğumuz yöntemle idrarda metabolize olmadan atılan ftalatların varlığının tespit edilebildiği gösterilmiştir. İlerideki çalışmalar için idrardaki ftalat maruziyetinin belirlenmesi için, maruz kalınan ftalatın major/minor metabolitlerinin analiz edilmesi ve analizlerin daha hassas olduğu bilinen LC-MS cihazında yapılması önerilir.

ÖZET

Bazı Ftalat Düzeylerinin Biyolojik Sıvı Örneklerinde Belirlenmesi

Çalışmamızın amacı çevresel nedenlerle maruz kalınan ftalatların idrardaki düzeylerinin belirlenmesi için yöntem geliştirip işlerliğini kontrol etmektir.

Çalışmamızın ilk kısmında Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) yönteminin validasyonu gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrilerini çizmek amacıyla dibütil ftalat (DBP), bütil benzil ftalat (BBzP) ve di(2-etilhekzil) ftalat (DEHP)'nin 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.25 ppm stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere internal standart olarak benzil benzoat ilave edildi. Tüm çözeltiler üçer defa analiz edilerek kalibrasyon grafikleri çizildi. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda üç konsantrasyon için (0.25, 0.75, 1.25 ppm) standart sapma (SS), değişim katsayısı (CV) ve relatif standart sapma (RSS) değerleri hesaplandı. Tüm RSS değerleri < 5 olarak bulundu. Bu da yöntemin tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu gösterdi. Verim hesabı çalışmaları sonucunda yöntemin geri kazanılabilirliği % 98.04'ün üzerinde olduğu gözlemlendi. Hassasiyet çalışmalarında LOD ve LOQ (DBP için sırasıyla 0.010 ppm ve 0.030 ppm; BBzP için 0.003 ppm ve 0.009 ppm; DEHP için 0.004 ppm ve 0.011 ppm) olarak hesaplandı. Yapılan bu çalışmalarla yöntemin güvenilirliği sağlandı.

Çalışmamızda son olarak çevresel olarak ftalatlara maruz kalan bireylerden alınan idrar örneklerinde ftalat analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda ftalatların ortalama olarak belirlenen seviyeleri DBP, BBzP ve DEHP için sırasıyla 59.70, 367.03 ve 213.78 ppb olarak bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Ftalat, GC-MS, idrar

SUMMARY

Determination of Some Phthalate Levels in The Biological Fluid Samples

The aim of this study was to determine the levels of phthalates in urine, to develop methods to control the functionality.

For the first part of our study Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) method was validated. To set up calibration curves, stock solutions for dibutyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBzP) and diethylhexyl phthalate (DEHP) were prepared (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.25 ppm). These solutions were added as an internal standard benzyl benzoate. All solutions were injected three times and the calibration graphs were drawn. Coefficient of variation (CV), standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) were used to determine the repeatability at each concentration (low 0.25 ppm, medium 0.75 ppm and high 1.25 ppm). RSD values were found to be all below 5 indicating a good repeatability. After recovery studies, a recovery rate over 98.04 % was obtained. LOD and LOQ values (for DBP 0.010 ppm and 0.030 ppm; for BBzP 0.003 ppm and 0.009 ppm; for DEHP 0.004 ppm and 0.011 ppm respectively) were determined. Reliability was provided by these validation procedures.

Finally, in our study analysis of phthalates was performed in urine samples that taken from people exposed to phthalate enviromentally. As a result of this analysis, the average levels of phthalate were determined and were found 59.70 ppb for DBP, 367.03 for BBzP and 213.78 ppb for DEHP.

Key Words: GC-MS, Phthalate, Urine

KAYNAKLAR

- AURELA, B., KULMALA, H. & SODERHJELM, L. (1999). Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Additives and Contaminants* **16**: 571–577.
- AUTIAN, J. (1973). Toxicity and Health Threats of Phthale Esters: Review of the Literature. *Environ. Health Perspec.*
- BARLOW, N. J., FOSTER, P. M. (2003). Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* **31**: 397–410.
- BARLOW, N. J., PHILLIPS, S. L., WALLACE, D. G., SAR, M., GAIDO, K. W., FOSTER, P. M. (2003). Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Sci.* **73**: 431–434.
- BIZZARI, S., OPPENBERG, B., ISKIKAWA, Y. (2000). *Plasticizers. Chemical economics handbook*. Palo Alto, CA: SRI International.
- BLOUNT B.C., SILVA M.J., CAUDILL S.P., NEEDHAM L.L., PIRKLE J.L., SAMPSON E.J., LUCIER G.W., JACKSON R.J., BROCK J.W. (2000). Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect.* **108**:979–982
- BORCH, J., AXELSTAD, M., VINGGAARD, A. M., DALGAARD, M. (2006). Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicol. Lett.* **163**: 183–190.
- CALAFAT, A. M., NEEDHAM, L., SILVA, M. & LAMBERT, G. (2004). Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* **113**: e429–e434.
- CASAJUANA, N., & LACORTE,S. (2004). New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol a, bisphenol a diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 3702-3707
- CHOURASIA, M. & JAIN, S. (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**: 33–66.
- CRESTEIL, T. (1998). Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit. Contam.* **15**(suppl.):45–51.
- DIRVEN HA, VAN DEN BROEK PH, JONGENEELLEN FJ. (1993). Determination of four metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in human urine samples. *Int Arch Occup Environ Health.* **64**(8):555-60.
- EIGENBERG DA, BOZIGIAN HP, CARTER DE, SIPES EG. (1986). Distribution, excretion, and metabolism of butylbenzyl phthalate in the rat. *J Toxicol Environ Health.* **17**: 445-456.
- ELSISI, A., CARTER, D. & SIPES, I. (1989). Dermal absorption of phthalate diesters in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **12**: 70-77.

- EMA, M., ITAMI, T., KAWASAKI, H. (1993). Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats. *Toxicology*. **30(79)**: 11–19.
- FABJAN, E., HULZEBOS, E., MENNES, W., PIERSMA, A. H. (2006). A category approach for reproductive effects of phthalates. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**: 695–726.
- FARAHANI, H., NOROUZI, P., DINARVAND, R., GANJALI, M. R. (2007). Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J. Chromatogr. A*, **1172**: 105–112
- FDA (2001). Safety Assessment of di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Released from Medical Devices. US Food and Drug Administration, Washington DC. Available at: <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf>.
- FENG, Y., ZHUA J., SENSENSTEIN, R. (2005). Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. *Anal. Chim. Acta* **538**: 41–48
- FISHER, J. S., MACPHERSON, S., MARCHETTI, N., SHARPE, R. M. (2003). Human ‘testicular dysgenesis syndrome’: A possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum. Reprod.* **18**: 1383–1394.
- FLANAGAN R., TAYLOR A., WATSON I., WHELPTON R. (2007). Fundamentals of Analytical Toxicology John Wiley & Sons Ltd pp 145-176, 249-280, 353-398
- FOSTER, P. M. (2005). Mode of action: Impaired fetal leydig cell function—Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**: 713–719.
- FOSTER, P. M. (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.* **29**: 140–147; discussion 181–185.
- FOSTER, P. M., MYLCHREEST, E., GAIDO, K. W., SAR, M. (2001). Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum. Reprod.* **7**: 231–235.
- FROMME, H., ALBRECHT, M., ANGERER, J., DREXLER, H., GRUBER, L., SCHLUMMER, M., PARLAR, H., KÖRNER, W., WANNER, A., HEITMANN, D., ROSCHER, E., AND BOLTE, G. (2007). Integrated exposure assessment survey (INES) exposure to persistent and bioaccumulative chemicals in Bavaria, Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210**: 345–349.
- GENERAL MOTORS. (1982). Disposition of di(2-ethylhexyl) phthalate following inhalation and peroral exposure in rats. TSCATS: PTS0530339, Doc. I.D.: 86-910000683: General Motors Corp.
- GRAY, L. E., JR., OSTBY, J., FURR, J., PRICE, M., VEERAMACHANENI, D. N., PARKS, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* **58**: 350–365.
- GREEN, R., HAUSER, R., CALAFAT, A., WEUVE, J., SCHESSLER, T., RINGER, S., HUTTNER, K. & HU, H. (2005). Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate Containing

Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants. *Environ. Health Perspec.* **113**: 1222–1225.

GUO, Y., ALOMIRAH H., CHO H., MINH T.B., MOHD M.A., NAKATA H. ve KANNAN K. (2011). Occurrence of phthalate metabolites in human urine from several asian countries. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 3138–3144.

GUO, Z., GAI, P., DUAN, J., ZHAI J., ZHAO, S., WANG, S. ve WEI, D. (2010). Simultaneous determination of phthalates and adipates in human serum using gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. *Biomed. Chromatogr.* **24**: 1094–1099

HAGEDORN-LEWEKE, U. & LIPPOLD, B. (1995). Absorption of sunscreens and other compounds through human skin in vivo: derivation of a method to predict maximum fluxes. *Pharm. Res.* **12**: 1354–1360.

HAUSER, R., R., DUTY, S., GODFREY-BAILEY, L. & CALAFAT, A. (2004). Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ. Health Perspec.* **112**: 751–753.

HELLWIG, J., FREUDENBERGER, H., JÄCKH, R. (1997). Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. *Food Chem. Toxicol.* **35**: 501–512.

HEUDORF, U., MERSCH-SUNDERMANN V., ANGERER, J. (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210**: 623–634.

HILL, S. (1997). Analysis of contaminants in oxygen from PVC tubing in respiratory therapy, chromatic components in electrochemical sensors, and a model for the degradation of electrical cable insulation. PhD Thesis, University of Connecticut, CT, USA.

HITES, R.A., Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Gas Chromatography Mass Spectrometry, Chapter 31.

HOWDESHELL, K. L., WILSON, V. S., FURR, J., LAMBRIGT, C. R., RIDER, C. V., BLYSTONE, C. R., HOTCHKISS, A. K., AND GRAY, L. E., JR. (2008). A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol. Sci.* **105**: 153–165.

<http://www.forumsci.co.il/HPLC/usp-ms-2spaltet.pdf> Erişim Tarihi: 04.09.2011

http://www.knockhardy.org.uk/sci_htm_files/ms2.pdf Erişim Tarihi: 04.09.2011

<http://www.shimadzu.com/products/lab/ms/tutorial/oh80jt0000007cva.html> Erişim Tarihi: 11.10.2011

ITO, Y., YOKOTA, H., WANG, R., YAMANOSHITA, O., ICHIHARA, G., WANG, H., KURATA, Y., TAKAGI, K., AND NAKAJIMA, T. (2005). Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch. Toxicol.* **79**: 147–154.

JAAKKOLA, J. J., KNIGHT, T. L. (2008). The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* **116**: 845–853.

- KAMBIA K, DINE T, GRESSIER B, GERME AF, LUYCKX M, BRUNET C, MICHAUD L, GOTTRAND F. (2001). High-performance liquid chromatographic method for the determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in total parenteral nutrition and in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **755(1-2):**297-303.
- KARLE, V., SHORT, B., MARTIN, G., BULAS, D., GETSON, P., LUBAN, N., O'BRIEN, A., RUBIN, R. (1997). Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl) phthalate. *Crit. Care Med.* **25:** 696–703.
- KAVLOCK, R., BARR, D., BOEKELHEIDE, K., BRESLIN, W., BREYSSE, P., CHAPIN, R., GAIDO, K., HODGSON, E., MARCUS, M., SHEA, K., AND WILLIAMS, P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.* **22:** 291–399.
- KAVLOCK, R., BOEKELHEIDE, K., CHAPIN, R., CUNNINGHAM, M., FAUSTMAN, E., FOSTER, P., GOLUP, M., HENDERSON, R., HINBERG, I., LITTLE, R., SEED, J., SHEA, K., TABACOVA, S., TYL, R., WILLIAMS, P., ZACHAREWSKI, T. (2002a). NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates experts panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isononyl phthalate. *Reprod. Toxicol.* **16:** 679–708.
- KAVLOCK, R., BOEKELHEIDE, K., CHAPIN, R., CUNNINGHAM, M., FAUSTMAN, E., FOSTER, P., GOLUB, M., HENDERSON, R., HINBERG, I., LITTLE, R., SEED, J., SHEA, K., TABACOVA, S., TYL, R., WILLIAMS, P., ZACHAREWSKI, T., (2002b). NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction; Phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Reprod. Toxicol.* **16:** 529–653.
- KIMBER I. & DEARMAN R.J. (2010). An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicology* **271:** 73–82, Review.
- KLUWE, W. M. (1982). Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environ. Health Perspect.* **45:** 3–9.
- KOCH, H. M., BOLT, H. M., PREUSS, R., AND ANGERER, J. (2005). New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* **79:** 367–376.
- KOCH, H. M., DREXLER, H., AND ANGERER, J. (2003a). An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **206:** 77–83.
- KOCH, H. M., PREUSS, R., AND ANGERER, J. (2006). Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure—An update and latest results. *Int. J. Androl.* **29:** 155–165.
- KOCH, H. M., ROSSBACH, B., DREXLER, H., AND ANGERER, J. (2003b). Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ. Res.* **93:** 177–185.
- KOO, H. J. & LEE, B. M. (2004). Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **67:** 1901–1914.

- KOO, H. J., LEE, B. M. (2007). Toxicokinetic relationships between di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **70**: 383–387.
- LAKE, B.G., PHILLIPS, J.C., LINNELL, J.C., GANGOLLI, S.D. (1977). The in vitro hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol Appl Pharmacol.* **39**: 239-248.
- LATINI, G., DE FELICE, C., PRESTA, G., DEL VECCHIO, A., PARIS, I., RUGGIERI, F., and MAZZEO, P. (2003). In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1783–1785.
- LATINI, G., DEL VECCHIO, A., MASSARO, M., VERROTTI, A., and DE FELICE, C. (2006). In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr. Med. Chem.* **13**: 2527–2534.
- LISS, G. M., ALBRO, P. W., HARTLE, R. W., AND STRINGER, W. T. (1985). Urine phthalate determinations as an index of occupational exposure to phthalic anhydride and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Scand. J. Work Environ. Health* **11**: 381–387.
- LOPEZ-CARRILLO, L, HERNANDEZ-RAMIREZ, R.U., CALAFAT, A.M., TORRES-SANCHEZ, L., GALVAN-PORTILLO, M., NEEDHAM, L.L., RUIZ-RAMOS, R., CEBRIAN, M.E. (2010). Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environ Health Perspect.* **118**: 539–44.
- LYCHE J.L., GUTLEB A.C., BERGMAN A., ERIKSEN G.S., MURK A.T.J., ROPSTADL E., SAUNDERS M., SKAARE J.U. (2009). Reproductive and Developmental Toxicity of Phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, **12**:225–249.
- MAFF (1996). Food Surveillance Information Sheet – Phthalates in Food. *Joint Food Safety and Standards Group*, Vol. 1999. MAFF, UK.
- MATSUMOTO, M., HIRATA-KOIZUMI, M., and EMA, M. (2008). Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **50**:37–49.
- MEEK, M. & CHAN, P. (1994). Bis(2-ethylhexyl) phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *J. Environ. Sci. and Health Part C* **12**: 179–194.
- MEEKER, J. D., CALAFAT, A. M., HAUSER, R. (2007). Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ. Health Perspect.* **115**: 1029–1034.
- MIKURIYA H, IKEMOTO I, TANAKEN A. (1988). Urinary metabolites contributing to the testicular damage induced by butylbenzyl phthalate. *Jikeikai Med. J* **35**: 403.
- MORTENSEN, G. K., MAIN, K. M., ANDERSSON, A. M., LEFFERS, H., and SKAKKEBAEK, N. E. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **382**: 1084–1092.
- MOSE, T., KNUDSEN, L. E., HEDEGAARD, M., and MORTENSEN, G. K. (2007). Transplacental transfer of monomethyl phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in a human placenta perfusion system. *Int. J. Toxicol.* **26**: 221–229.

- MUNKSGAARD, E. (2004). Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *Dental European J. Oral Sci.* **112**: 101–104.
- MYLCHREEST, E., WALLACE, D. G., CATTLE, R. C., FOSTER, P. M. (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.* **55**: 143–151.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (2000a). NTP-CERHR Expert Panel Report on Butyl Benzyl Phthalate (BBP).
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (2000b). NTP-CERHR Expert Panel Report on Di-n-Butyl Phthalate (DBP).
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (2003). NTP CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP).
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (2005). NTP-CERHR Expert Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP).
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. (2006). NTP CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP).
- NG, K. M., CHU, I., BRONAUGH, R. L., FRANKLIN, C. A., and SOMERS, D. A. (1992). Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**: 216–223.
- NIINO T, ISHIBASHI T, ITHO T, SAKAI S, ISHIWATA H, YAMADA T, ONODERA S. (2002). Simultaneous determination of phthalate di- and monoesters in poly(vinylchloride) products and human saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **780(1)**: 35-44.
- OTAKE, T., YOSHINAGA, J. & YANAGISAWA, Y. (2004). Exposure to phthalate esters from indoor environment. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **14**: 524–528.
- PAN, G., HANAOKA, T., YOSHIMURA, M., ZHANG, S., WANG, P., TSUKINO, H., INOUE, K., NAKAZAWA, H., TSUGANE, S., AND TAKAHASHO, K. (2006). Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): A cross section study in China. *Environ. Health Perspect.* **114**:1643–1648.
- PARKS, L. G., OSTBY, J. S., LAMBRIGHT, C. R., ABBOTT, B. D., KLINEFELTER, G. R., BARLOW, N. J., GRAY, L. E., JR. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* **58**: 339–349.
- PECK, C. C. & ALBRO, P. W. (1982). Toxic potential of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ. Health Perspect.* **45**: 11–17.

- PENALVER, A., POCURULL, E., BORRULL, F., MARCE, R.M. (2000). Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. **872**: 191–201
- ROWLAND I.R., COTTRELL R.C., PHILLIPS J.C. (1977). Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food Cosmet Toxicol.* **15**: 17-21.
- RUSYN, I., PETERS, J. M., AND CUNNINGHAM, M. L. (2006). Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**: 459–479
- RYU, J. Y., WHANG, J., PARK, H., IM, J. Y., KIM, J., AHN, M. Y., LEE, J., KIM, H. S., LEE, B. M., YOO, S. D., KWACK, S. J., OH, J. H., PARK, K. L., HAN, S. Y., KIM, S. H. (2007). Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **70**: 1296–1303.
- SAILLENFAIT A.M., PAYAN J.P., FABRY J.P., BEYDON D., LANGONNE I., GALLISSOT F., SABATE J.P.. (1998). Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol Sci.* **45**: 212-224.
- SCHETTLER T. (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.* **29**: 134–139.
- SCHMID, P. & SCHLATTER, C. (1985). Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica* **15**: 251–256.
- SCOTT, R., DUGARD, P., RAMSEY, J. & RHODES, C. (1987). In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. *Environ. Health Perspec.* **74**: 223–227.
- SHARPE, R. M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**: 91–110.
- SHARPE, R. M., and SKAKKEBAEK, N. E. (2008). Testicular dysgenesis syndrome: Mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil. Steril.* **89**(2 suppl.):e33–e38.
- SHEA K.M. & THE COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL HEALTH (2003). Pediatric Exposure and Potential Toxicity of Phthalate Plasticizers. *Pediatrics.* **111**: 1467-1474
- SHEN, H., JIANG, H., MAO, H., PAN, G., ZHOU, L., CAO, Y.(2007). Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. *J. Sep. Sci.* **30**: 48–54
- SHINTANI, H. (1985). Determination of phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl) phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate in human plasma and in blood products. *J.Chromatogr.* **337**: 279-290.
- SILVA M.J., SLAKMAN A.R., REIDY J.A., PREAU J.L., HERBERT A.R., SAMANDAR E., NEEDHAM L.L., CALAFAT A.M.. (2004c) Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **805**(1):161-7

- SILVA, M. J., BARR, D. B., REIDY, J. A., MALEK, N. A., HODGE, C. C., CAUDILL, S. P., BROCK, J. W., NEEDHAM, L. L., CALAFAT, A. M. (2004a). Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Environ. Health Perspect.* **112**: 331–338.
- SILVA, M. J., REIDY, J. A., HERBERT, A. R., PREAU, J. L., NEEDHAM, L. L., CALAFAT, A. M. (2004b). Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **72**: 1226–1231.
- SILVA, M. J., REIDY, J. A., SAMANDAR, E., HERBERT, A. R., NEEDHAM, L. L., CALAFAT, A. M. (2005). Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch. Toxicol.* **79**: 647–652.
- SIRCAR D., ALBAZI S. J., ATALLAH Y., PIZZI W.. (2008). Validation and application of an HPLC method for determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in liver samples. *J. Chromatogr. Sci.* **46(7)**:627-31
- SJÖBERG P, BONDESSON U. (1985). Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites in blood plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **344**:167-75.
- SKAKKEBAEK, N. E., JØRGENSEN, N., MAIN, K. M., RAJPERT-DE MEYTS, E., LEFFERS, H., ANDERSSON, A. M., JUUL, A., CARLSEN, E., MORTENSEN, G. K., JENSEN, T. K., and TOPPARI, J. (2006). Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* **29**:2–11.
- SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., Analitik Kimya Temelleri, s 686-699, Bilim Yayıncılık, Ankara
- SÖYLEMEZOĞLU T., ÇEÇEN Ş.Ş. (2003). Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi Analitik Toksikolojide Uygulaması. Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Yayın No:1
- SRIVASTAVA, S., AWASTHI, V. K., SRIVASTAVA, S. P., AND SETH, P. K. (1989). Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Indian J. Exp. Biol.* **27**: 885–888.
- STAHLHUT, R. W., VAN WIJNGAARDEN, E., DYE, T. D., COOK, S., SWAN, S. H. (2007). Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ. Health Perspect.* 115:876–882. Epub 2007 Mar 14. Erratum in: *Environ. Health Perspect.* **115**: A443.
- TANAKA A., MATSUMOTO A., YAMAHA T. (1978). Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology.* **9**: 109-123.
- TEIRLYNCK O.A. & ROSSEEL M.T. (1985). Determination of di- and mono(2-ethylhexyl) phthalate in plasma by gas chromatography. *J Chromatogr.* **342(2)**:399-405.
- TYL, R. W., MYERS, C. B., MARR, M. C., FAIL, P. A., SEELY, J.C., BRINE, D. R., BARTER, R. A., BUTALA, J. H. (2004). Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod. Toxicol.* **18**: 241–264.
- US EPA (1992). Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. EPA/600/8-91/011B. Available at: <http://www.epa.gov/nceawww1/pdfs/derexp.pdf>.

- WAHL H.G., HONG Q., STÜBE D., MAIER M.E., HÄRING H.U., LIEBICH H.M. (2001). Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **758(2)**: 213-9.
- WARE, G. & WHITACRE, D. (2004). An introduction to insecticides, 4th edn. In: The Pesticide Book, 6th edn (eds O. Willoughby), MeisterPro Information Resources, Willoughby, OH, USA. Available at: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>.
- WATERMAN, S. J., AMBROSO, J. L., KELLER, L. H., TRIMMER, G. W., NIKIFOROV, A. I., HARRIS, S. B. (1999). Developmental toxicity of di isodecyl and di-isononyl phthalates in rats. *Reprod. Toxicol.* **13**: 131–136.
- WILLIAMS D.T., BLANCHFIELD B.J. (1975). The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate ⁷ sup ¹sup ⁴C in the rat. *J Agric Food Chem.* **23**: 854-858.
- WILSON, V. S., LAMBRIGHT, C., FURR, J., OSTBY, J., WOOD, C., HELD, G., GRAY, L. E., JR. (2004). Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol. Lett.* **146**: 207–215.
- WITTASSEK, M., ANGERER, J. (2008). Phthalates: Metabolism and exposure. *Int. J. Androl.* **31**: 131–138.
- ZHU, J., PHILLIPS, S. P., FENG, Y. L., YANG, X. (2006). Phthalate esters in human milk: concentration variations over 6-month postpartum time. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 5276–5281.

EKLER

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Fitalatlar ve metabolitlerinin plasenta, kordon kanı ve anne biyolojik örneklerinde düzeylerinin belirlenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 151-4731	Tarih: 04 Mayıs 2009
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	

Bünyamin KARATASOĞLU
A.Ü. Tıp Fakültesi
Akademik Birey 3. Sınıfı



15 Mayıs 2009

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

Prof. Dr.Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	Handan
Prof.Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Ajlan
Prof.Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Esra
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aydan
Prof. Dr. Ethem Geçim Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	Ethem
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Erdal
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Toplantıda
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	Bülent
Doç.Dr.Ashhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Kongrede
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	Gülsüm



15/11/2009
ASLI GIBIDIR

Bünyamin KARATAŞOĞLI
A.Ü. Tıp Fakültesi
Akademiik Birim Başkanı
Bünyamin

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Burçin

Soyadı: KOÇ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1986, İSTANBUL

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü Tıp Fakültesi

Cebeci Kampusü Dikimevi/ANKARA

Tel:0(312) 319 27 34

II- Eğitimi

2004 – 2010 İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fak. Kimya Mühendisliği Bölümü

2000 – 2004 Özel Çınar Lisesi-İSTANBUL

1997 – 2000 Bekir Sami Dedeoğlu İlköğretim Ortaokulu-İSTANBUL

1992 – 1997 Gaziosmanpaşa İlköğretim İlkokulu-İSTANBUL

Yabancı Dili: İngilizce

Poster Bildirisi:

Emrah Dural, **Burçin Koç**, Zeliha Kayaaltı, Betül İşiner, Erhan Boran, Tülin Söylemezoğlu, “Anne plasentası ve idrarında ftalat düzeylerinin belirlenmesi”; Eurotox 2011, Poster Sunumu, Paris-Fransa 28-31 Ağustos 2011.