

**POLİMER BAZLI TIBBİ MALZEMELERDEN
NİTROZAMİNLER VE NİTROZLANABİLEN
MADDELER İÇİN ANALİZ METODUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF ANALYSIS METHOD FOR
NITROSAMINES AND NITROSATABLE SUBSTANCES
FROM POLYMER BASED MEDICAL MATERIALS**

MELİKE DAMAR

PROF. DR CENGİZ KAVAKLI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

POLİMER BAZLI TIBBİ MALZEMELERDEN NİTROZAMİNLER VE NİTROZLANABİLEN MADDELER İÇİN ANALİZ METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Melike DAMAR

Yüksek Lisans, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz KAVAKLI

Ağustos 2024, 136 sayfa

Ekstrakte edilebilir/süzülebilir madde profilinin oluşturulması ve sonrasında toksikolojik risk değerlendirmesinin yapılması tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesinin önemli bir parçasıdır. Tıbbi malzemelerin piyasaya sürülebilmesinin temel yükümlülüklerinden biri biyouyumluluk değerlendirmesinden geçmiş olmasıdır. Tıbbi malzemelerin biyolojik değerlendirmesinin uygunluğu, ekstrakte edilebilir ve süzülebilir maddelerin tespiti çalışmalarının sağlamlığına ve doğruluğuna bağlıdır. Bu çalışmada, N-nitrozaminlerin ve N-nitrozlanabilir maddelerin belirlenmesi bağlamında bu maddeleri sızdırmaya eğilimli olan silikon veya kauçuktan yapılmış tıbbi malzemeler için hedefli bir analiz yaklaşımı oluşturulmuştur. Numune alma metodolojileri, N-nitrozlanabilir maddeler açısından EN ISO 10993-12 ve EN 12868'deki yaklaşımlar dikkate alınarak incelenmiştir. NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA, NDBzA ve NDiNA maddelerinin kalitatif ve kantitatif analizi için sırasıyla tarama (SCAN) ve seçilmiş iyon izleme (SIM) modları kullanılarak uygun GC-MS parametreleri oluşturulmuştur. Oluşturulan GC-MS metodu için doğrusallık, LOD-LOQ, gerçeklik ve kesinlik çalışmaları yapılmış ve tüm bu çalışmalar kullanılarak ölçüm belirsizliği hesaplanmış olup metod validasyonu böylece yapılmıştır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrilerinin minimum 0,9965 tayin katsayısı (r^2) değerleri ile 10-100 µg/L derişim aralığında doğrusal olduğunu göstermektedir. LOD ve LOQ değerleri tüm maddeler için sırasıyla 1,6-19 µg/L ve 5,5-56,4 µg/L aralığındadır. Validasyon çalışmaları için 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L seçilmiş olup bu noktalarda düşük bağıl standart sapma değerleri ile tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik koşulları sağlanmıştır. 6 adet nitrozamin maddesi için her bir derişim noktasında geri kazanım oranları standartların ön gördüğü limitler olan %95±30 aralığındadır. Yalnızca 20 µg/L noktasında NDİNA için geri kazanım değeri %131 olup kabul kriteri sağlanamamıştır. Bu tez çalışması kapsamında polimerik tıbbi malzemelerde nitrozamin ve nitrozlanabilen madde analizi amacıyla geliştirilmiş olan metot valide edilmiş olup ilgili yönetmelikler, standartlar ve literatürle kıyaslandığında etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Polimerik tıbbi malzemeler, biyoyumluluk, nitrozaminler, nitrozlanabilen maddeler, GC-MS, metot validasyonu

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYSIS METHOD FOR NITROSAMINES AND NITROSATABLE SUBSTANCES FROM POLYMER BASED MEDICAL MATERIALS

Melike DAMAR

Master of Science, Department of Polymer Science and Technology

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz KAVAKLI

August 2024, 136 pages

Extractable and leachable substance determination and corresponding toxicological risk assessment strategy is the essential part of the biological evaluation of the medical devices. One of the main obligations for placing medical devices on the market is to have undergone a biocompatibility assessment. Therefore, the appropriateness of biological evaluation of medical devices depends on the robustness and accurateness of the extractable and leachable studies. In this study, a targeted analysis approach for the determination of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances was established for medical devices made of rubber and elastomer, which are prone to leaching these substances. Sampling methodologies were examined considering the approaches in EN ISO 10993-12 and EN 12868 for nitrosatable substances. Appropriate GC-MS parameters were established for the qualitative and quantitative analysis of NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA, NDBzA and NDiNA using screening (SCAN) and selected ion monitoring (SIM) modes, respectively. Linearity, LOD-LOQ, accuracy and precision

studies were performed for the established GC-MS method and measurement uncertainty was calculated based on these studies and method validation was thus performed.

The results show that the calibration curves are linear within the 10-100 µg/L concentration range with a minimum r^2 value of 0.9965. The LOD and LOQ values are in the range 1,6-19 µg/L and 5,5-56,4 µg/L for all substances, respectively. For the validation studies, concentrations of 20 µg/L, 60 µg/L and 100 µg/L were selected and repeatability and reproducibility conditions were achieved with low relative standard deviation values. For six nitrosamine substances, the recovery rates at each concentration point are within the standard's prescribed limits of $95\pm 30\%$. Only at 20 µg/L point, the recovery value for NDiNA was %131, which did not meet the acceptance criteria. Within the scope of this thesis, the method developed for the analysis of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances in polymeric medical devices was validated and determined to be an efficient method when compared with the relevant regulations, standards and literature.

Keywords: Polymeric medical devices, biocompatibility, nitrosamines, nitrosatable substances, GC-MS, method validation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca deneyim ve tecrübeleriyle bana destek veren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Cengiz KAVAKLI'ya en içten saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma grubumuzun hocalarından Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI'ya yüksek lisansım boyunca bilgi ve tecrübesiyle yol gösterici olduğu için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın en başından beri, değerli fikir ve düşünceleriyle bana destek olan ve zamanını ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Dr. Serhad TİLKİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezime verdikleri destekten ve laboratuvar imkanlarını kullanmam konusunda sağladıkları yardımdan ötürü Türk Standardları Enstitüsü Kimya ve Gıda Laboratuvarı Ankara Müdürlüğü yöneticilerine ve değerli mesai arkadaşım Esmâ Esra CAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince gerek deneysel çalışma aşamasında gerekse tez yazım aşamasında tıbbi cihaz alanında engin bilgi birikimleri ile her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Fırat HACIOĞLU ve Dr. Berna KANKILIÇ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda ve destek olan kıymetli aileme ve sevgili eşime, varlığı sayesinde güç bulduğum ve motive olduğum, hayatımın daha anlamlı olmasını sağlayan biricik oğlum ALP'e en özel teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tıbbi Cihazlar.....	3
2.2. Avrupa Birliği ve Türkiye’de Tıbbi Cihaz Endüstrisi.....	3
2.3. Tıbbi Cihaz Yönetmeliği	6
2.4. Tıbbi Cihazlarda Genel Güvenlilik ve Performans Şartları	6
2.5. Tıbbi Cihazların Biyouyumluluk Değerlendirmesi	7
2.5.1. Tıbbi Cihazlarda Kimyasal Karakterizasyon	8
2.6. Ekstrakte Edilebilir ve Süzülebilir Madde Analizi	8
2.7. Nitrozamin ve Nitrozlanabilir Maddeler Hakkında Genel Bilgi	13
2.7.1. N-nitrosodipropilamin (NDPA)	17
2.7.2. N-nitrosomorpholine (NMOR)	19
2.7.3. N-nitrosopirrolidin (NPYR)	20
2.7.4. N-nitrosopiperidine (NPIP)	21
2.7.5. N-nitrosodiisobutylamine (NDiBA).....	21
2.7.6. N-nitrosodibenzylamine (NDBzA)	22
2.7.7. N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine (NDiNA)	23
2.8. GC-MS Çalışma Prensipleri	24
2.9. Nicel Analizlerde Metot Geçerli Kılma Çalışmaları.....	27
2.9.1. Algılama ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	27
2.9.2. Metot Çalışma Aralığı (Lineer Aralık).....	28
2.9.3. Kesinlik	28

2.9.4. Doğruluk	30
2.9.5. Ölçüm Belirsizliği	30
2.10. Çalışmanın Amacı	32
2.11. Çalışma Tasarımı	33
2.11.1. Analiz Metodunun Tasarımı	33
2.11.2. Analiz Metodunun Geçerli Kılma Çalışmalarının Tasarımı	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	37
3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	39
3.3. GC-MS Cihazı ile Nitrozamin Analizi Metodunun Oluşturulması	39
3.3.1. SCAN (Tarama) Modda Yapılan Çalışmalar	40
3.3.1.1. Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi	40
3.3.1.2. Hedef ve Tanımlayıcı İyonların Belirlenmesi	49
3.3.2. SIM (Selected Ion Monitoring) Modda Yapılan Çalışmalar	52
3.3.2.1. İç Standart Kullanmadan Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi	54
3.3.2.2. İç Standart Kullanarak Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi	59
3.4. GC-MS Cihazı ile Nitrozamin Analizi Metodunun Geçerli Kılınması	66
3.4.1. LOD-LOQ Çalışmaları	67
3.4.2. İç Kalite Kontrol Çalışmaları	69
3.4.3. Geri Kazanım Çalışmaları	74
3.4.3.1. EN ISO 10993-18 ve EN ISO 10993-12 Prensiplerine Göre Yapılan Özütleme İşlemi	75
3.4.3.2. EN 12868 ve EN 71-12 Prensiplerine Göre Yapılan Özütleme İşlemi	76
3.4.3.3. Geri Kazanım Çalışma Sonuçları	78
3.4.4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	79
3.4.5. Tekrar Üretilirlik Çalışmaları	84
3.4.6. Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması	88
3.4.6.1. Kalibrasyon Eğrisinden Gelen Ölçüm Belirsizliği	88
3.4.6.2. Tekrarlanabilirlikten Gelen Ölçüm Belirsizliği	105
3.4.6.3. Tekrar Üretilirlikten Gelen Ölçüm Belirsizliği	106
3.4.6.4. Geri Kazanımdan Gelen Ölçüm Belirsizliği	107
3.4.6.5. Ölçüm Aletlerinden Gelen Ölçüm Belirsizliği	108

3.4.6.6. Birleştirilmiş ve Genişletilmiş Belirsizlik	108
4. SONUÇLAR	114
5. DEĞERLENDİRME	119
6. KAYNAKLAR.....	125
EKLER	135
EK 1 - Tez Çalışması Orijinallik Raporu	135
ÖZGEÇMİř	136



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. GC-MS cihaz görseli	26
Şekil 3.1. Çözücü körü kromatogramı	40
Şekil 3.2. NDPA kromatogramı	41
Şekil 3.3. NDPA kütüphane taraması	41
Şekil 3.4. NMOR kromatogramı	42
Şekil 3.5. NMOR kütüphane taraması	42
Şekil 3.6. NPYR kromatogramı	43
Şekil 3.7. NPYR kütüphane taraması	43
Şekil 3.8. Carbamic chloride, diethyl- kütle spektrumu	44
Şekil 3.9. Methyl morpholine-3-carboxylate, N-methyl kütle spektrumu	44
Şekil 3.10. 3H-1,2,4-Triazol-3-one, 4-amino-2,4-dihydro- kütle spektrumu	44
Şekil 3.11. Pyrrolidine, 1—nitroso kütle spektrumu	45
Şekil 3.12. NPYR kütle spektrumu	45
Şekil 3.13. NPIP kromatogramı	46
Şekil 3.14. NPIP kütüphane taraması	46
Şekil 3.15. NDiBA kromatogramı	47
Şekil 3.16. NDiBA kütüphane taraması	47
Şekil 3.17. NDBzA kromatogramı	47
Şekil 3.18. NDBzA kütüphane taraması	48
Şekil 3.19. NDiNA kromatogramı	48
Şekil 3.20. NDiNA Kütüphane Taraması	48
Şekil 3.21. NDPA kütle spektrumu	50
Şekil 3.22. NMOR kütle spektrumu	50
Şekil 3.23. NPYR kütle spektrumu	50
Şekil 3.24. NPIP kütle spektrumu	51
Şekil 3.25. NDiBA kütle spektrumu	51
Şekil 3.26. NDBzA kütle spektrumu	51
Şekil 3.27. NDiNA kütle spektrumu	52
Şekil 3.28. NDPA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	55
Şekil 3.29. NMOR Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	56
Şekil 3.30. NPYR Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	56

Şekil 3.31. NPIP Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	56
Şekil 3.32. NDiBA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	57
Şekil 3.33. NDBzA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan).....	57
Şekil 3.34. NDiNA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)	57
Şekil 3.35. NDEA-d10 kromatogramı.....	59
Şekil 3.36. NDEA-d10 spektrumu	60
Şekil 3.37. NDPA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı).....	64
Şekil 3.38. NMOR kalibrasyon eğrisi (iç standartlı).....	64
Şekil 3.39. NPYR kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)	64
Şekil 3.40. NPIP kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)	65
Şekil 3.41. NDiBA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)	65
Şekil 3.42. NDBzA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı).....	65
Şekil 3.43. NDiNA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)	66
Şekil 3.44. NDPA iç kalite kontrol grafiği.....	70
Şekil 3.45. NMOR iç kalite kontrol verileri.....	70
Şekil 3.46. NPYR iç kalite kontrol grafiği	71
Şekil 3.47. NPIP iç kalite kontrol grafiği	72
Şekil 3.48. NDiBA iç kalite kontrol grafiği	72
Şekil 3.49. NDBzA iç kalite kontrol grafiği.....	73
Şekil 3.50. NDiNA iç kalite kontrol grafiği	74
Şekil 3.51. NDPA belirsizlik kaynakları grafiği	111
Şekil 3.52. NMOR belirsizlik kaynakları grafiği	111
Şekil 3.53. NPYR belirsizlik kaynakları grafiği	112
Şekil 3.54. NPIP belirsizlik kaynakları grafiği	112
Şekil 3.55. NDiBA belirsizlik kaynakları grafiği.....	112
Şekil 3.56. NDBzA belirsizlik kaynakları grafiği.....	113
Şekil 3.57. NDiNA belirsizlik kaynakları grafiği	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yarı kantitatif yaklaşım için uygulanan ekstraksiyon koşulları	12
Çizelge 2.2. N-nitrosodipropilamin özellikleri	18
Çizelge 2.3. N-nitrosomorpholin özellikleri	19
Çizelge 2.4. N-nitrosopirrolidin özellikleri.....	20
Çizelge 2.5. N-nitrosopiperidin özellikleri	21
Çizelge 2.6. N-nitrosodiisobutylamine özellikleri	22
Çizelge 2.7. N-nitrosodibenzylamine özellikleri	23
Çizelge 2.8. N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine özellikleri.....	24
Çizelge 2.9. Standart sapma eşitlikleri.....	28
Çizelge 2.10. Tekrarlanabilirlik eşitlikleri	29
Çizelge 2.11. Tekrar üretilebilirlik eşitlikleri	30
Çizelge 2.12. Bağlı geri kazanım eşitliği	30
Çizelge 2.13. Ölçüm belirsizliği çalışmalarında kullanılan terimler ve tanımlar	31
Çizelge 2.14. Belirsizlik hesaplama formülleri [91, 92]	32
Çizelge 2.15. Metot geçerli kılma aşamasında uygulanan kabul kriterleri.....	33
Çizelge 3.1. Sertifikalı referans malzeme bilgileri	37
Çizelge 3.2. İç standart ve nitrozamin karışım çözeltisi referans malzeme bilgileri	38
Çizelge 3.3. Kullanılan diğer kimyasallarla ilgili bilgiler	38
Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihaz/ölçüm aletleri listesi.....	39
Çizelge 3.5. Yedi Adet Nitrozamin Maddesinin Alıkonma Süreleri	49
Çizelge 3.6. Hedef ve tanımlayıcı iyon literatür taraması	49
Çizelge 3.7. Belirlenmiş hedef ve tanımlayıcı iyonlar.....	52
Çizelge 3.8. Nitrozamin analizi GC-MS metot parametrelerinin karşılaştırması.....	53
Çizelge 3.9. Oluşturulan GC-MS-SIM metot parametreleri.....	54
Çizelge 3.10. Kalibrasyon Verileri (iç standart kullanmadan)	55
Çizelge 3.11. İç standart kullanmadan yapılan tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları	58
Çizelge 3.12. İç standart (ISTD) kullanılarak yapılan kalibrasyon verileri.....	60
Çizelge 3.13. NDPA maddesinin bağlı alan-bağlı derişim değerleri.....	61
Çizelge 3.14. NMOR maddesinin bağlı alan-bağlı derişim değerleri.....	62
Çizelge 3.15. NPYR maddesinin bağlı alan-bağlı derişim değerleri.....	62
Çizelge 3.16. NPIP maddesinin bağlı alan-bağlı derişim değerleri	62

Çizelge 3.17. NDiBA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri.....	63
Çizelge 3.18. NDBzA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri	63
Çizelge 3.19. NDiNA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri	63
Çizelge 3.20. İç standart varlığında kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayıları (r^2)	66
Çizelge 3.21. GC-MS Cihazından Alınan Sinyal/Gürültü (S/N) Oranları	67
Çizelge 3.22. NDPA için LOD değerinin ekstrapolasyon hesaplaması verileri	68
Çizelge 3.23. NDPA için LOQ değerinin ekstrapolasyon hesaplaması verileri	68
Çizelge 3.24. Yedi adet nitrozamin maddesi için belirlenen LOD/LOQ değerleri.....	69
Çizelge 3.25. NDPA iç kalite kontrol verileri	69
Çizelge 3.26. NMOR iç kalite kontrol verileri.....	70
Çizelge 3.27. NPYR iç kalite kontrol verileri	71
Çizelge 3.28. NPIP iç kalite kontrol verileri	71
Çizelge 3.29. NDiBA iç kalite kontrol verileri	72
Çizelge 3.30. NDBzA iç kalite kontrol verileri.....	73
Çizelge 3.31. NDiNA iç kalite kontrol verileri	73
Çizelge 3.32. EN ISO 10993-18 ve EN ISO 10993-12 kapsamında özütleme koşulları [10,15]	75
Çizelge 3.33. EN 10993-18 ve EN 71-12'de belirtilen koşullarda özütleme ile geri kazanım verileri.....	75
Çizelge 3.34. Tuzlar ve 1 L yapay tükürük tuzu çözeltisi için kütleleri	77
Çizelge 3.35. 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişimlerinde geri kazanım çalışmaları ..	78
Çizelge 3.36. Geri kazanım (%R) değerleri	79
Çizelge 3.37. NDPA tekrarlanabilirlik çalışmaları	80
Çizelge 3.38. NMOR tekrarlanabilirlik çalışmaları	81
Çizelge 3.39. NPYR tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	81
Çizelge 3.40. NPIP tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	82
Çizelge 3.41. NDiBA tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	82
Çizelge 3.42. NDBzA tekrarlanabilirlik çalışmaları	83
Çizelge 3.43. NDiNA tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	83
Çizelge 3.44. NDPA tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	84
Çizelge 3.45. NMOR tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	85
Çizelge 3.46. NPYR tekrar üretilebilirlik çalışmaları	85
Çizelge 3.47. NPIP tekrar üretilebilirlik çalışmaları	86

Çizelge 3.48. NDiBA tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	86
Çizelge 3.49. NDBzA tekrar üretilebilirlik çalışmaları	87
Çizelge 3.50. NDiNA tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	87
Çizelge 3.51. NDPA kalibrasyon grafiği verileri	89
Çizelge 3.52. NDPA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması (S)	89
Çizelge 3.53. NDPA için residual standart sapma (S_{xx}) hesabı.....	89
Çizelge 3.54. NDPA belirsizlik hesabında kullanılan değerler	90
Çizelge 3.55. NDPA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplama	90
Çizelge 3.56. NMOR kalibrasyon grafiği verileri	91
Çizelge 3.57. NMOR için kalibrasyon eğrisinin standart sapması	91
Çizelge 3.58. NMOR için residual standart sapma hesabı	92
Çizelge 3.59. NMOR belirsizlik hesabında kullanılan değerler	92
Çizelge 3.60. NMOR kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplama.....	92
Çizelge 3.61. NPYR kalibrasyon grafiği verileri.....	93
Çizelge 3.62. NPYR için kalibrasyon eğrisinin standart sapması	94
Çizelge 3.63. NPYR için residual standart sapma hesabı.....	94
Çizelge 3.64. NPYR belirsizlik hesabında kullanılan değerler	94
Çizelge 3.65. NPYR kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması.....	95
Çizelge 3.66. NPIP kalibrasyon grafiği verileri.....	96
Çizelge 3.67. NPIP için kalibrasyon eğrisinin standart sapması	96
Çizelge 3.68. NPIP için residual standart sapma hesabı.....	96
Çizelge 3.69. NPIP belirsizlik hesabında kullanılan değerler	97
Çizelge 3.70. NPIP kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması.....	97
Çizelge 3.71. NDiBA kalibrasyon grafiği verileri.....	98
Çizelge 3.72. NDiBA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması.....	98
Çizelge 3.73. NDiBA için residual standart sapma hesabı	99
Çizelge 3.74. NDiBA belirsizlik hesabında kullanılan değerler.....	99
Çizelge 3.75. NDiBA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması.....	99
Çizelge 3.76. NDBzA kalibrasyon grafiği verileri	100
Çizelge 3.77. NDBzA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması	101
Çizelge 3.78. NDBzA için residual standart sapma hesabı	101
Çizelge 3.79. NDBzA belirsizlik hesabında kullanılan değerler	101
Çizelge 3.80. NDBzA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması	102

Çizelge 3.81. NDiNA kalibrasyon grafiği verileri	103
Çizelge 3.82. NDiNA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması	103
Çizelge 3.83. NDiNA için residual standart sapma hesabı	103
Çizelge 3.84. NDiNA belirsizlik hesabında kullanılan değerler	104
Çizelge 3.85. NDiNA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması	104
Çizelge 3.86. Kalibrasyon Fonksiyonu Özet Standart Belirsizlik Tablosu.....	105
Çizelge 3.87. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları Özet Belirsizlik Tablosu.....	106
Çizelge 3.88. Tekrar Üretilebilirlik Çalışmaları Özet Standart Belirsizlik Tablosu	106
Çizelge 3.89. Geri kazanım çalışmaları belirsizlik hesaplaması	107
Çizelge 3.90. Geri kazanım çalışmaları özet standart belirsizlik tablosu.....	107
Çizelge 3.91. Ölçüm aletlerinden gelen ölçüm belirsizliği	108
Çizelge 3.92. Belirsizlik değerlendirmesi	109
Çizelge 3.93. Birleştirilmiş ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği	110
Çizelge 3.94. Belirsizliğin Raporlanması.....	111
Çizelge 4.1. NDPA- Sonuç Tablosu.....	114
Çizelge 4.2. NMOR- Sonuç Tablosu	115
Çizelge 4.3. NPYR- Sonuç Tablosu.....	115
Çizelge 4.4. NPIP- Sonuç Tablosu.....	116
Çizelge 4.5. NDiBA- Sonuç Tablosu	117
Çizelge 4.6. NDBzA- Sonuç Tablosu	117
Çizelge 4.7. NDiNA- Sonuç Tablosu.....	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
dk	Dakika
cm ³	Santimetre küp
L	Litre
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
ms	Milisaniye
m	Metre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
m/z	Kütle/yük
S/N	Sinyal/Gürültü
SD	Standart sapma
x _i	Ölçüm sonucu
$\bar{x}$	Ölçüm sonuçlarının ortalaması
n	Ölçüm sayısı
RSD	Bağıl standart sapma
PRSD	Tahmini bağıl standart sapma

C	Kütle fraksiyonu
r	Tekrarlanabilirlik limiti
R_w	Tekrar üretilebilirlik limiti
r^2	Tayin katsayısı
R	Geri kazanım oranı
x_{ref}	Referans değer
U_x	Standart belirsizlik
U_c	Birleştirilmiş standart belirsizlik
U	Genişletilmiş belirsizlik
k	Kapsama faktörü
U_r	Tekrarlanabilirlik belirsizliği
U_{Rw}	Tekrar üretilebilirlik belirsizliği
U_R	Geri kazanım belirsizliği
U_{cal}	Kalibrasyon belirsizliği
S	Kalibrasyon doğrusunun standart sapması
S_R	Geri kazanım standart sapması
S_{xx}	Residual standart sapma
S_r	Tekrarlanabilirlik standart sapması
S_{Rw}	Tekrar üretilebilirlik standart sapması
t_R	Alıkonma süresi
Q1	Hedef iyon
Q2	Tanımlayıcı iyon
eV	Elektron volt
QC	Kalite kontrol
ORT	Ortalama
t	Süre

ppb	Milyarda bir (parts per billion)
M	Molar

Kısaltmalar

ATSDR	ABD Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı
CE	Avrupa Uygunluk İşareti (Conformité Européenne)
CEN	Avrupa Standartlar Komitesi
EEC	Avrupa Ekonomik Topluluğu (European Economic Community)
EC	Avrupa Komitesi (European Community)
EN	Avrupa Standardı
IEC	Uluslararası Elektroteknik Komitesi
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
MDR	Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (Medical Devices Regulation)
GSPR	Genel Güvenlilik ve Performans Şartları
NIST	Uluslararası Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü
GC-MS	Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi/İkili Kütle Spektrometrisi
AET	Analitik Değerlendirme Eşiği
CAS	Chemical Abstracts Service
CMR	Kanserojen, Mutajenik, Reprotoksik
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
EI	Elektron iyonizasyon
SIM	Seçilmiş İyon İzleme (Selected Ion Monitoring)
LOD	Algılama sınırı (tespit edilebilir en düşük değer)
LOQ	Tayin sınırı
NDBA	N-nitrosodibutylamine

NDBzA	N-nitrosodibenzylamine
NDEA	N-nitrosodiethylamine
NDEA-d10	N-nitrosodiethylamine-d10
NDiBA	N-nitrosodiisobutylamine
NDiNA	N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine
NDMA	N-nitrosodimethylamine
NDPA	N-nitrosodipropilamin
NMOR	N-nitrosomorpholine
NMP	N-metilpirrolidon
NPiP	N-nitrosopiperidine
NPYR	N-nitrosopirrolidin
CH ₂ Cl ₂	Dikloro Metan
CH ₃ OH	Metanol
DMF	Dimetilformamid
DMA	Dimetil amin
DMAc	N, N-Dimetilasetamid
HCl	Hidroklorik Asit
K ₂ CO ₃	Potasyum Karbonat
MBT	2-mercaptobenzthiazol
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO ₃	Sodyum Hidrojen Karbonat
NaNO ₂	Sodyum Nitrit
NaOH	Sodyum Hidroksit
PVC	Polivinil klorür
TEA-HCl	trietylamin hidroklorür
TBAB	Tetrabütülamonyum Bromür

1. GİRİŞ

Tıbbi malzemeler sağlık endüstrisi açısından büyük önem arz etmektedir. Tedavi amaçlı olarak kullanılan ve ilaç olarak değeriendirilmeyen (birincil etkisi farmakolojik, immünolojik ve metabolik olmayan) tüm ürünler tıbbi cihaz olarak sınıflandırılmaktadır.

Tıbbi cihazların uygunluk değeriendirme süreçlerinde cihazların biyolojik dokular, hücreler ve vücut sıvıları ile uyumlu olması ve toksisite ile ilgili özelliklerinin değeriendirilmesi gerekmektedir. Bu süreçler tıbbi cihazların biyoyumluluğu olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik değeriendirme, tıbbi cihazların simülasyon ortamında ekstraksiyon prosesinin değerileştirilmesi, ekstrakte edilebilir/süzülebilir madde profillerinin kromatografik ve spektroskopik yöntemler vasıtasıyla çıkartılması ve karşılık gelen toksikolojik risk değeriendirmesi süreçleri ile değerileştirilmesini zorunlu hale getirmiştir.

Tıbbi malzemelerin uygunluk değeriendirme süreçlerinde Avrupa Komisyonunca onaylanmış ve Avrupa Standartlar Komitesi (CEN) tarafından hazırlanmış uyumlaştırılmış bir standart serisi kullanılmaktadır. Tıbbi malzemelerin genel güvenlik gereksinimlerinden biri olan biyolojik değeriendirme için uygulanan standart EN ISO 10993-1'dir. 26.05.2021 tarihinde yürürlüğe giren Tıbbi Cihaz Yönetmeliği ve 2020 yılında revizyona uğrayan EN ISO 10993-1 standartları gereği tıbbi malzemelerin biyolojik değeriendirme süreçlerinde hayvan testlerinden mümkün olduğu sürece kaçınılması gerektiği belirtilmektedir.

Tıbbi cihazların önemli bir bölümü polimer esaslı malzemelerden oluşmaktadır. Polimer esaslı tıbbi malzemelerin biyolojik değeriendirmesini etkileyecek en önemli faktörler polimerizasyon tepkimeleri sırasında kullanılan katalizörler, başlatıcılar, eklentiler ve monomerlerdir. Polimerizasyon tepkimesi sonrası kalıntı olarak tıbbi malzeme üzerinde olması muhtemel bu ürünler tıbbi malzemelerin biyoyumluluğunu olumsuz olarak etkilemektedir. Aynı zamanda, polimer esaslı tıbbi malzemelerin üretilmesi esnasında polimer işleme tekniklerinde (ekstrüzyon, enjeksiyonlu kalıplama) kullanılan proses

sıvıları veya muhtemel kalıntı, kontaminasyonlar da tıbbi malzemelerin biyolojik değerlendirmesini olumsuz olarak etkileyebilecek durumlar olarak öne çıkmaktadır.

N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen maddeler kauçuk veya elastomer bazlı tıbbi malzemelerin biyolojik değerlendirmesinde dikkate alınması gereken, potansiyel sızıntı yapan en önemli maddelerdendir. Bu maddelerin, insanda kanserojen etki yarattığı kanıtlanmış bileşikler olması sebebiyle analizler esnasında tıbbi malzemelerden verimli bir şekilde ekstrakte edilmeleri ve nihai olarak da etkin yöntemlerle analiz edilerek miktarsal tayinlerinin yapılması insan sağlığı açısından hayati önem teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, kauçuk veya elastomer bazlı tıbbi malzemelerden N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen madde analizi yapabilmek amacıyla bir GC-MS metodu geliştirme ve geçerli kılma çalışması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Cihazlar

İnsanlık tarihinin başladığı ilk çağlardan itibaren insanların hastalıklarının tedavisi ve hafifletilmesi için çareler aranmış ve bu arayışlar sonunda, süreçte çeşitli yöntemler üretilmeye devam edilmiştir. Binlerce yıl öncesine ait olduğu tespit edilen cerrahi aletler ve insan bedeninde ve kafataslarındaki cerrahi operasyon izleri, tıbbi malzemeler tarihsel süreçte kullanımının çok eskiye dayandığını düşündürmektedir.

Tıbbi cihazlar insan vücudu içerisinde veya üzerindeki etkisini ilaçlardan farklı olarak farmakolojik, metabolik veya immünolojik etkiler ile sağlamak yerine birincil etkisini fiziksel ya da mekanik olarak göstermektedir. Fakat fonksiyonunu yerine getirirken farmakolojik, immünolojik veya metabolik etkiler tarafından desteklenebilir. Tıbbi cihazlar bir hastalığın, yaralanmanın ya da sakatlığın tahmini, tanısı, takibi, tedavisi veya hafifletilmesi amacıyla kullanılabilir. Bunun haricinde fizyolojik ya da patolojik bir sürecin araştırılması veya modifikasyonu amacıyla, insan vücudundan alınan örneklerin test edilmesinde, gebeliğin önlenmesi ya da desteklenmesinde de tıbbi malzemelerden yararlanılabilir [1]. Bu tanıma göre çok basit bir enjektörden karmaşık bir görüntüleme cihazına kadar pek çok farklı tipte cihaz ve alet tıbbi cihaz olarak nitelendirilmektedir. Tıbbi malzemeler metal, plastik, seramik ve kompozit malzemelerden oluşabilir.

2.2. Avrupa Birliği ve Türkiye’de Tıbbi Cihaz Endüstrisi

Dünya nüfusunun artmasına bağlı olarak kaynakların azalması ve kötü yaşam koşulları sonucunda tedavisi zor ve kronik hastalıkların yaygınlaşması ile birlikte teknolojiye gelişmelerden de faydalanarak küresel ölçekte, ilaç ve tıbbi cihaz sektörü son yıllarda önemli bir endüstri haline gelmiştir. Dünyada tıbbi cihaz sektörünün toplam gelirin 2020 yılı itibarıyla 446 milyar ABD Doları ile en yüksek seviyeye ulaştığı belirtilmiştir [2].

Avrupa Tıbbi Cihaz Teknoloji Endüstrisi Birliği (Medtech Europe)’nin 2023 yılında yayınladığı “Avrupa Medikal Teknoloji Endüstrisi” raporuna göre 160 milyon Avro ile dünya tıbbi teknoloji pazarının yaklaşık %27’sini oluşturan Avrupa Birliği pazarı, ABD’den sonra en büyük ikinci pazar konumundadır. Avrupa Birliği’nde gayri safi milli hasılanın %11’inin sağlık harcamalarına ayrıldığı raporlanmıştır. Yapılan harcamaların %5-10’luk kısmının da tıbbi cihaz teknolojilerine ait olduğu belirtilmiştir. Rapora göre Avrupa Birliği’nde kişi başına düşen tıbbi cihaz harcaması 312 Avro’dur [3].

Bir tıbbi cihazın Avrupa Birliği sınırları içerisinde piyasaya arz edilebilmesi için Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) kapsamında değerlendirilmesi ve uygunluk değerlendirme işlemlerine tabi tutulması gerekmektedir. Ülkemizin Gümrük Birliği anlaşmasına tabi olması ve 2/97 sayılı “Türkiye-Avrupa Topluluğu Ortak Konseyi” kararı uyarınca Avrupa Birliği’nde tıbbi cihazlar için yürürlükte olan regülasyonlar Türkiye’de de uyumlaştırılarak ulusal yönetmelik olarak yayınlanmıştır. Ülkemizde tıbbi cihazların piyasaya arzının Avrupa Birliği hükümlerine tabi olması sebebiyle Avrupa ve Türkiye tıbbi cihaz pazarındaki düzenlemeler ayrı değerlendirilemeyecek olup birlikte ele alınması gerekmektedir [4].

Ülkemizde Türkiye Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı tarafından 2019 yılında yayınlanan ve 2019-2023 yıllarına yönelik On Birinci Kalkınma Planında tıbbi cihazlara ilişkin maddelere de yer verilmiş olup bu plan doğrultusunda sektörde çalışmalar hız kazanmıştır. Plana göre, tıbbi cihazlarda Ar-Ge faaliyetleri, prototip oluşturma çalışmaları, klinik öncesi çalışmalar ve üretim öncesi ve sonrası süreçlerin analizlerinin yapılacağı akredite merkez kurulması kararı alınmıştır. Bu bakışla sektöre yönelik test, belgelendirme ve ruhsatlandırma alanında küresel anlamda bilinirliği olan test ve analiz merkezlerinin geliştirilmesi işaret edilmiştir [5].

Türkiye Sağlık Endüstrisi İşverenleri Sendikası (SEİS) ve Tüm Tıbbi Cihaz Üretici ve Tedarikçi Dernekleri Federasyonu (TÜMDEF) adına Deloitte Danışmanlık A.Ş. tarafından hazırlanıp 2021 yılında yayınlanan “Sağlığın dinamosu: Türkiye Tıbbi Teknoloji ve Cihaz Sektörü” konulu raporda ülkemiz tıbbi malzeme sektörü pazar büyüklüğünün 2,4 milyar ABD Doları ile dünya pazarında %0,6’lık bir hacmi olduğu

belirtilmiştir. Aynı raporda Türkiye’de üretici, dağıtıcı ve ithalatçı olmak üzere 11.000’den fazla firmanın tıbbi malzeme sektöründe faaliyet gösterdiği belirtilmiştir [6]. Ülkemizde T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından 2022 yılında “Akıllı Yaşam ve Sağlık Ürün ve Teknolojileri Yol Haritası” adlı bir rapor yayınlanmış ve bu rapora göre sektörün durumu aşağıdaki şekilde açıklanmıştır [2].

- 2020 yılı ülkemizdeki tıbbi malzeme ithalatının 934 milyon ABD Doları, tıbbi malzeme ihracatının ise 2,1 milyar ABD Doları olduğu raporlanmıştır. 2020 yılı itibariyle yaklaşık 2.300 ithalatçı ve 1.000 üretici tıbbi malzeme firması mevcuttur. Buna karşılık ihracat oranında 2005-2020 yılları arasında %16’lık bir büyüme olmasına rağmen pazarın %84’ünü ithalatın oluşturduğu belirtilmiştir.
- İç piyasa taleplerinin karşılanması noktasında ithalata bağlı olunması sebebiyle ihracatı ve üretimi artıracak stratejik tedbirler alınması büyük önem arz etmektedir.
- Ülkemizde en çok ithal edilen tıbbi malzemeler cerrahi eldivenler, şırıngalar, cerrahi el aletleri ve kataterler olarak belirtilmiştir.
- Pazarın en büyük kısmı dental ürünler ve sarf malzemelerden oluşmaktadır.

Bunlara ek olarak yayınlanan yol haritasında, kimyasal karakterizasyon testlerinin yapılacağı laboratuvar çalışmalarına T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından verilecek destekler de açıklanmıştır. Buna göre, mevcut ön-klinik ve biyouyumluluk testlerinin yapıldığı laboratuvarların akredite değilse akredite olması ve CE sertifikasyon şartlarını sağlayacak yerli tıbbi cihaz test merkezlerinin kurulması gibi konularda ilgili Bakanlıkların bir araya gelerek sektör temsilcilerine destekte bulunacakları belirtilmiştir.

Tıbbi malzemeler, T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı’nın önemli bir projesi olan “Teknoloji Odaklı Sanayi Hamlesi” programında da teşvik edilecek ürünler kapsamına alınmıştır. Programa göre kemiklerin tedavisinde kullanılan çimentolar, kontakt lensler, tıpta kullanılan şırıngalar, cerrahi dikiş iğneleri, idrar sondası, damar içi kataterler, kalp kapakçıkları, suni uzuvlar gibi daha pek çok ürün destek kapsamına alınmıştır [7].

Yukarıda belirtilen stratejik planlar, politikalar, yapılan yol haritaları ve verilen destekler tıbbi malzemelerin MDR gereklerine uygun üretilmesinin ne denli önemli olduğunu gösterirken uygunluk değerlendirme aşamasında biyolojik değerlendirmede kimyasal karakterizasyon işleminin de zorunlu olacağı ve Onaylanmış Kuruluşlar tarafından bu konunun üzerinde durulacağı açıktır.

2.3. Tıbbi Cihaz Yönetmeliği

Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) 26 Mayıs 2021 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Bir ürünün Avrupa Birliği sınırları içerisinde piyasaya arz edilebilmesi için MDR kapsamında değerlendirilmesi ve uygunluk değerlendirme işlemlerine tabi tutulması gerekmektedir. MDR yönetmeliğine uyum sağlamak için gerekli işlemler teknik dokümantasyon hazırlama, tıbbi cihaz üzerinde gerekli muayene ve testlerin gerçekleştirilmesi (biyoyumumluluk ve performans gerekleri açısından), klinik araştırma, piyasaya arz sonrası klinik takip ve belgelendirme işlemlerinden oluşmaktadır. MDR kapsamındaki tıbbi cihazların piyasaya arz edilebilmeleri için temel güvenlik ve performans şartlarının yerine getirilerek tıbbi cihaz üzerinde ilgili muayene ve testlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

2.4. Tıbbi Cihazlarda Genel Güvenlilik ve Performans Şartları

Usulüne uygun olarak temin edildiğinde, talimatlara uygun kurulduğunda, bu talimatlara göre bakımları yapıldığında ve kullanım amacına uygun şekilde kullanıldığında Tıbbi Cihaz Yönetmeliği Madde 5’de belirtilen Genel Güvenlilik ve Performans Şartları (GSPR)’nı sağlayan cihazlar piyasaya arz edilebilir [1]. Bu gereklilikler, Genel Güvenlik ve Performans Gereklilikleri (GSPR) olarak adlandırılmakta olup Yönetmeliğin Ek-1’inde detaylıca açıklanmaktadır. Buna göre:

- Tıbbi cihazlar amaçlanan performanslara uygun üretilmeli ve kullanacak kişilerin sağlığını ve güvenliğini tehlikeye atmamalıdır.
- Fayda-risk oranının olumsuz etkilenmemesi koşuluyla riskler olabildiğince azaltılmalıdır.
- Üreticiler bir risk yönetim planı kurmalı ve uygulamalıdır.

- Tıbbi cihaz normal kullanım talimatları uyarınca normal kullanım koşullarında oluşabilecek zorlamalara tabi tutulduğunda kullanım ömrü süresince kullanıcının sağlık ve güvenliğini tehlikeye atmamalıdır.
- Cihazlar, üreticileri tarafından verilen talimat ve bilgiler ışığında nakledilmesi ve depolanması sırasında öngörülen kullanım süresinde karakteristikleri ve performansları etkilenmeyecek şekilde tasarlanmalı, üretilmeli ve ambalajlanmalıdır.
- Öngörülebilir ve bilinen tüm riskler/yan etkiler en aza indirgenmeli ve kullanıcıya faydaları ile kıyaslandığında kabul edilebilir olmalıdır.

Yönetmelik kapsamındaki genel güvenlik gereklerinin en önemlilerinden bir tanesi tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesidir. Bir tıbbi cihazın Genel Güvenlilik ve Performans Şartlarına uygunluğunun tespiti için cihazların kullanıcıları ile biyoyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.5. Tıbbi Cihazların Biyoyumluluk Değerlendirmesi

Biyoyumluluk, tıbbi cihazlar için dikkate alınması gereken başlıca sonlanım noktalarından biridir. Tıbbi Cihaz Yönetmeliği'nin (MDR) Genel Güvenlik ve Performans Gereklilikleri (GSPR) uyarınca tıbbi cihazlarda kullanılan maddeler ile cihaz kullanıcılarının biyolojik doku ve hücreleri arasındaki uyumluluğun sağlanması için üreticiye biyoyumluluk değerlendirmesi yapma zorunluluğu getirilmektedir. Biyoyumlulukla ilgili gereklilikler ise Genel Güvenlik ve Performans Gerekliliklerinin 10. maddesinde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu bağlamda MDR'nin biyolojik değerlendirmeye dayalı gerekliliklerinin karşılanması için EN ISO 10993-1, EN ISO 10993-17 ve EN ISO 10993-18 uyumlaştırılmış standartları kullanılmaktadır. Söz konusu standartların temel amacı tıbbi cihaz kullanıcılarının korunmasıdır. Test hayvanlarının gereksiz kullanımının önlenmesini amaçlayan hayvan refahı ise standartların hedef aldığı ikincil ögedir [8].

Belirli limitlerin üzerinde toksikolojik risk içermeyen tıbbi cihazlar biyoyumlu tıbbi cihazlar olarak tanımlanabilir. Başka bir ifadeyle, tıbbi cihazların piyasaya arz edilebilmesi için cihazların biyolojik değerlendirmesinin uygun olarak sonuçlandırılması

gerekmektedir. Cihazda bulunan veya cihazdan salınan maddeler ile vücut hücreleri/ dokuları/ sıvıları arasında gerçekleşen etkileşimler tıbbi cihazlara ilişkin toksikolojik risk değerlendirmesinde önem arz etmektedir [9]. Özütlenebilir madde profilleri sonrasında gerçekleştirilen toksikolojik risk değerlendirme süreci sonunda bir şüphe tespit edilmişse biyolojik değerlendirme olumsuz olarak sonuçlanmakta veya deney hayvanları üzerinde biyolojik değerlendirme sonlanım noktalarına göre testlerin gerçekleştirilmesi sürecine geçilmektedir.

2.5.1. Tıbbi Cihazlarda Kimyasal Karakterizasyon

MDR kapsamında tıbbi cihaz üreticileri, hayvan testlerinden önce cihazları kimyasal karakterizasyon bağlamında test etmek veya ettirmekle yükümlüdür. Kimyasal karakterizasyon testleri malzeme tanımlama, yapısal, termal ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi ile ekstrakte edilebilir ve süzülebilir madde analizinden oluşmaktadır. Ekstrakte edilebilir ve süzülebilir madde profilinin çıkarılmasının ardından yapılacak olan toksikolojik analiz biyolojik değerlendirmenin temel parçasıdır.

Polimer esaslı tıbbi cihazlardan süzülebilecek maddeler büyük çoğunluğu organik esaslı maddelerdir. Süzülebilir madde profilleri sonrası madde miktarlarının tespit edilme yöntem ve metotları EN ISO 10993-18 standardında belirtilmiştir. Bu standardın son revizyonları bağlamında süzülebilir madde profillerinin yarı kantitatif metotla tespiti ile ilgili detaylandırmalar bulunmaktadır. Polimer esaslı tıbbi cihazlardan süzülebilecek maddelerin tahmin edilememesi durumunda kantitatif/hedef analizlerin uygulanamaması hususu tıbbi cihazların biyolojik değerlendirme süreçlerinin yarı-kantitatif metotla yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Ancak, biyolojik değerlendirmeyi olumsuz olarak etkileyebilecek ve söz konusu polimer esaslı tıbbi cihazdan süzülmesi beklenen ve polimer sanayisinde sıklıkla kullanılan eklenti, katalizör, başlatıcı gibi toksik maddelerin analizinin kantitatif/hedefli analiz yöntemleriyle gerçekleştirilmesi önem arz etmektedir.

2.6. Ekstrakte Edilebilir ve Süzülebilir Madde Analizi

Ekstrakte edilebilir ve süzülebilir madde analizleri bir anlamda in-vitro simülasyon testleridir. Ekstrakte edilebilirlik çalışmaları tıbbi cihazlar için en kötü durum

senaryosunu temsil etmelidir. Öyle ki bu çalışmalardan elde edilen ekstrakte edilebilir maddelerin derişimleri normal klinik koşullarda elde edilen sızıntı maddelerden önemli ölçülerde daha yüksektir [10]. Öte yandan, süzülebilirlik çalışmaları, cihazın klinik kullanımının simülasyonuna dayanmaktadır. Aslında, ekstrakte edilebilir ve süzülebilir maddelerin analizi temelde aynı perspektife dayanmakla birlikte bu çalışmalar arasındaki farklar, çalışmalardan elde edilen maddelerin türleri ve miktarları nedeniyle ortaya çıkmaktadır [10].

Vücutla uzun süreli teması bulunan tıbbi cihazlarda ekstrakte edilebilir madde analizi çalışmalarında uygulanacak ana prensip kapsamlı bir ekstraksiyon yapmaktır. Özellikle implante edilebilir cihazlar için bu çalışmalarda farklı polaritelere sahip en az iki çözücü uygulanmalıdır [10]. Ekstrakte edilebilir ve süzülebilir çalışmaların tasarımları bağlamında ekstraksiyon adımlarının koşulları arasındaki fark (genel olarak kabul edilen yol simüle edilmiş kullanıma yönelik ekstraksiyon adımının uygulanmasıdır) nedeniyle ekstraksiyon çalışmasından tüm süzülebilirlerin elde edilemeyeceği gerçeğine dikkat edilmelidir [10]. Başka bir deyişle, simüle edilmiş kullanım koşulları belirli durumlarda ekstrakte edilebilir çalışmalarla temsil edilememektedir ve bu durum, farklı konsantrasyonlara sahip farklı maddelerin ekstrakte edilebilir ve süzülebilir madde analizleri yoluyla geri kazanılmasının temel esasını oluşturmaktadır.

Ekstrakte edilebilir ve süzülebilir maddelerin analizi, potansiyel süzülebilirlerin belirlenmesi bağlamında başta GC-MS ve LC-MS/MS olmak üzere çeşitli kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilir. Ekstrakte edilebilen maddelerin kromatografik analizlerle tespit edilmesinde maddelerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla yarı kantitatif analiz yaklaşımı uygulanmaktadır. Yarı kantitatif analiz, kullanılan iç standardın yanıtının ve derişiminin kıyaslama noktası olarak seçilerek miktarı bilinmeyen maddelerin miktarının belirlendiği bir yaklaşıma dayanır. Burada tanımlama, cihazın MS spektrumunun NIST-MS kütüphanesinde bulunan referans malzemelere ait spektrumlarla karşılaştırılması ve eşleştirilmesi yoluyla yapılır. Fakat yarı kantitatif analizlerde yaşanabilecek dezavantajlar aşağıda üç madde halinde listelenmiştir [11].

- Kapsamdaki eksiklikler
- Bilinmeyen maddelerin tanımlanması noktasında karşılaşılan bazı zorluklar
- Miktersal tayinin tam anlamıyla yapılamaması

Bu maddelerden ilki, tıbbi cihazlara uygulanacak test prosedürlerinin somut bir standart ile sağlanamaması ile ilgilidir. Fakat EN ISO 10993-18 standardında, ekstrakte edilebilir ve süzülebilir çalışmalar için uygulanabilecek kromatografik metotlar kapsamında numune hazırlama için yol gösterilmektedir. Numune hazırlama adımı ekstraksiyon işleminin en önemli adımlarından biridir. Bu aşamada meydana gelebilecek herhangi bir hata, sonuçta elde edilecek potansiyel süzebilen madde miktarında kayba neden olmaktadır. Örneğin numuneye uygun polaritede olmayan çözücü kullanımı nedeniyle verimsiz ekstraksiyon, ekstraksiyon sıcaklıklarının optimum koşullardan yüksek olması nedeniyle sızıntı maddelerinin termal bozunması gibi durumlar numune hazırlamanın önemini göstermektedir. Süzulebilen maddelerin derişimini etkileyen parametreler çözücüler, ekstraksiyon prensipleri ve ekstraksiyon koşullarıdır.

Literatürdeki ve mevcut standartlardaki bilgi eksikliği, doğrulanmış kimyasal karakterizasyona dayalı test yöntemlerinin oluşturulması açısından, test laboratuvarları arasında uyum sağlanmasını engellemektedir. Ayrıca, hedefe yönelik olmayan metot geliştirme için aday iç standartların seçimi ile birlikte numune büyüklüğünün belirlenmesi, hedefe yönelik olmayan analiz amaçları açısından oluşturulan test prosedürleri arasında uyumu sağlamayan diğer önemli dezavantajdır.

İkinci sınırlama ise bilinmeyen maddelerin tanımlanması sırasında karşılaşılan zorluklardır. Bilinmeyen madde tanımlaması, maddenin MS spektrumunun MS kütüphanesinde bulunan referans malzemelerle karşılaştırılması yoluyla yapılır. Süzulebilen madde spektrumu ile en yüksek oranda eşleşen spektrumlar analiz edilir ve bu spektrumlar arasından tanımlama yapılır. Bazı durumlarda söz konusu maddenin spektrumuyla eşleşen çok sayıda spektrum bulunur. Bu durumda çok sayıda bilinmeyen madde olması, analizde bir belirsizlik yaratmaktadır. Ayrıca MS NIST kütüphanesi birbirine benzer yapıda olan maddeleri ayırt etmekte yetersiz kalabilmektedir [11].

Üçüncü kısıt ise miktar tayini yaparken doğabilecek eksiklerden kaynaklanmaktadır. Miktar tayini iç standardın yanıtına ve derişime göre doğru orantı ile gerçekleştirilir. Esas amaç yanlış negatif durumları elimine ederek hata payını düşürmektir. Bu amaçla, AET (analitik değerlendirme eşiğı) seviyesi belirsizlik faktörü ile azaltılarak toksikolojik risk değerlendirme aşamasına yönlendirilen bilinmeyen maddelerin sayısı azaltılır. Organik ekstrakte edilebilir maddelerin bağıl cevap faktörlerindeki farklılıklar nedeniyle bilinmeyen maddelerin miktarının belirlenmesinde yanlış pozitif sonuçlar gözlenmektedir.

Tıbbi cihazlardan süzülebilen N-nitrozaminler ve N-nitrozlanabilen maddelerin nicel analizi için ekstraksiyon adımının kritik olduğı belirli test prosedürleri vardır. Bu test prosedürleri EN 12868, EN 71-12 ve ISO 29941 standartlarında detaylandırılmıştır.

- EN 12868, elastomer veya kauçuk emziklerden N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen maddelerin ekstraksiyonu ve analizi için oluşturulmuş özel bir standarttır [12].
- EN 71-12, özellikle doğal kauçuk, sentetik kauçuk ve kürlenmiş silikonlar dahil olmak üzere elastomerlerden yapılmış oyuncaklardan N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen maddelerin ekstraksiyonu ve analizi için oluşturulmuş özel bir standarttır [13].
- ISO 29941, doğal kauçuk lateks prezervatiflerden N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen maddelerin ekstraksiyonu ve analizi için oluşturulmuş özel bir standarttır [14].

N-Nitrozaminler ve N-nitrozlanabilen maddeler için özel olarak oluşturulmuş test metodları ile EN ISO 10993-18'de yarı kantitatif analiz yaklaşımına ilişkin olarak verilen test metodu arasında önemli sapmalar vardır. EN ISO 10993-18 standardı, ekstraksiyon adımında EN ISO 10993-12 standardını refere etmektedir. Tıbbi cihazların ekstraksiyonu, uygulanan koşulların EN ISO 10993-12'de verilen prosedürlerle uyumlu olması şartıyla, Soxhlet, çalkalamalı balon, geri akış altında kaynatma vb. ilkeler dahil olmak üzere geleneksel ekstraksiyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Yarı kantitatif yaklaşımda kullanılan ekstraksiyon koşulları Çizelge 2.1'de verilmiştir [15, 10].

Çizelge 2.1. Yarı kantitatif yaklaşım için uygulanan ekstraksiyon koşulları

Ekstraksiyon Sıcaklığı, °C	Ekstraksiyon Süresi, saat	Ekstraksiyon Prensipleri	Tıbbi Cihaz	Ekstraksiyon Ortamı
37 ±1	24 ±2	Simüle edilmiş kullanım koşullarında çalkalama ile	Sınırlı temaslı tıbbi cihazlar	-polar -yarı polar -apolar çözücüler
37 ±1	72 ±2	Kapsamlı ekstraksiyon prensipleri	Uzun süreli temaslı tıbbi cihazlar	-polar -yarı polar -apolar çözücüler
50 ±2	72 ±2			
70 ±2	24 ±2			
121±2	1 ±0,1			

EN ISO 10993-18'de verilen ekstraksiyon koşulları ve yöntemleri maddeye özgü olmamakla birlikte net bir çerçeve çizmez. Öte yandan, EN 12868 ve EN 71-12'de verilen ekstraksiyon yöntemleri EN ISO 10993-18'de verilen test metodlarından önemli ölçüde farklıdır. Bu farklar temelde ekstraksiyon ortamı ve ekstraksiyon prensiplerine dayanmaktadır. Elastomer ve kauçuk bazlı oyuncaklar, biberonlar ve emziklerde N-Nitrozamin ve N-Nitrozlanabilen maddeler için standartlarla belirlenmiş ekstraksiyon prensipleri aşağıda listelenmiştir [12, 13]:

- Ekstraksiyon ortamı olarak sodyum hidrojen karbonat, sodyum klorür, potasyum karbonat ve sodyum nitrit kullanılarak hazırlanan yapay tükürük çözeltisi kullanılır.
- Ekstraksiyon sıcaklığı 40±2 °C olarak ayarlanır.
- Ekstraksiyon süresi oyuncaklar için 240±5 dk, emzik ve biberonlar için 24±0,5 saattir.
- N-nitrozlanabilen bileşiklerin N-Nitrozaminlere dönüştürülmesi için ekstraktlara nitrozlama aşaması uygulanır. Hidroklorik asit ve sodyum nitrit, N-Nitrozlanabilen bileşikleri nitrozlama reaksiyonları için gerekli kimyasallardır.
- Ekstraksiyon kolonları ve diklorometan çözücüsü kullanılarak katı faz ekstraksiyon adımı uygulanır.
- Ekstrakttaki N-Nitrozaminlerin ışıkla bozulmasını önlemek için özel dikkat gösterilir.

Ekstraksiyon adımı sırasında N-Nitrozamin ve N-Nitrozlanabilen bileşiklerin analizinde dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda belirtilmiştir:

- N-nitrozlanabilen maddeler NO_x yapısının varlığında N-nitrozamin maddelerini oluşturma eğilimine girer [16]. Bu bağlamda N-nitrozlanabilen maddeler N-nitrozaminlerin öncüsü kabul edilirler ve bu sebeple en az N-nitrozaminler kadar toksikolojik risk taşırlar. N-nitrozlanabilen maddeler ikincil veya üçüncül amin yapılarına sahip maddelerdir ve hedef alınan tüm nitrozlanabilen maddelerin analizi mümkün değildir. Bu nedenle ekstraksiyon ortamında bulunan N-nitrozlanabilen maddelerin öncelikle reaksiyona sokularak N-nitrozamin bileşiklerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Nitrozlama reaksiyonunu başlatmak için ekstrakta sodyum nitrit ve hidroklorik asit ilave edilmelidir.
- N-nitrozaminlerin güneş ışığında parçalanma reaksiyonu verdiği göz önünde bulundurularak [17, 18] numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemi dahil tüm aşamalarda Nitrozaminlerin fotolizini önlemek amacıyla amber şişeler kullanmak, cam numune kaplarını alüminyum folyo ile sarmak gibi tedbirler alınmalıdır [12].

N-nitrozlanabilen ve N-nitrozamin bileşiklerini analiz etmek üzere yapılan ekstraksiyon işleminde maddelerin doğası gereği yaşanan bu gibi zorluklar nedeniyle hedeflenmemiş analiz ilkelerine (EN ISO 10993-12 ile entegre edilmiş EN ISO 10993-18) uygun olarak gerçekleştirilememiştir. Vulkanizasyon işlemine tabi tutulmuş elastomer ve kauçuklardan oluşan ve/veya blister ambalajlarla paketlenmiş tıbbi cihazlar için hedefe yönelik olmayan analizlerin uygun olmadığı görülmektedir. Söz konusu maddelerin kanserojen, mutajenik veya üreme için toksik (CMR) olması sebebiyle de daha spesifik bir hedefli analiz ilkesine göre analiz edilmesi son derece önem arz etmektedir.

2.7. Nitrozamin ve Nitrozlanabilir Maddeler Hakkında Genel Bilgi

İnsanlar çok eski zamanlardan beri yiyecekler (özellikle işlenmiş et ürünleri), içecekler (viskiler ve biralara vs.), bazı kozmetikler, sigara dumanı, tarım kimyasalları (böcek ilaçları vs.), egzoz dumanı ve kauçuk ürünler gibi çeşitli kaynaklar yoluyla nitrozaminlere maruz kalmaktadır [19].

Nitrozaminler yüksek riskli mutajenik kanserojenler olarak sınıflandırılmış olup pek çok kaynaktan aflatoksin ve azo bileşikleriyle birlikte “endişe grubu” (cohort of concern-CoC) olarak kategorize edilmiştir [20]. Nitrozaminler, ikincil veya üçüncül aminlerin sodyum nitrit (NaNO_2) ve NO_x gibi nitrozlama ajanlarıyla reaksiyonu yoluyla oluşur. İkincil veya üçüncül amin fonksiyonel grubuna sahip maddeler ise nitrozlanabilen maddeler olarak adlandırılır [21]. Nitrozaminlerin oluşumu ve kullanım alanlarına yönelik yapılan literatür taraması aşağıda listelenmiştir:

- Kauçuk ürünlerinin nitrozamin yükünü artırdığına dair ilk işaret, çeşitli kauçuk endüstrisi fabrikalarının hava ölçümlerinde değişen seviyelerde N-nitrosodimetilamin (NDMA) tespit eden Fajen ve arkadaşlarının (1979) çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. Amerika’da o yıllarda kauçuk sektöründe çalışan fabrika işçilerinde çeşitli kanser türlerinin kayda değer şekilde artmasıyla kauçuk ürünlerinde var olan nitrozlu bileşiklerinin kansere etkileri tartışılmaya başlanmıştır [22].
- Dimetilformamid (DMF), N, N-Dimetilasetamid (DMAc) ve N-metilpirrolidon (NMP) hidrolitik ve ısı koşulları altında ikincil amin kaynağı gibi davranır. Bu ortam nitrozlaştırıcı ajanların varlığında nitrozamin oluşumuna yatkındır [21].
- DMAc, ilaç sentezinde reaksiyon ortamı olarak, polimer sentezinde katalizör ve çözücü olarak, poliakrilonitril, polivinil klorür, polyamid, selüloz türevleri, stirenler ve lineer polyesterler gibi polimerler için lif ve film üretiminde kullanılmaktadır [23].
- NMP ilaç sentezinde, polimer sentezinde (PVC’de spinning ajanı olarak), tekstil ve metal kaplı plastiklerin yüzey işlemlerinde en çok kullanılan çözücülerden biridir [24]. DMAc ve NMP’deki amid yapısı ($[\text{C}=\text{O}]\text{NR}_1\text{R}_2$) nedeniyle, hidroliz ve ısı, amid yapısını nitrozlaştırıcı ajanların (NO_x) varlığında ikincil amine dönüştürür.
- Üretim sürecinin DMF ortamında gerçekleştirilmesi durumunda potansiyel olarak nitrozlanabilir madde kalıntısının varlığına duyarlı olan poliakrilonitriller, biyomedikal hidrojel üretiminde kullanılmaktadır [25].
- Nitrozlanabilir madde olarak kabul edilen tersiyer aminlerin fonksiyonel grubunu içeren trietilamin hidroklorür (TEA-HCl), NO_x yapıları maddelerin varlığı altında

nitrozamin oluşturan kaynaklardan biridir. TEA-HCl, alifatik polikarbonatların (biyomalzeme uygulamalarında kullanılan) polimerizasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmaktadır [26].

- Kuaterner amin fonksiyonel grubu içeren Tetrabütilamonyum Bromür (TBAB), nitrozlanabilir madde olarak kabul edilmektedir [27]. TBAB, tıbbi uygulamalarda kullanılan malzemelerin üretiminde katalizör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [28].
- 2-nitropropan polimerlerin üretiminde [29] kullanılırken, nitrometan farmasötiklerin sentezinde [30] yaygın olarak kullanılmaktadır. 2-nitropropan ve nitrometan, nitro (-NO₂) fonksiyonel grubuna sahip olmaları sebebiyle nitrozlama ajanları olarak sınıflandırılırlar [21].
- 2-mercaptobenzthiazol (MBT) ve karbamatlar kauçuk ve lateksin vulkanizasyon sürecinde yaygın olarak kullanılan hızlandırıcılardır [31] ve sırasıyla ikincil amin ve üçüncül amin fonksiyonel gruplarına sahiptir. Bu sebeple nitrozlanabilir madde olarak işlev görürler.
- Blister ambalajlar ilaçların ve tıbbi cihazların paketlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Blister ambalajdaki kapak folyolarında bulunan baskı mürekkebinde genellikle dimetilamin ve dietilamin kullanılmaktadır. Bu ikincil aminler nitrozlanabilir madde olarak işlev görür. Paketleme işlemi sırasında 180°C civarında sıcaklığa maruz kalmak nitrojen oksitlerin oluşumunu tetikler ve daha sonra baskı mürekkebinde bulunan ikincil aminlerle reaksiyona girerek nitrozamin oluşumuna neden olur [21, 32].
- Şebeke suları bol miktarda dimetil amin (DMA) içerir [21, 33]. DMA kaynakları endüstriyel emisyonlardan, hayvancılıktan, araçlardan ve okyanuslardan kaynaklanan emisyonlar sebebiyle oluşmaktadır [34, 35]. Sudaki yüksek çözünürlüğü nedeniyle, dimetil aminin şehir sularında bulunması sıkça rastlanan bir durumdur. Öte yandan kloramin, dezenfeksiyon amacıyla suyun arıtılmasında kullanılmaktadır. Şebeke suyunda DMA ve kloraminin aynı anda bulunması, yan ürünlerinden biri nitrozamin (NDMA) türü olan reaksiyonla sonuçlanır [21, 33]. Bu bağlamda, suyun yardımcı madde olarak kullanıldığı hemodiyaliz çözeltileri gibi tıbbi cihazlar nitrozamin varlığı açısından risklidir.
- Vulkanizasyon işlemine tabi tutulan kauçuk ve lateks bazlı polimerik tıbbi cihazlar, nitrit ve nitratların varlığında nitrozaminlerin öncüsüdür. Tükürükte

nitrit ve nitrat bulunurken [36], seminal plazmada da nitrit bulunur [37]. Bu nedenle, tükürük ve seminal plazma ile temas eden kauçuk ve lateks bazlı tıbbi cihazlar nitrozaminleri vücuda sızdırmaya yatkındır. Dolayısıyla, vulkanizasyon işlemi uygulanan eldivenler ve kondomlar, nitrozamini vücuda salabilecek tıbbi cihazlar olarak sınıflandırılır [31, 21].

- N-nitrosodibutylamine (NDBA), N-nitrosodiisononylamine (NDiNA), N-nitrosodibenzylamine (NDBzA), N-nitrosodimethylamine (NDMA) ve N-nitrosodiethylamine (NDEA) maddeleri elastomer veya kauçuktan üretilen kondomlarda bulunma olasılığı olan N-nitrozaminlere örnektir [14].

Görüldüğü üzere nitrozamin pek çok alanda kullanılmakla birlikte Nitrozaminlerin kullanımı kısıtlanmış ve varlıkları belirli miktarlarla sınırlandırılmıştır. Nitrozlanabilen maddelerin ve nitrozaminlerin göç limitleri belirli ürün gruplarında ilgili standartlarda verilmiştir:

- EN 71-12 standardı elastomer oyuncaklardan göç limit değerlerini aşağıdaki gibi belirlemiştir [13]:
 - Ağza yerleştirilmesi amaçlanan/muhtemel olan ve 36 aydan küçük çocuklar tarafından kullanılması amaçlanan oyuncaklar için N-nitrozamin limiti 0,01 mg/kg, nitrozlanabilen madde limiti 0,1 mg/kg
 - 36 aydan küçük çocuklar tarafından kullanılması amaçlanan ve ağza yerleştirilmesi amaçlanmayan oyuncaklar için N-nitrozamin limiti 0,05 mg/kg, nitrozlanabilen madde limiti 1 mg/kg
 - Ağza yerleştirilmesi amaçlanan/muhtemel olan ve 36 aydan büyük çocuklar tarafından kullanılması amaçlanan oyuncaklar için N-nitrozamin limiti 0,05 mg/kg, nitrozlanabilen madde limiti 1 mg/kg
 - Balonlar için N-nitrozamin limiti 0,05 mg/kg ve nitrozlanabilen madde limiti 1 mg/kg
- EN 71-12 standardı parmak boyalarında göç limitlerini N-nitrozaminlerin için 0,02 mg/kg ve nitrozlanabilen maddeler için 1 mg/kg olarak belirlemiştir [13].

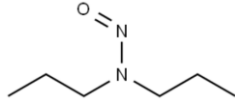
- Elastomer veya kauçuk bazlı emzik ve biberonlarda N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilen maddelerin göç limiti 93/11/EEC sayılı Avrupa Direktifi ile sırasıyla 0,01 mg/kg ve 0,1 mg/kg olarak belirlenmiştir [38, 39].

Oyuncaklar ve tıbbi cihazların hammadde ve üretim süreçlerinin birbirinin aynı olması sebebiyle aralarında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Polimer bazlı hammaddeler ile ekstrüzyon/enjeksiyon kalıplama gibi polimer işleme teknikleri oyuncaklar ve polimer bazlı tıbbi cihazlar için benzerdir. Ayrıca, elastomer ve kauçuk bazlı tıbbi cihazlar ve oyuncaklar, toksikolojik risk anlamında önemli bir girdi oluşturan N-nitrozamin ve N-nitrozlanabilir maddeleri doğal olarak içerebilir.

2.7.1. N-nitrosodipropilamin (NDPA)

N-nitrosodipropilamin kaynaklı sağlık risklerine ilişkin çalışmaların ağırlıklı olarak karaciğer toksisitesi, kanser ve ölüm konularında olduğu tespit edilmiştir. US Department of Health and Human Services Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)'in 2019 yılında yayımladığı “Toxicological Profile for N-Nitrosodi-n-Propylamine” raporuna göre akut süreli maruziyetin ardından laboratuvar hayvanlarında karaciğer hasarı kanıtları gözlemlendiği görülmektedir. Hayvanlara orta süreli oral maruziyet uygulanmasını takiben mide, burun, akciğer ve karaciğer tümörleri gözlenmiştir. Kanser ve ölüm ağırlıklı çalışmaların haricinde NDPA maruziyeti kaynaklı vücut ağırlığının düşmesi ile ilgili de birkaç çalışma raporlanmış olup inhalasyon, oral veya dermal maruziyetin ardından insanlarda veya hayvanlarda solunum, kardiyovasküler, gastrointestinal, hematolojik ve kas-iskelet sistemleri ile ilgili herhangi bir çalışma raporlanmamıştır [40]. N-nitrosodipropilamin özellikleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

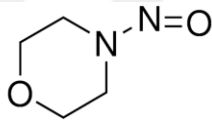
Çizelge 2.2. N-nitrosodipropilamin özellikleri

Madde	N-nitrosodipropilamin		Kaynak
Kısa Adı	NDPA		
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	N, N-dipropylnitrous amide		
Molekül Formülü	C ₆ H ₁₄ N ₂ O		[41]
CAS Numarası	621-64-7		
EC Numarası	210-698-0		
Sinonimleri	di-n-propylnitrosamine		
	N, N-dipropylnitrosamine		
	N-nitroso(di-n-propyl) amine		
	N-nitroso-N-propyl-1-propanamine		
	n-Nitrosodi-n-propylamine		
	N-nitrosodipropylamine		
Molekül Ağırlığı	130.19 g/mol		[42]
Fiziksel Özelliği	Berrak soluk sarı, sıvı		[42]
Kaynama Noktası	206 °C		[42]
Çözünürlük	Suda çok az çözünür (%1) Organik çözücülerde çözünür		[43]
Yoğunluk	0.9163 g/cm ³ at 20 °C		[42]
Stabilite	Oda sıcaklığında, karanlıkta, nötr ortamda veya alkali sulu çözeltilerde 14 günden fazla stabildir. Asidik çözeltilerde aynı şartlarda biraz daha az stabildir. Işığa, özellikle ultraviyole ışığa karşı duyarlıdır.		[44]
Tehlike Sınıflandırması		İrritasyon: Yutulması halinde akut toksisite	[45]
		Ciddi Sağlık Riski: Kansere neden olabilir (Kanserojenite: 2B: muhtemel)	
		Çevresel Risk: Uzun süreli etkilerde sucul yaşam için toksik	

2.7.2. N-nitrosomorpholine (NMOR)

NMOR, karaciğerde, burun ve ağız boşluklarında ve akciğerlerde yüksek oranda tümöre neden olan belirgin derecede etkili bir kanserojendir [46]. NMOR, birincil ve ikincil atık su çıkışlarında en bol bulunan nitrozamin olarak raporlanmıştır. Geri dönüştürülmüş suyun NMOR ile kirlenmesi, suyun içme amaçlı kullanılması durumunda oluşabilecek sağlık riskleri nedeniyle endişe verici olarak görülmektedir [47, 48]. Yapılan çalışmalarda NMOR'un kimyasal kararlılığı, düşük moleküler ağırlığı ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle içme sularından arıtılmasının diğer nitrozaminlere göre daha zor olduğu görülmektedir [49]. Bunun yanı sıra, NMOR'un yapısında bulunan heterosiklik bir bileşik olan MOR'un, N ve O elektrofilik halkaları nedeniyle biyolojik arıtma sürecinde biyolojik olarak parçalanmasının da zor olduğu belirtilmiştir. NMOR'un genel özellikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

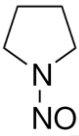
Çizelge 2.3. N-nitrosomorpholin özellikleri

Madde	N-nitrosomorpholin		Kaynak
Kısa Adı	NMOR		[50]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	4-nitrosomorpholine		
Molekül Formülü	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂		
CAS Numarası	59-89-2		
EC Numarası	627-564-6		
Sinonimleri	Nitrosomorpholine		
	Morpholine, 4-nitroso-		
	4-nitrosomorpholine		
Molekül Ağırlığı	116.12 g/mol		
Fiziksel Özelliği	Sarı kristal olarak görülür 20°C'de kristaller içeren altın rengi sıvı		[51]
Kaynama Noktası	224 °C		[52]
Erime Noktası	29 °C		
Çözünürlük	Organik çözücülerde çözünür		
Stabilite	Oda sıcaklığında, karanlıkta nötr ortamda veya alkali sulu çözeltielerde 14 günden fazla stabildir. Asidik çözeltielerde biraz daha az kararlıdır.		[53]
Tehlike Sınıflandırması		Akut toksik: Yutulması halinde toksik	[54]
		Ciddi Sağlık Riski: Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor (Kanserojenite: 2B: muhtemel)	

2.7.3. N-nitrosopirrolidin (NPYR)

N-Nitrosopirrolidin (NPYR), insanda kolon ve karaciğer kanserojenitesinde rol oynayan N-nitroso bileşiklerinden biridir. NPYR, koruyucu olarak sodyum nitrit kullanılmış et, balık ve süt ürünleri içeren gıdaların pişirilmesi sırasında oluşabilir. Ayrıca bu maddenin gıda dışı diğer maruziyet kaynakları arasında kauçuk malzemeler ve tütün dumanı yer almaktadır. N-Nitrosopirrolidin cilt ve göz tahrişine neden olabilir ve karaciğer ve böbrek gibi organlara zarar verebilir [55]. NPYR bileşiğinin genel özellikleri Çizelge 2.4’de verilmiştir.

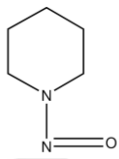
Çizelge 2.4. N-nitrosopirrolidin özellikleri

Madde	N-nitrosopyrrolidin		Kaynak
Kısa Adı	NPYR		[56]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	1-nitrosopyrrolidine		
Molekül Formülü	C ₄ H ₈ N ₂ O		
CAS Numarası	930-55-2		
Sinonimleri	N-nitrosopyrrolidine		[57]
	N-N-pyrrolidine		
	1-Pyrrolidinamine		
Molekül Ağırlığı	100,14 g/mol		
Fiziksel Özelliği	Sarı sıvı		
Kaynama Noktası	214 °C		
Parlama Noktası	98 °C		
Stabilite	Normal koşullar altında stabil		
Tehlike Sınıflandırması		Sağlık Riski: Yutulması halinde tehlikeli	[59]
		Ciddi Sağlık Riski: Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor. (Kanserojenite: 2B: muhtemel)	

2.7.4. N-nitrosopiperidine (NPIP)

Bir N-nitroso bileşiği olan N-nitrosopiperidin (NPIP) insanlarda olası bir kanserojen olarak sınıflandırılmasının yanı sıra deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda farelerde yemek borusu, burun boşluğu, karaciğer ve midede tümörlere neden olduğu saptanmıştır [60].

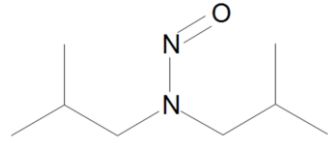
Çizelge 2.5. N-nitrosopiperidin özellikleri

Madde	N-nitrosopiperidine		Kaynak
Kısa Adı	NPIP		[61]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	1-nitrosopiperidine		
Molekül Formülü	C ₅ H ₁₀ N ₂ O		
CAS Numarası	100-75-4		
Sinonimleri	1-nitrosopiperidine Nitrosopiperidin		[62]
Molekül Ağırlığı	114,15 g/mol		
Fiziksel Özelliği	Sarı sıvı		
Kaynama Noktası	217 °C		[63]
Stabilite	Normal koşullar altında stabil		[64]
Tehlike Sınıflandırması		Akut toksik: Yutulması halinde toksik	[65]
		Ciddi Sağlık Riski: Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor. (Kanserojenite: 2B: muhtemel)	

2.7.5. N-nitrosodiisobutylamine (NDiBA)

N-nitrosodiisobutylamine ile ilgili deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda esas olarak solunum yollarını etkilediği tespit edilmiştir. Akciğer tümörleri, burun karsinomu, gırtlak tümörleri rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmalarda NDiBA'nın zayıf bir kanserojen olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiştir [66]. NDiBA maddesinin genel fiziksel/kimyasal özellikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir.

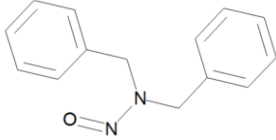
Çizelge 2.6. N-nitrosodiisobutylamine özellikleri

Madde	N-Nitrosodiisobutylamine		Kaynak
Kısa Adı	NDiBA		[67]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	N, N-bis (2-methylpropyl) nitrous amide		
Molekül Formülü	C ₈ H ₁₈ N ₂ O		
CAS Numarası	997-95-5		
Sinonimleri	Diisobutylnitrosamine N, N-Diisobutylnitrous amide N, N-Diisobutylnitrosamine 2,2'-Dimethyldipropylnitrosoamine Dipropylamine, 2,2'-Dimethyl-N-Nitroso- 1-Propanamine, 2-methyl-N-(2-methylpropyl)-N-nitroso-		
Molekül Ağırlığı	158,24 g/mol		[68]
Fiziksel Özelliği	Sarı sıvı		
Stabilite	Normal koşullar altında stabil		
Tehlike		Sağlık Riski: Yutulması halinde tehlikeli	[69]
Sınıflandırması		Ciddi Sağlık Riski: Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor (Kanserojenite: 2B: muhtemel)	

2.7.6. N-nitrosodibenzylamine (NDBzA)

Yarı uçucu aromatik bir nitrozamin olan N-Nitroso-di-benzilamin biberon emzikleri ve emzikler de dahil olmak üzere kauçuk ürünlerde ve kauçuktan üretilmiş elastik gıda ambalajı içinde paketlenmiş bazı et ürünlerinde bir kirletici olarak tespit edilmiştir. Yapısal olarak diğer nitrozaminlere göre daha lipofilik olduğu düşünülmektedir [70, 71]. NDBzA'nın insan sağlığına zararlı olduğu bilinmekle birlikte henüz kanserojenitesi hakkında yeterli çalışma yapılmamıştır [72].

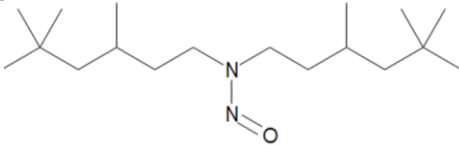
Çizelge 2.7. N-nitrosodibenzylamine özellikleri

Madde	N-nitrosodibenzylamine		Kaynak
Kısa Adı	NDBzA		[73]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	N, N-dibenzylnitrous amide		
Molekül Formülü	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O		
CAS Numarası	5336-53-8		
EC Numarası	859-552-3		
Sinonimleri	Dibenzylnitrosamine		[74]
	N, N-Dibenzylnitrosamine		
	N, N-dibenzylnitrous amide		
	Benzenemethanamide, N-nitroso-N-(phenylmethyl)-		
	1,1-Dibenzyl-2-oxohydrazine		
Molekül Ağırlığı	226,27 g/mol		
Fiziksel Özelliği	Katı		[75]
Erime Noktası	53-55 °C		
Stabilite	Normal koşullar altında stabil		
Tehlike Sınıflandırması		Sağlık Riski: Yutulması halinde tehlikeli	

2.7.7. N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine (NDiNA)

N-nitroso-N,N-di(3,5,5-trimethylhexyl)amine, muhtemel kanserojen olarak sınıflandırılmamakla birlikte genetik kusurlara yol açabileceği tespit edildiğinden sağlık açısından risk teşkil eden bir nitrojenli bileşiktir. Tüketici ürünlerinde kullanımıyla ilgili kapsamlı bir bilgi bulunmamakla birlikte diğer tüm nitrozaminler gibi çeşitli üretim proseslerinde yan ürün olarak kullanılabilir ve emzik ve biberon emzikleri, çocuk oyuncakları, kondomlar gibi ürünlerde kullanımı kısıtlanmıştır. Maddenin genel özellikleri Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine özellikleri

Madde	N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine		Kaynak
Kısa Adı	NDiNA		[76]
Kimyasal Yapı			
IUPAC Adı	N, N-bis (3,5,5-trimethylhexyl) nitrous amide		
Molekül Formülü	C ₁₈ H ₃₈ N ₂ O		
CAS Numarası	1207995-62-7		
EC Numarası	213-644-4		
Sinonimleri	N, N-Bis (3,5,5-trimethylhexyl) nitrous N, N-Bis (3,5,5-trimethylhexyl) nitrous amide 3,5,5-trimethyl-N-nitroso-N-(3,5,5-trimethylhexyl)-1-hexanamine		
Molekül Ağırlığı	298,5 g/mol		[77]
Fiziksel Özelliği	Açık sarıdan şeffafa dönük sıvı		
Stabilite	Normal koşullar altında stabil		
Tehlike		Sağlık Riski: Yutulması halinde tehlikeli	
Sınıflandırması		Ciddi Sağlık Riski: Genetik kusurlara neden olması muhtemel	

2.8. GC-MS Çalışma Prensibi

Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) cihazı bir numunedeki bileşenleri tanımlamak ve hedefli analiz yapılmak istenirse miktarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Numunenin bileşimi hakkında ayrıntılı bilgi sağlamak için temelde bir gaz kromatografi ve dedektör olarak da kütle spektrometresi kullanımına dayanır. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi aşağıdaki bölümlerden oluşur:

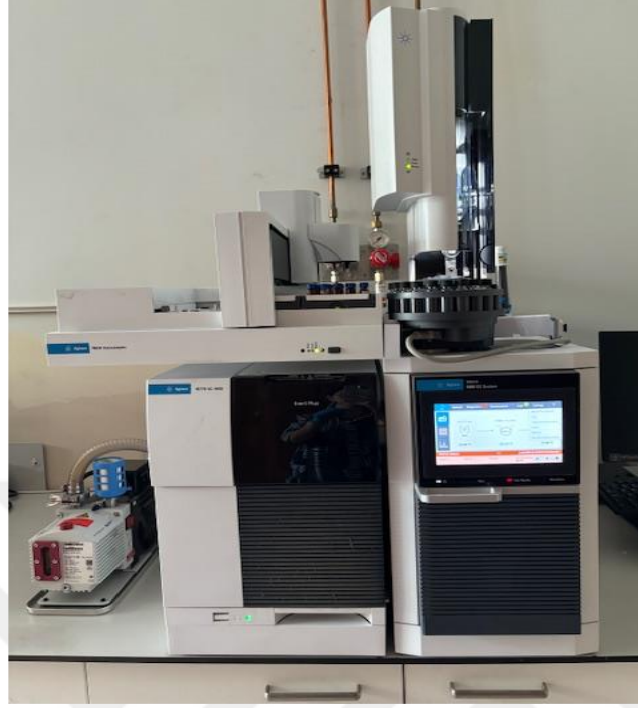
Gaz Kromatografisi:

- Numune enjeksiyon ünitesi: Numune kromatografi cihazına bir enjeksiyon sistemi vasıtasıyla girer. Örnekleyicinin tipine göre numune sıvı veya gaz olarak kullanılabilir. Numune sıvı ise örnekleyici tarafından ısıtılarak buharlaştırılır ve cihaza gaz halinde enjeksiyon yapılır.
- Taşıyıcı gaz: GC-MS sisteminde Helyum, Argon veya Azot gibi gazlar taşıyıcı olarak kullanılabilir. Taşıyıcı gaz numuneyi kolona iletmeye yarayan hareketli fazdır. Kimyasal olarak inert olması gereken taşıyıcı gaz kolona sabit bir akış hızı ve basınç ile gönderilir.
- GC kolonu: Kolon ayırma işleminin gerçekleştiği kısımdır. Buharlaştan bileşikler kolon boyunca itilirken kolonda kullanılan kimyasal madde (sabit faz) ile etkileşime girdiğinde yavaşlarlar ve kimyasal özelliklerine (uçuculuk, adsorpsiyon, polarite vs.) göre farklı zamanlarda çıkarlar. Ayrılan bileşenler kolondan dedektöre (MS) aktarılır.

Kütle spektrometresi:

- İyon kaynağı: Gaz kromatografiden ayrılan bileşikler kütle spektrometresinin iyonizasyon kısmına gönderilir. Burada bir elektron iyonizasyon kaynağı kullanılarak (EI) GC modülünden gelen nötr moleküller yüksek enerjili elektronlarla çarpıştırılır ve elektron kaybederek pozitif yüklü iyonlar oluşturulur.
- Kütle analizörü: İyon kaynağıdan çıkan iyonlar daha sonra kütle analizörüne gönderilir. GC-MS sistemlerinde en yaygın olarak kullanılan analizör kuadrupoldur. Kuadrupolde iyonlara çubuklar vasıtasıyla radyo frekansı ve akım uygulanır. Bu sayede iyonlar kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır.
- Kütle dedektörü: Ayrılan iyonlar elektron multiplier adı verilen ve her bir m/z oranı için ayrı bir sinyal üreten dedektör tarafından ölçülür.
- Data analizi: Kaydedilen her bir sinyal sonunda m/z oranının bir fonksiyonu olarak kütle spektrumuna dönüşür. Her bileşiğin kütle spektrumu kendine has bir parmak izi gibi özeldir.

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan GC-MS sistemine ilişkin görsel Şekil 2.1’de sunulmuştur.



Şekil 2.1. GC-MS cihaz görseli

GC-MS Tarama Modları:

- SCAN modu: Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometre sistemlerinde bir numunedeki maddeleri tanımlamak ve miktarını belirlemek için kullanılan veri toplama modlarından biridir. Bu modda kütle spektrometresi bir dizi m/z oranını tarayarak bu aralıktaki bütün iyonları tespit eder ve her tarama için bir spektrum üretir. Oluşturulan spektrumları tanımlamak için MS kütüphanelerinden (NIST, Wiley vs.) faydalanılabilir. SCAN modu içeriği bilinmeyen numunelerde geniş bir tarama aralığında çalıştığı için avantaj sağlar fakat hassasiyetin düşük olması nedeniyle hedefli analizlerde tercih edilmez.
- SIM (Selected Ion Monitoring-Seçilmiş İyon İzleme) modu: içeriği bilinen bileşiklerin miktarsal tayini için belirli m/z oranlarında tarama yaparak daha yüksek hassasiyetli sonuçlar vermektedir. Dedektör aynı zaman aralığında daha az maddeye odaklandığı için her bir maddenin hassasiyetini artırır. Hedefli analizlerde SIM modu ile çalışmak piklerin daha düzgün alınmasını sağlar ve sinyal/gürültü oranlarını artırarak tespit ve tayin limitlerini iyileştirir.

2.9. Nicel Analizlerde Metot Geçerli Kılma Çalışmaları

Metot validasyonu, kantitatif analizlerde, geliştirilen yöntemin güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir olduğunu tespit etmek için yapılan önemli bir geçerli kılma çalışmasıdır. Bu kapsamda, validasyon parametreleri belirlenerek pek çok deney ve değerlendirme yapılır ve böylece metodun performans özellikleri test edilir. EN ISO/IEC 17025 standardına göre laboratuvarlar, herhangi bir standardı olmayan metotların, yeni tasarlanmış metotların, amacı dışında kullanılan metotların veya değiştirilmiş metotların geçerli kılınmasından sorumludur [78]. Metot geçerli kılma parametreleri, bir nicel analiz için miktar tayini de yapıldığından algılama ve tayin sınırı, çalışma aralığı ve doğruluk çalışmalarını kapsamaktadır. Bu çalışmalar neticesinde ölçüm belirsizliği hesaplamaları da yapılarak metot validasyonu tamamlanmış olur.

2.9.1. Algılama ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Kantitatif analizlerde, kullanılan metotla tespit edilebilecek en düşük analit miktarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu seviyenin üzeri, güvenli çalışma bölgesi olarak düşünülebilir. Bu bağlamda en düşük tespit edilebilir değer veya algılama sınırı diye ifade edilen LOD değeri belirlenmelidir. LOD, bir analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği, fakat kantitatif olarak sonuç veremeyeceği en düşük derişim olarak ifade edilebilir. Bununla birlikte metot performansının kabul edilebilir olduğu en düşük derişim seviyesi yani tayin sınırı olarak da adlandırılan LOQ değeri de belirlenmelidir. LOQ metodun kantitatif olarak ölçebildiği en düşük analit miktarını ifade eder. LOD çalışmalarında içerisinde analit bulunmayan kör örnekler, beklenen LOD seviyesine yakın konsantrasyonda analit içeren örnekler veya düşük konsantrasyon seviyesinde analit ile kirletilmiş çözücü körü kullanılabilir [79].

LOD ve LOQ hesaplamaları yapılırken temel olarak verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak veya lineerite çalışmalarının sonuçları kullanılarak farklı yollarla hesaplama yapılabilir. Fakat kromatografik yöntemlerde LOD ve LOQ değerleri, cihazın verdiği sinyal/gürültü (S/N) oranlarına göre de tespit edilebilmektedir [79]. Sinyalin gürültüden ayrılabilmesi (3:1) en düşük seviye belirlenir. Analitin S/N oranının yaklaşık 3 olduğu derişim noktası LOD ve bu oranın yaklaşık 10 olduğu nokta LOQ olarak kabul edilebilir [80, 81, 82, 83].

2.9.2. Metot Çalışma Aralığı (Lineer Aralık)

Metot çalışma aralığının normal şartları kalibrasyon şartı olarak kabul edilebilir. Yönetmelik veya standartlarla aksi belirtilmediyse en az üç farklı derişim seviyesinde kalibrasyon çalışması yapılması tavsiye edilmektedir [84]. Kalibrasyon çalışmaları yapılırken öncelikle belli derişim noktalarında referans malzemeler cihaza okutulur ve sonuçlar grafiksel olarak verilir. Görsel olarak linearite kontrolü yapıldıktan sonra konsantrasyon ve cihazdan alınan sinyal arasındaki ilişki incelenerek cihaz tarafından hesaplanmış olan tayin katsayısı değerlendirilir. Tayin katsayısının (r^2) 0,995’den büyük olması kalibrasyon eğrisinin doğrusallığının iyi olduğunu göstermektedir [79].

2.9.3. Kesinlik

Kesinlik, ölçümlerin birbirine yakınlığının göstergesidir. Temelde ölçümlerin standart sapma/bağıl standart sapma hesaplamasına dayanır. Bir ölçümün kesinliği tekrar numuneleri ile yapılan ölçümlerin tekrarlanmasıyla tespit edilir. Kesinlik, standart sapma, bağıl standart sapma veya % bağıl standart sapma verileri üzerinden ifade edilebilir. Söz konusu eşitlikler (Eşitlik 2.1, Eşitlik 2.2, Eşitlik 2.3) Çizelge 2.9’da verilmiştir [79].

Çizelge 2.9. Standart sapma eşitlikleri

Standart sapma: $S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$ (2.1)	x_i : her bir ölçümün sonucu $\bar{x}$: ölçüm sonuçlarının ortalaması n : ölçüm sayısı
Bağıl standart sapma: $RSD = \frac{S}{\bar{x}}$ (2.2)	
% Bağıl standart sapma: $\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} * 100$ (2.3)	

Kesinlik değerlendirmesi “tekrarlanabilirlik” ve “tekrar üretilebilirlik” hesaplamaları ile yapılmaktadır. Hesaplamaların analitin derişimi ile doğrudan ilgili olması nedeniyle, çalışma aralığının her noktasında kesinliğin garanti altına alınabilmesi için birkaç farklı derişim noktasında belirlenmesi daha anlamlı olmaktadır [85]. Kesinlik çalışmaları yapılırken uygun bir malzeme seçilerek çalışmaları en az 6 tekrar halinde yapmak

gerekmektedir [79]. Her bir örnek için numune hazırlama dahil tüm ölçüm süreci tekrar edilerek bağımsızlık sağlanmalıdır.

a) Tekrarlanabilirlik

Bir metodun aynı laboratuvar, aynı cihazla, aynı analist tarafından aynı koşullar altında kısa zaman aralığında elde edilen sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür [86]. Dolayısıyla tekrarlanabilirlik kriteri ölçümlerin standart sapması üzerinden değerlendirilmektedir. Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için analite ve çalışma metodunun türüne göre tanımlanmış farklı alternatif metotlar olmakla birlikte bu çalışmada değerlendirme HorRat yöntemi kullanılarak yapılmıştır. HorRat değeri Çizelge 2.10'da verilen eşitliklerle hesaplanmış [87] ve 0,3-1,3 değerleri literatürde kabul edilebilir değerler olarak belirlenmiştir [88].

Çizelge 2.10. Tekrarlanabilirlik eşitlikleri

$\text{HorRat} = \frac{\text{RSD}_r}{\text{PRSD}_r}$	(2.4)	RSD_r : ölçülen bağıl standart sapma (%) PRSD_r : tahmini bağıl standart sapma (%)
$\text{PRSD}_r = 2C^{-0,15}$	(2.5)	C: kütle fraksiyonu
$C: \frac{\text{analit kütlesi}}{\text{toplam kütle}}$	(2.6)	
$r = 2,8 * S_r$	(2.7)	r: tekrarlanabilirlik limiti S_r : tekrarlanabilirlik standart sapması

a) Tekrar Üretilirlik

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik aynı laboratuvar, aynı cihaz, aynı analist ile aynı koşullarda uzun zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının sonucunda, tekrarlanabilirlikte olduğu gibi standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanır. Tekrar üretilebilirlik standart sapması, tekrarlanabilirlik standart sapmasını da kapsayacağından her zaman daha büyük olmalıdır. Tekrar üretilebilirliğin değerlendirmesi de yine HorRat eşitlikleri [87] kullanılarak hesaplanır ve 0,3-1,3 arası kabul edilebilir değerlerdir [88]. Çalışmalar sonucunda değerler kabul edilebilir aralıkta çıkmamışsa çalışmalar tekrarlanır. Tekrar

üretilebilirlik çalışmalarının değerlendirmesi yapılırken kullanılacak HorRat eşitlikleri Çizelge 2.11’de verilmiştir.

Çizelge 2.11. Tekrar üretilebilirlik eşitlikleri

$\text{HorRat} = \frac{\text{RSD}_{Rw}}{\text{PRSD}_{Rw}}$ (2.8)	RSD_{Rw} : ölçülen bağıl standart sapma (%) PRSD_{Rw} : tahmini bağıl standart sapma (%)
$\text{PRSD}_{Rw} = 2C^{-0,15}$ (2.9)	C: kütle fraksiyonu
C: $\frac{\text{analit kütlesi}}{\text{toplam kütle}}$ (2.10)	
$R_w = 2,8 * S_{Rw}$ (2.11)	R_w : laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik limiti S_{Rw} : tekrar üretilebilirlik standart sapması

2.9.4. Doğruluk

Doğruluk, belirli sayıdaki analizin sonuçlarının ortalamasının gerçek değere yakınlığının ölçütüdür. Doğruluk, nicel olarak referans bir değerden “sapma” terimi ile ifade edilir. Bu aynı zamanda metodun geri kazanımını da vermektedir. Geri kazanım çalışmaları matriks uyumlu referans malzemelerin analizi, analit eklenmiş (spike) maddelerle yapılan çalışmalar ve yeterlilik testleri (z scor değerlendirmeleri) ile yapılabilmektedir. Geri kazanım hesaplanırken Eşitlik 2.12 kullanılır [79]:

Çizelge 2.12. Bağıl geri kazanım eşitliği

Bağıl geri kazanım: $\% R = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} * 100$ (2.12)	$\bar{x}$: ölçüm sonuçlarının ortalaması x_{ref} : referans değer
--	--

2.9.5. Ölçüm Belirsizliği

Belirsizlik kelime anlamı itibari ile şüphe olarak nitelendirilir. Ölçüm belirsizliği, bir ölçüm sonucunun geçerliliğine ilişkin şüphe olarak değerlendirilebilir. Resmi tanım olarak ölçüm belirsizliği, ölçüm sonuçlarının dağılımını karakterize eden bir parametredir [89]. Ölçüm belirsizliği hesaplamalarında en sık kullanılan terimler ve tanımları [90] Çizelge 2.13’de verilmiştir.

Çizelge 2.13. Ölçüm belirsizliği çalışmalarında kullanılan terimler ve tanımlar

Terim	Tanım
Standart belirsizlik (U_x):	Standart sapma olarak ifade edilen bir ölçüm sonucunun belirsizliği
Bağıl belirsizlik	% olarak verilmiş analiz sonucunun belirsizliği
A tipi belirsizlik	İstatistiksel yöntemlerle elde edilen belirsizlik
B tipi belirsizlik	İstatistiksel analiz dışındaki yöntemlerle elde edilen belirsizlik
Birleştirilmiş standart belirsizlik (U_c)	Tüm belirsizlik bileşenlerinin birleştirilmesiyle elde edilen toplam belirsizlik
Genişletilmiş belirsizlik (U)	Ölçülen maddeye makul bir şekilde atfedilebilecek değerlerin dağılımının büyük bir güven düzeyindeki aralığı tanımlayan nicelik
Kapsama faktörü (k)	Genişletilmiş bir standart belirsizlik elde etmek için birleşik standart belirsizliğin bir çarpanı olarak kullanılan sayısal faktör

Ölçüm belirsizliği genel olarak birçok bileşenden oluşur. Analize etki edebilecek olan tüm bileşenler ele alınır. Belirsizliğe çok düşük oranda etki eden bileşenler, hesaplamalar yapılırken analist tarafından ihmal edilebilir. Ölçüm belirsizliği aşağıdaki basamaklar izlenerek hesaplanabilir [86]:

- Ölçüm belirsizliğine etki edebilecek tüm olası kaynaklar belirlenir.
- Belirsizlik kaynaklarına etki edebilecek belirsizlik bileşenleri değerlendirilir.
 - A tipi belirsizlik- Standart sapma gibi istatistiksel veriler kullanılarak hesaplanır.
 - B tipi belirsizlik- Kalibrasyon sertifikaları gibi deneysel olmayan kaynaklardan elde edilen belirsizliktir.
- Her belirsizlik kaynağı için standart belirsizlikler hesaplanır.
- Birleşik standart belirsizlik hesaplanır.
- Genişletilmiş belirsizlik hesaplanır.

Çizelge 2.14. Belirsizlik hesaplama formülleri [91, 92]

$U_r = \frac{RSD_r}{\sqrt{n}} \quad (2.13)$	U_r: tekrarlanabilirlik belirsizliği RSD_r: tekrarlanabilirlik bağıl standart sapması n: ölçüm sayısı
$U_{Rw} = \frac{RSD_{Rw}}{\sqrt{n}} \quad (2.14)$	U_{Rw}: laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik belirsizliği RSD_{Rw}: tekrar üretilebilirlik bağıl standart sapması n: ölçüm sayısı
$U_R = \frac{RSD_R}{\sqrt{n}} \quad (2.15)$	U_R: geri kazanım belirsizliği RSD_R: geri kazanım bağıl standart sapması n: ölçüm sayısı
$U_{cal} = RSD = \frac{U(C_0)}{C_0} \quad (2.16)$	U_{cal}: kalibrasyon belirsizliği S: doğrunun standart sapması B: doğrunun eğimi p: örnek ölçümü için okuma sayısı n: kalibrasyon noktası sayısı C_0: tayin edilen çözelti derişimi C_{ort}: kalibrasyon standartlarının ortalaması S_{xx}: residual standart sapma
$U_{C_0} = \frac{S}{B} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - C_{ort})^2}{S_{xx}}} \quad (2.17)$	
$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{n - 2}} \quad (2.18)$	
$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - C_{ort})^2 \quad (2.19)$	
$U_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + \dots + U_n^2} \quad (2.20)$	U_c : birleştirilmiş belirsizlik
$U = U_c \cdot k \quad (2.21)$	U: genişletilmiş belirsizlik k: kapsama faktörü (%95 güven aralığında k = 2)
Belirsizlik değeri: $\pm x \cdot U \quad (2.22)$	x: analiz sonucu

2.10. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı tıbbi malzemelerden süzülebilen nitrozaminler ve nitrozlanabilen maddeler için GC-MS analiz metodunun geliştirilmesi, doğrulanması ve geçerli kılınmasıdır. Metodun geçerli kılma aşamasında uygulanan karar kriterleri Çizelge 2.15’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.15. Metot geçerli kılma aşamasında uygulanan kabul kriterleri

Parametre	Kabul Kriteri	Kaynak
Kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayısı	$r^2 \geq 0,995$	[79]
Geri Kazanım	%R: % 95 $\pm$ 30	[12]
İç Kalite Kontrol (QC)	$\bar{x} - 2SD < x_i < \bar{x} + 2SD$	[93]
	% RSD $\leq$ 15	[94]
Tekrarlanabilirlik	$0,3 \leq \text{HorRat} \leq 1,3$	[88]
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	$ x_i - \bar{x} \leq r$	[88]
Tekrar üretilebilirlik	$0,3 \leq \text{HorRat} \leq 1,3$	[88]
Tekrar üretilebilirlik limiti (R_w)	$ x_i - \bar{x} \leq R_w$	[88]

2.11. Çalışma Tasarımı

Tıbbi malzemelerin nitrozamin ve nitrozlanabilen maddeler yönüyle kimyasal karakterizasyonu amacıyla metot geçerli kılma çalışmaları aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmaktadır:

- Numunenin özütlenmesi
- Kromatografik yöntemle (GC-MS) nitrozamin ve nitrozlanabilen madde analizi metodunun geliştirilmesi
- Geliştirilen metodun geçerli kılınması

2.11.1. Analiz Metodunun Tasarımı

Tıbbi malzemelerde numuneye özütleme işlemi uyguladıktan sonra özütlenen maddenin nitrozaminler ve nitrozlanabilir maddeler yönüyle tayin edilmesi gerekmektedir. Söz konusu maddelerin analizi kromatografik yöntemler ile yapılmaktadır. EN ISO 10993-18 standardında genel hatlarıyla uçucu, yarı uçucu ve uçucu olmayan özütler için uygulanabilecek metotlar verilmekle birlikte özütlenebilir madde profillerinin analizleri ile ilgili özel bir metot verilmemiştir. Fakat genel olarak GC-MS, LC/MS, ATR/FTIR ve NMR gibi yöntemlerin bu çalışmalar için uygun olduğu belirtilmiştir. Çeşitli ürün gruplarındaki nitrozamin ve nitrozlanabilen maddelerin standartlaşmış analiz metotları, kromatografi cihaz üreticilerinin uygulama notları ve bu konuda yapılan literatür

alışmaları incelendiğinde analiz yöntemi olarak Gaz Kromatografi- Kütle Spektrometresi (GC-MS) metodunun uygun olduğu kararına varılmıştır. GC-MS cihazında 7 adet nitrozamin maddesinin tıbbi malzemelerde ekstrakte edilebilir/süzülebilir madde analiz bağlamında incelenmesi amacıyla yapılan metot geliştirme çalışmasında izlenecek adımlar aşağıda listelenmiştir:

- Kalibrasyon özeltilerinin derişimlerinin belirlenmesi
 - EN 12868 standardında kalibrasyon çözeltilerinin 5 µg/L- 500 µg/L aralığında olması gerektiğine işaret edilmektedir [12]. Cihaz üretici firmasının farklı uygulama notlarında ise geniş bir çalışma aralığında (2,5-1000 µg/L) alışılabildiğı görülmektedir [74, 76, 81]. Bu çalışmada sonuçların sağlamlığını sağlamak amacıyla 10 µg/L, 20 µg/L, 30 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L, 100 µg/L olmak üzere 7 farklı kalibrasyon noktası seçilmiştir.
- En yüksek derişim noktasında (100 µg/L) her bir nitrozamin maddesinin tek tek GC-MS cihazında analiz edilmesi
- SCAN modunda 7 adet nitrozamin maddesinin toplam iyon kromatogramlarının incelenmesi
- İyon kromatogramları yardımıyla her bir madde için alıkonma zamanının (t_R : retention time) belirlenmesi
- 7 adet nitrozamin maddesinin kütle spektrumlarının incelenerek hedef iyon ve tanımlayıcı iyonların belirlenmesi
 - İlgili standartlarda, aplikasyon notlarında ve bilimsel literatürde belirtilen hedef iyon (Q1) ve tanımlayıcı iyonların (Q2) incelenmesi
 - Kütle spektrumundaki pikler ile incelenen dokümanlardaki piklerin her bir nitrozamin maddesi için karşılaştırılarak SIM (Selected Ion Mointoring) metodundan kullanılacak hedef ve tanımlayıcı iyonların belirlenmesi
- Metod parametrelerinin belirlenmesi
 - İlgili standartlarda, literatürlerde ve aplikasyon notlarında belirtilen SIM modunda yapılan çalışmalarda metot parametrelerinin incelenmesi

- Kalibrasyon çözeltilerinin GC-MS cihazında analiz edilmesi
 - Kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayılarının karar kriteri değeri (madde 2.12’de verilmiştir) ile karşılaştırılması ve doğrulanması

2.11.2. Analiz Metodunun Geçerli Kılma Çalışmalarının Tasarımı

Bu çalışmada GC-MS metodu ile gerçekleştirilecek olan nitrozamin ve nitrozlanabilen madde analizi metodunun geçerli kılınmasına ilişkin takip edilecek basamaklar aşağıda listelenmiştir:

- LOD (tespit limiti) ve LOQ (tayin limiti) çalışmalarının gerçekleştirilmesi
 - Çözücü körünün (metanol) düşük derişimlerde (1 µL-75 µL) nitrozamin karışımı ile kirletilerek GC-MS metodunda analizinin gerçekleştirilmesi
 - Analiz sonuçları kullanılarak LOD ve LOQ değerlerinin S/N (sinyal/gürültü) oranlarına göre tespit edilmesi
- İç kalite kontrol standartları (QC) için derişimin belirlenmesi
 - Kalibrasyon aralığının (10 µg/L-100 µg/L) orta noktası olan 50 µg/L iç kalite kontrol noktası seçilmiştir.
- En az 5 adet iç kalite kontrol analizi (QC) gerçekleştirilmesi
 - Elde edilen sonuçların kabul kriteri ile karşılaştırılması (madde 2.12’de verilmiştir) ve doğrulanması
- Geri kazanım ve ölçüm belirsizliği çalışmalarının yapılacağı derişim noktalarının belirlenmesi
 - Kalibrasyon aralığını farklı düzeylerde temsil etmesi açısından 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişimleri çalışma noktaları olarak belirlenmiştir.
- Geri kazanım çalışmalarının tasarımı ve gerçekleştirilmesi
 - Belirlenen 3 farklı derişimde hazırlanan nitrozamin çözeltilisinin çözücüye (metanol) ilave edilerek ekstaksiyon işlemine tabi tutulması
 - Elde edilen sonuçların kabul kriteri ile karşılaştırılması (madde 2.12’de verilmiştir) ve doğrulanması

- Tekrar edilebilirlik çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve doğrulanması
 - Belirlenen 3 farklı derişimde ve her derişim noktasında ayrı ayrı hazırlanan 8 analitin kısa süre aralığında (maksimum 6 gün) GC-MS cihazında analizi
 - Elde edilen sonuçların kabul kriteri ile karşılaştırılması (madde 2.12’de verilmiştir) ve doğrulanması
- Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve doğrulanması
 - Belirlenen 3 farklı derişimde ve her derişim noktasında ayrı ayrı hazırlanan 8 analitin uzun zaman aralığında (3 ay içerisinde) GC-MS cihazında analizi
 - Elde edilen sonuçların kabul kriteri ile karşılaştırılması (madde 2.12’de verilmiştir) ve doğrulanması
- Belirsizliğe etki edecek kaynakların tespit edilmesi
 - Bu aşamada her bir kaynağın tek tek nicelleştirilmesi gerekli değildir. Amaç neyin dikkate alınması gerektiğini netleştirmektir [91].
 - Kalibrasyon fonksiyonu, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, geri kazanım ve cihazlardan gelen belirsizliklerin ölçüm belirsizliğine etki edeceği öngörülmüştür.
 - Elde edilen sonuçların kabul kriteri ile karşılaştırılması (madde 2.12’de verilmiştir) ve doğrulanması
- Belirsizliğin ölçülmesi
 - Belirsizlik kaynakları tespit edildikten sonra, Her bir kaynaktan gelen standart belirsizlik değerlendirilir ve birleştirilir.
 - Tüm bileşenlerin birleşik belirsizliğe önemli bir katkıda bulunmayacağı kabul edilmelidir. Pratikte belirsizlik kaynaklarının sadece küçük bir kısmının katkıda bulunmasının muhtemel olduğu görülmüştür. En büyüğün üçte birinden daha az olan bileşenlerin ayrıntılı olarak değerlendirilmesine gerek olmayabilir [91].
 - Her bir bileşenin veya bileşen kombinasyonunun belirsizliğe katkısının bir ön tahmini yapılmalı ve önemli olmayanlar elenmelidir.
- Genişletilmiş belirsizliğin hesaplanması
- Örnek derişim noktaları için $\pm$ belirsizlik değerlerinin hesaplanması

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Polimer bazlı tıbbi malzemelerde nitrozamin analizi yapmak amacıyla analizi yapılacak nitrozamin maddelerinin ürün kodları, CAS numaraları ve referans madde üreticileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sertifikalı referans malzeme bilgileri

Madde Adı	Kısaltma	CAS	Ürün Kodu	Üretici Firma
N-nitrosodipropylamine	NDPA	621-64-7	SB5690.100-100 mg	CPAchem Ltd Bogomilovo, Bulgaria
N-nitrosomorpholine	NMOR	59-89-2	N-12575-100 mg	Chem Service, Inc West Chester, USA
N-nitrosopyrrolidine	NPYR	930-55-2	SB16901.100-100 mg	CPAchem Ltd Bogomilovo, Bulgaria
N-nitrosopiperidine	NPIP	100-75-4	SB16891.25-25 mg	CPAchem Ltd Bogomilovo, Bulgaria
N-nitrosodiisobutylamine	NDiBA	997-95-5	DRE-C15602450-50 mg	Dr. Ehrenstorfer GmbH Augsburg, Germany
N-nitrosodibenzylamine	NDBzA	5336-53-8	DRE-C15602200-50 mg	Dr. Ehrenstorfer GmbH Augsburg, Germany
N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine	NDiNA	1207995-62-7	TRC-N525800-25 mg	Toronto Research Chemicals Ontario, Canada

Çalışmalar önce SCAN modunda başlamış olup ayrı ayrı referans malzemeler cihaza verilmiştir. Fakat söz konusu yöntem yalnızca SIM metodu hazırlama aşamasında parametrelerin tespiti için gerekli olduğundan metot oluşturulduktan sonra kalibrasyon standartları hazırlanırken karışım çözelti kullanılarak cihaza verilmiştir. Bununla birlikte analizlerin devamında iç standartla çalışmanın uygun görülmüş olması neticesinde kullanılan iç standart ve karışım çözelti referans malzemelerinin bilgileri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Analizlerde çözücü olarak kullanılan metanol ile numune hazırlama ve

ekstraksiyon aşamalarında kullanılan diğer malzemelerin bilgileri de Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İç standart ve nitrozamin karışım çözeltisi referans malzeme bilgileri

Madde Adı	Kısaltma	CAS	Ürün Kodu	Üretici Firma
Nitrozamin Karışımı: Aşağıda listesi bulunan her bir maddeden 10 ppm olacak şekilde metanol ortamında hazırlanmıştır. - N-nitrosodipropylamine - N-nitrosomorpholine - N-nitrosopyrrolidine - N-nitrosopiperidine - N-nitrosodiisobutylamine - N-nitrosodibenzylamine - N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine	-	-	CPA-RD045-10 ppm	CPAchem Ltd, Bogomilovo, Bulgaria
N-nitrosodiethylamine-d10 (İç Standard)	NDEA-d10	1219794-54-3	TRC-N525466-1 mg	Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada

Çizelge 3.3. Kullanılan diğer kimyasallarla ilgili bilgiler

Madde Adı	Kısaltma	CAS	Üretici Firma
Sodyum Hidrojen Karbonat	NaHCO ₃	144-55-8	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Sodyum Klorür	NaCl	7647-14-5	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Potasyum Karbonat	K ₂ CO ₃	584-08-7	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Sodyum Nitrit	NaNO ₂	7632-00-0	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Hidroklorik Asit (%37)	HCl	7647-01-0	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Sodyum Hidroksit	NaOH	1310-73-2	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Metanol	CH ₃ OH	67-56-1	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Dikloro Metan (DCM)	CH ₂ Cl ₂	75-09-2	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Diatome Toprak Dolgulu Kolon, Chromabond XTR®.			MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Düren, Germany

3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında özütleme, analiz ve metot geçerli kılma aşamalarında kullanılan cihaz/ölçüm aletlerinin listesi Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihaz/ölçüm aletleri listesi

Cihaz	Marka	Model	Seri Numarası	Kalibrasyon Sertifikası
GC-MS	Agilent	Intuvo -9000 GC -5977B MSD -Autosampler: 7693A	US2147M040	-
Terazi	Precisa	XB220A	2801663	AB-0002-K/23M03994/11.23
Etüv	Termal	H11540ED	13005	AB-0002-K/22S00819/09.22
Mikropipet	Eppendorf	0,5-10 mL	5531131	AB-0002-K/23H00044/04.23
Mikropipet	VITLAB	100-1000 µL	16M8713	AB-0002-K/23H00043/04.23
Mezür	SIMAX	50 mL	Enst-M50	AB-0002-K/24H00029/03.24
Mezür	SIMAX	100 mL	Enst-M100	AB-0002-K/24H00028/03.24

3.3. GC-MS Cihazı ile Nitrozamin Analizi Metodunun Oluşturulması

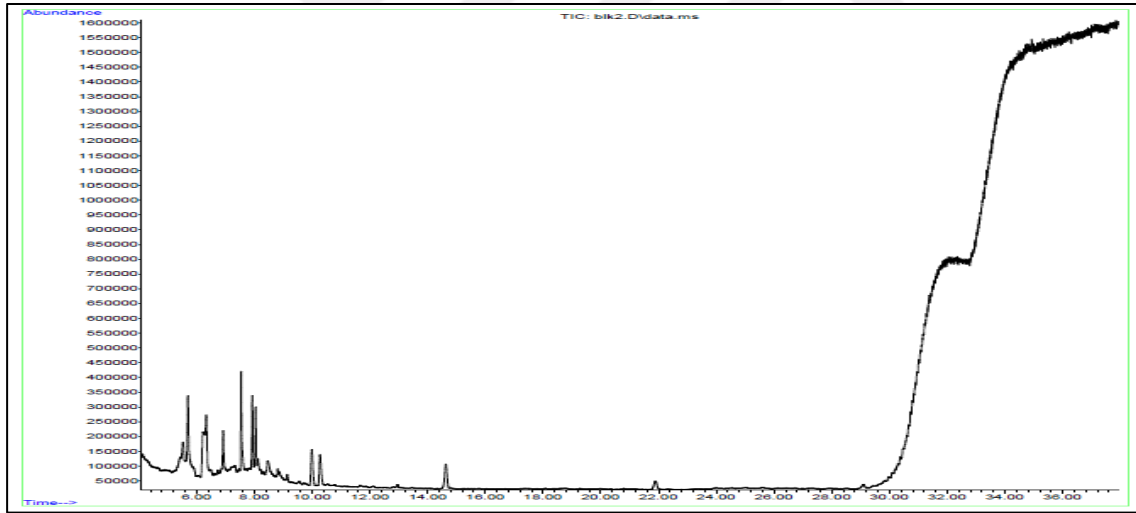
GC-MS metodunu oluştururken öncelikli olarak çalışma aralığı belirlenmiştir. 10 µg/L, 20 µg/L, 30 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L, 100 µg/L olmak üzere 6 farklı kalibrasyon noktası seçilmiştir. 7 adet nitrozamin maddesi için en yüksek derişim noktası olan 100 µg/L değerinde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve SCAN modunda hepsi tek tek analiz edilmiştir. Maddelerin toplam iyon kromatogramları incelenmiş ve her madde için alıkonma zamanları belirlenmiştir. Sonrasında kütle spektrumları incelenerek hedef ve belirleyici iyonlar belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler SIM modunda oluşturulan GC-MS metoduna kaydedilerek kalibrasyon çözeltileri analiz edilmiştir.

3.3.1. SCAN (Tarama) Modda Yapılan Çalışmalar

Maddelerin tanımlanabilmesi için SCAN modunda analiz yapılmış ve toplam iyon kromatogramlarında çıkan piklere ait kütle spektrumlarının NIST kütüphane taraması yapılarak ilgili maddelerle eşleşme sağlanmış ve doğrulanan piklerin alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Sonrasında, bu piklere ait kütle spektrumları değerlendirilmiştir. Ayrıca standartlaşmış analiz metotları, cihaz üreticilerinin uygulama notları ve literatür çalışmaları da incelenerek elde edilen verilerle karşılaştırma yapılmış ve en uygun hedef ve tanımlayıcı iyonlar belirlenmiştir.

3.3.1.1. Alıkonma Zamanlarının Belirlenmesi

Öncelikli olarak çözücü körü (metanol-çözücü olarak kullanılmıştır) GC-MS cihazında analiz edilmiş olup toplam iyon kromatogramı Şekil 3.1’de verilmiştir.

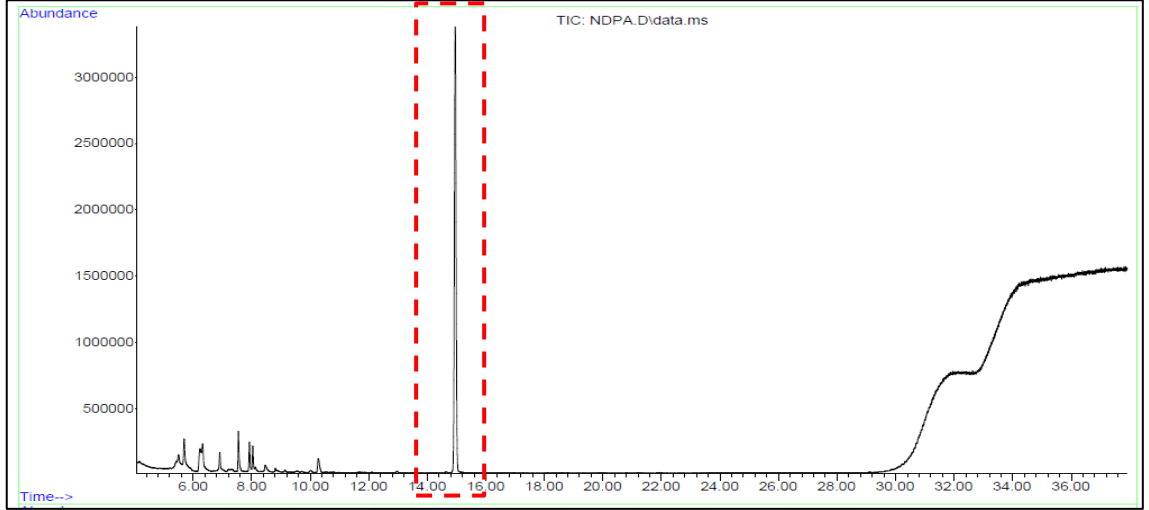


Şekil 3.1. Çözücü körü kromatogramı

Analiz edilen 100 µg/L derişiminde 7 adet nitrozamin kromatogramı ile çözücü körünün kromatogramı ayrı incelenmiştir. Çözücünün kromatogramından farklı olarak çıkan en belirgin piklerin kütüphane taraması yapılarak eşleşme olup olmadığı kontrol edilmiştir.

a) NDPA

Şekil 3.2’de verilmiş olan kromatograma göre alıkonma süresi (t_R) 14,955 olan pikin kütle spektrumu ve kütüphane taraması sonuçları (Şekil 3.3) incelendiğinde NDPA maddesine ait olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 3.2. NDPA kromatogramı

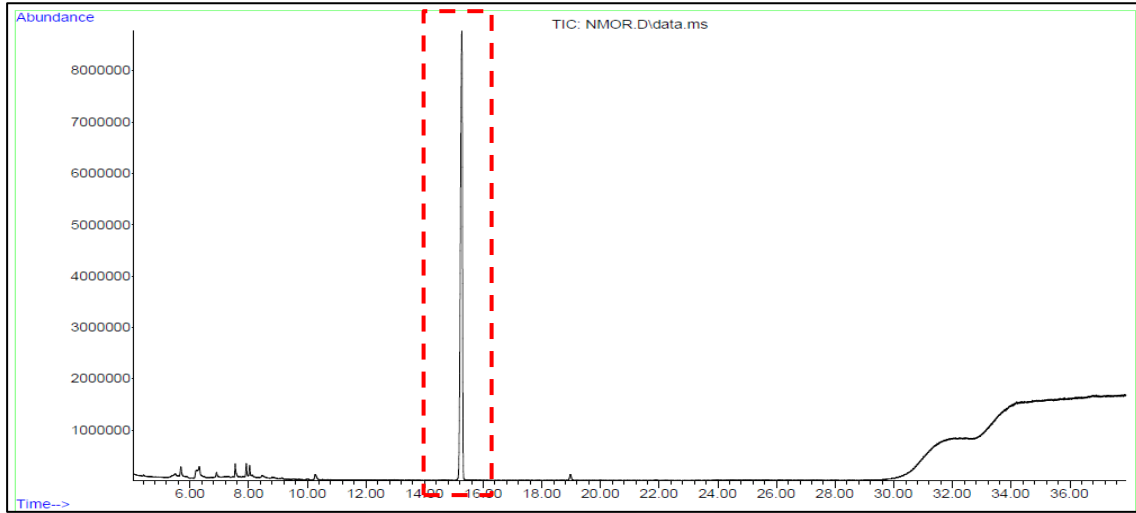
Scan 2899 (14.955 min): NDPA.D\data.ms
NDPA

Ra	Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dK	F1	%	Co	Cl	Ti	Re	XCORR
1	1-Propanamine, N-nitroso-N-propyl-	130	C6H14N2O	94	*	000621-64-7	14887	89	9	0	83	1	70	46	83	9291
2	N-(1-Methoxycarbonyl-1-methyl)ethyl-2-aza	189	C8H15NO4	35	*	076664-34-1	60305	44	69	3	46	51	11	0	39	6281
3	1-(4-Amino-furazan-3-yl)-5-(4-methyl-pip	336	C13H20N8O3	33	*	100030-07-8	214467	33	10	3	81	32	10	1	22	8153
4	Hexane, 2,3-dimethyl-	114	C8H18	32	*	000584-94-1	8484	36	58	3	74	46	9	0	30	7667
5	Heptanoic acid, 3-methylbutyl ester	200	C12H24O2	16	*	000109-25-1	70783	43	67	2	53	58	3	0	37	8542
6	Heptanoic acid, 3-methylbutyl ester	200	C12H24O2	12	*	000109-25-1	70784	36	69	2	56	58	2	1	23	8507
7	Azocine, octahydro-	113	C7H15N	9	*	001121-92-2	7737	23	80	3	45	59	1	0	9	8275
8	Thiophene, 2-(methylthio)-	130	C5H6S2	9	*	005780-36-9	14747	24	72	3	52	77	1	0	9	4937
9	2,3-Difluorophenol	130	C6H4F2O	9	*	006418-38-8	14935	25	63	2	47	72	1	0	9	5098
10	1,3,2-Dioxaborolan-4-one, 2-ethyl-	114	C4H7BO3	9	*	074646-12-1	7877	26	62	2	88	48	1	0	9	8203
11	l-Alanine, N-propoxycarbonyl-, dodecyl e	343	C19H37NO4	9	*	100031-33-5	222155	32	84	3	61	72	1	0	9	5380
12	2,5-Difluorophenol	130	C6H4F2O	9	*	002713-31-7	14929	30	58	1	43	72	1	0	33	5103
13	2,4-Difluorophenol	130	C6H4F2O	9	*	000367-27-1	14927	29	73	1	61	72	1	0	33	5093
14	Trifluoromethyl ethyl sulfide	130	C3H5F3S	9	*	013003-31-1	14666	28	75	3	54	71	1	0	33	5047
15	Oxalic acid, butyl 3,5-difluorophenyl es	258	C12H12F2O4	8	*	100030-96-3	130459	34	68	2	57	69	1	0	25	5402
16	5-Fluoro-4-imidazolic acid	130	C4H3FN2O2	8	*	042309-90-0	14691	28	75	3	56	66	1	0	29	5310
17	2,4-Difluorophenol	130	C6H4F2O	8	*	000367-27-1	14933	29	71	2	61	69	1	0	29	5235
18	l-Alanine, N-propoxycarbonyl-, tridecyl	357	C20H39NO4	7	*	100031-33-6	234765	33	87	3	61	72	1	0	22	5409
19	Alanylalanine, N,N'-dimethyl-N-ethoxycar	288	C13H24N2O5	7	*	100032-92-5	163001	34	68	1	52	71	1	1	23	5017
20	2-Ethylamino-2-methylpropane-1,3-diol, d	189	C10H23NO2	7	*	100037-87-2	59839	34	44	1	43	74	1	0	25	5152

Şekil 3.3. NDPA kütüphane taraması

b) NMOR

Şekil 3.4’de verilmiş olan kromatograma göre alıkonma süresi (t_R) 15,270 olan pikin kütle spektrumu ve kütüphane taraması sonuçları (Şekil 3.5) incelendiğinde NMOR maddesine ait olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 3.4. NMOR kromatogramı

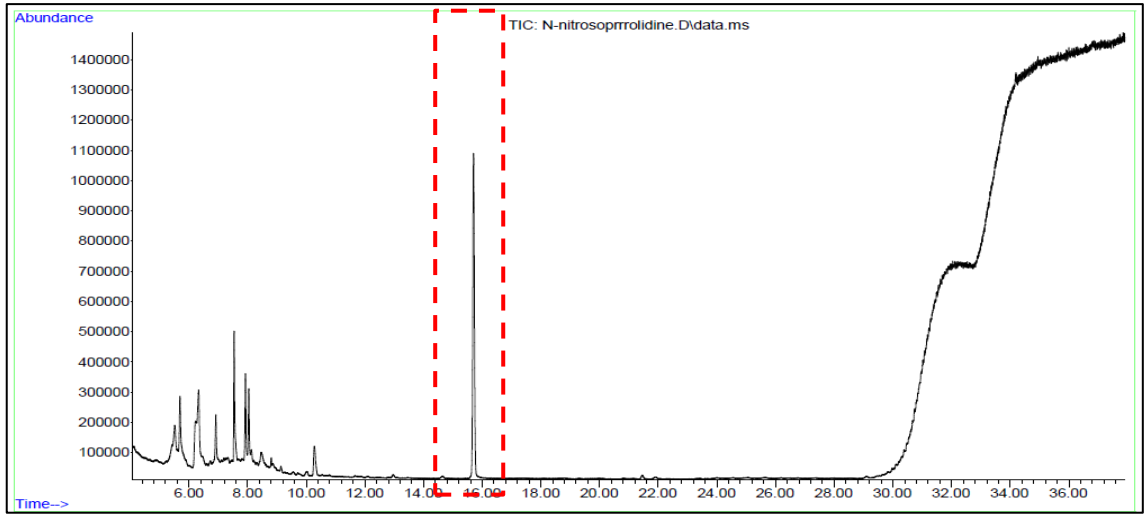
Scan 2983 (15.270 min): NMOR.D\data.ms
NMOR

Ra Name	MW	Formula	Ou	M	CAS #	Ref #	K	dK	F1	%	Co	C1	Ti	Re	XCORR
1 Morpholine, 4-nitroso-	116	C4H8N2O2	91	*	000059-89-2	8832	71	11	0	87	0	60	34	59	8909
2 Morpholine, 4-nitroso-	116	C4H8N2O2	64	*	000059-89-2	8834	44	35	1	97	8	37	0	33	9248
3 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, decyl este	301	C16H31NO4	17		100031-34-2	177663	33	69	1	96	55	3	0	25	6871
4 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, nonyl este	287	C15H29NO4	17		100031-34-1	162275	33	70	1	86	55	3	0	25	6883
5 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, dodecyl es	329	C18H35NO4	17		100031-34-4	207776	37	69	1	93	55	3	0	25	6888
6 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, octyl este	273	C14H27NO4	17		100031-34-0	147093	33	68	3	99	54	3	0	25	6884
7 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, tridecyl e	343	C19H37NO4	12		100031-34-5	222153	33	74	1	97	56	2	0	25	6882
8 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, tetradecyl	357	C20H39NO4	12		100031-34-6	234774	33	78	0	82	56	2	0	25	6906
9 L-Alanine, N-ethoxycarbonyl-, pentadecyl	371	C21H41NO4	12		100031-34-7	246244	33	78	1	81	56	2	0	25	6904
10 N-(2-Methoxyethyl)-tert-butylamine	131	C7H17NO	12		022687-22-5	15546	33	79	2	52	56	2	0	25	7585
11 2-Butenoic acid, (E)-	86	C4H6O2	9	*	000107-93-7	1852	24	74	3	72	77	1	0	9	4864
12 N,N-Diethyl-2-aminoethanol	117	C6H15NO	9	*	000100-37-8	9504	26	65	3	64	71	1	0	9	5583
13 Crotonic acid	86	C4H6O2	9	*	003724-65-0	1829	24	82	3	72	77	1	0	9	4866
14 5-Methyl-3H-1,3,4-oxadiazole-2-thione	116	C3H4N2OS	9	*	031130-17-3	8794	24	91	3	83	30	1	0	9	8512
15 N,N-Diethyl-2-aminoethanol	117	C6H15NO	9	*	000100-37-8	9508	27	70	2	51	71	1	0	9	5714
16 2-Propanone, methylhydrazone	86	C4H10N2	9	*	005771-02-8	1803	25	76	3	60	68	1	0	9	6382
17 Ethanol, 2-(butylamino)-	117	C6H15NO	9	*	000111-75-1	9501	25	66	2	72	57	1	0	9	7122
18 Azetidine, 1-nitroso-	86	C3H6N2O	9	*	015216-10-1	1787	24	73	1	79	71	1	0	9	5085
19 Ethanol, 2-(butylamino)-	117	C6H15NO	9	*	000111-75-1	9500	27	78	2	56	65	1	0	9	6924
20 N,N-Diethyl-2-aminoethanol	117	C6H15NO	9	*	000100-37-8	9509	26	63	3	66	71	1	0	9	5484

Şekil 3.5. NMOR kütüphane taraması

c) NPYR

Şekil 3.6’da verilmiş olan kromatograma göre alıkonma süresi (t_R) 15,270 olan pikin kütle spektrumu ve kütüphane taraması sonuçları (Şekil 3.7) incelenmiştir. Kütüphane taramasında çıkan olası eşleşmelerin kütle spektrumları (Şekil 3.8-3.11) incelenmiş ve yalnızca Pyrolidine maddesinin kütle spekturumunun, NPYR maddesinin kütle spektrumunda görülen tanımlayıcı iyonları (100, 41 ve 68 iyonlarını) içerdiği görülmüştür. Böylece bu pikin NPYR maddesine ait olduğu doğrulanmış ve alıkonma zamanı kaydedilmiştir.

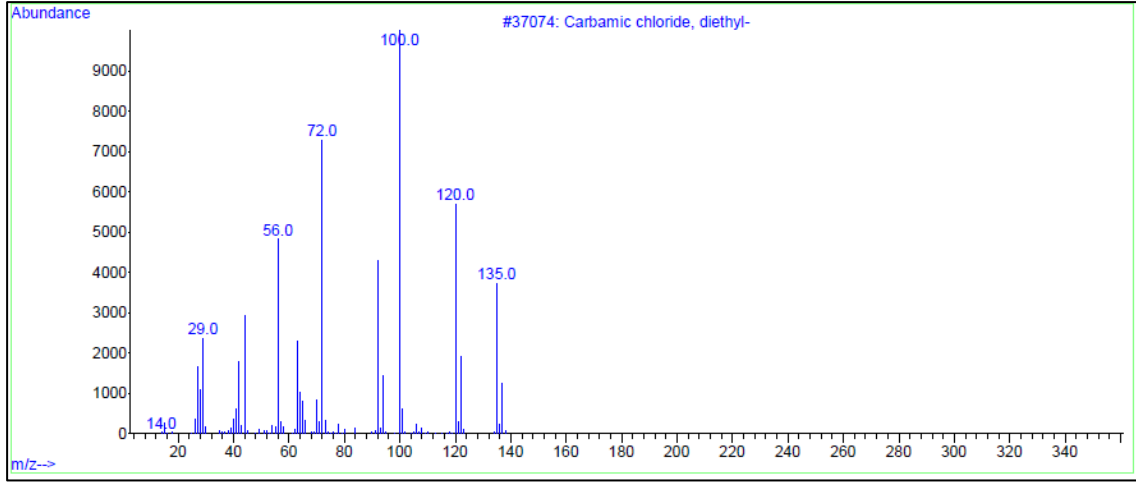


Şekil 3.6. NPYR kromatogramı

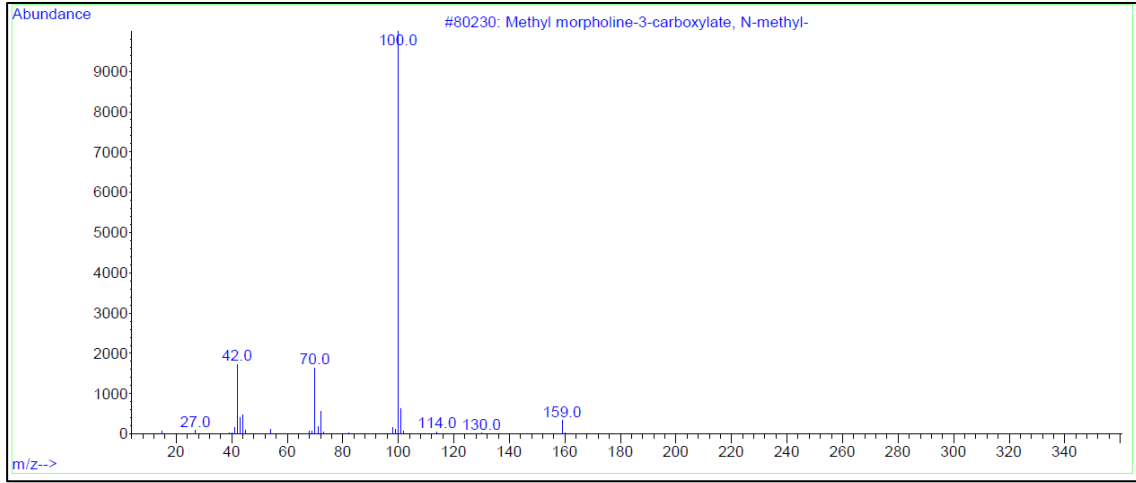
Scan 3099 (15.704 min): N-nitrosopyrrolidine.D\data.ms
N-nitrosopyrrolidine

Ra Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dK	F1	%	Co	C1	Ti	Re	XCORR
1 Carbamic chloride, diethyl-	135	C5H10ClNO	59	*	000088-10-8	37074	38	85	3	85	22	33	0	39	9945
2 Methyl morpholine-3-carboxylate, N-methyl	159	C7H13NO3	39	*	154457-77-5	80230	34	45	3	85	20	15	0	25	9838
3 3H-1,2,4-Triazol-3-one, 4-amino-2,4-dihy	100	C2H4N4O	9	*	001003-23-2	8153	25	32	2	99	18	1	0	9	9949
4 Pyrrolidine, 1-nitroso-	100	C4H8N2O	9	*	000930-33-2	8243	26	66	2	71	20	1	0	9	9655
5 Methyl 2-diazoacetate	100	C5H8N2O2	9	*	990000-78-5	8163	23	44	3	83	22	1	0	9	8085
6 5-Methyl-3-pyrazolidinone	100	C4H8N2O	9	*	010234-76-1	8254	24	31	1	87	20	1	0	9	9815
7 1H-[1,2,4]Triazole-3-carboxylic acid (2-	225	C9H15N5O2	9	*	990121-04-7	274547	31	60	1	68	20	1	0	9	9893
8 Acetamide, N-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-m	225	C10H15N3O3	9	*	990121-21-6	274813	29	68	2	68	18	1	0	9	9951
9 morpholine, 4,4'-methylenebis-	186	C9H18N2O2	9	*	990050-31-2	147444	31	79	2	70	18	1	0	9	9936
10 Morpholin-4-yl-acetic acid, hydrazide	159	C6H13N3O2	9	*	990020-67-7	80142	29	49	2	91	20	1	0	9	9937
11 Acetamide, 2-(4-morpholyl)-N-(4,5,6,7-te	305	C15H19N3O2S	9	*	330637-98-4	560259	28	77	3	79	20	1	0	9	9928
12 Morpholine, 4-octadecyl-	339	C22H45NO	9	*	016528-77-1	671753	30	68	2	67	22	1	0	9	9851
13 2,4-Imidazolidinedione	100	C3H4N2O2	7	*	000461-72-3	8172	21	63	3	67	24	1	0	7	9887
14 Borane-morpholine complex	101	C4H12BNO	7	*	004856-95-5	9229	21	84	2	99	22	1	0	7	9188
15 2-Hydrazino-2-imidazoline	100	C3H8N4	5	*	990000-79-2	8191	19	72	1	88	18	1	0	5	9625
16 2(5H)-Thiophenone	100	C4H4OS	5	*	003354-32-3	8193	19	85	3	80	26	1	0	5	9643
17 4H-Pyran-4-one, tetrahydro-	100	C5H8O2	5	*	029943-42-8	8351	19	84	3	77	28	1	0	5	8154
18 Sydnone, 3-methyl-	100	C3H4N2O2	5	*	006939-12-4	8159	19	49	3	78	30	1	0	5	8314
19 4-Amino-4,5(1H)-dihydro-1,2,4-triazole-5	100	C2H4N4O	5	*	001003-23-2	8152	19	32	2	99	22	1	0	5	9937
20 2-methyl-3-hydroxy-2,3-dihydro	100	C5H8O2	5	*	990000-82-3	8403	19	32	3	88	30	1	0	5	9815

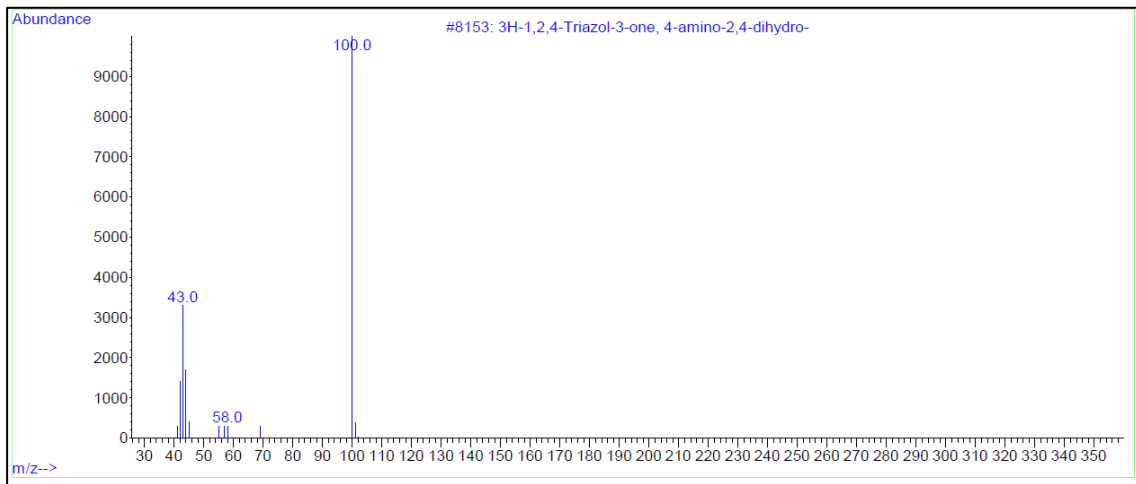
Şekil 3.7. NPYR kütüphane taraması



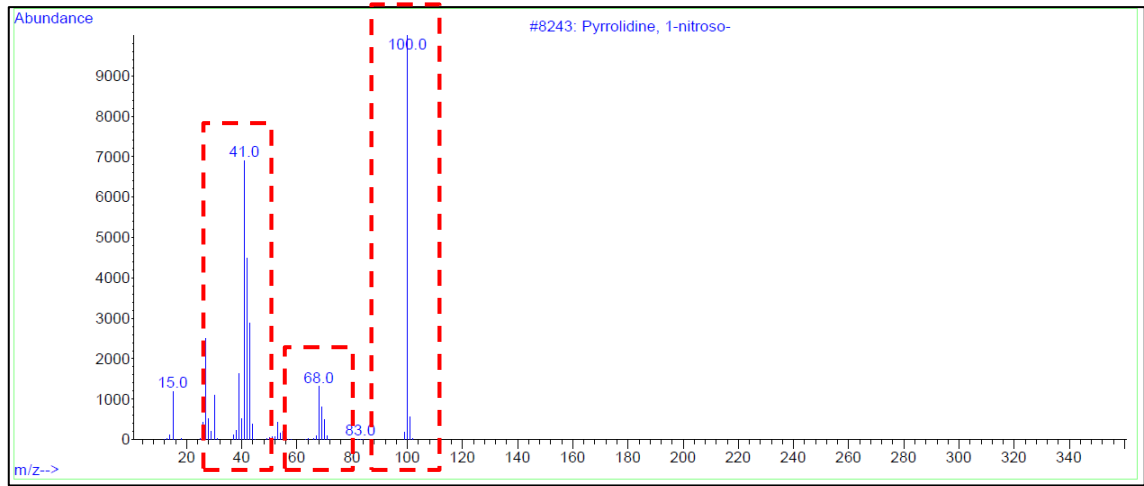
Şekil 3.8. Carbamic chloride, diethyl- kütle spektrumu



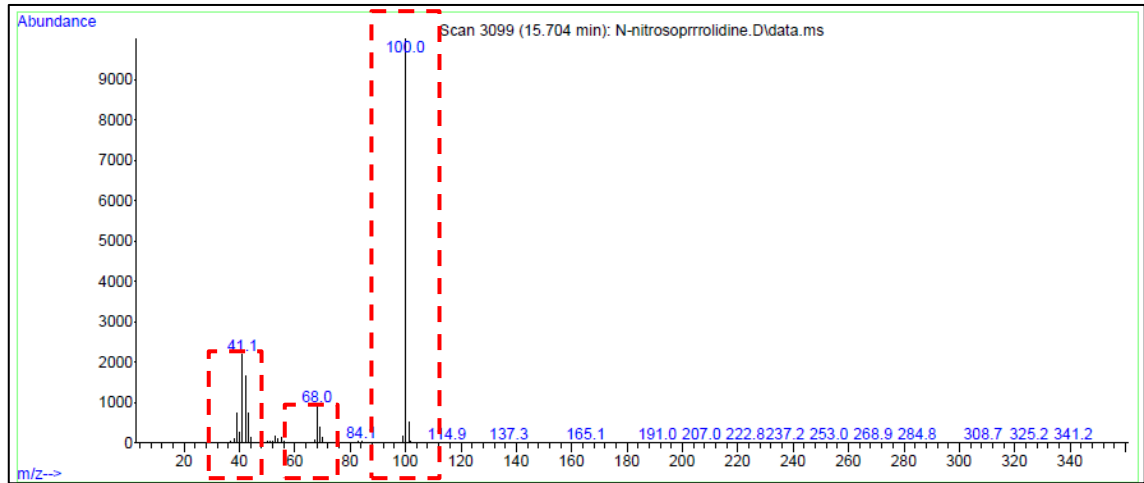
Şekil 3.9. Methyl morpholine-3-carboxylate, N-methyl kütle spektrumu



Şekil 3.10. 3H-1,2,4-Triazol-3-one, 4-amino-2,4-dihydro- kütle spektrumu

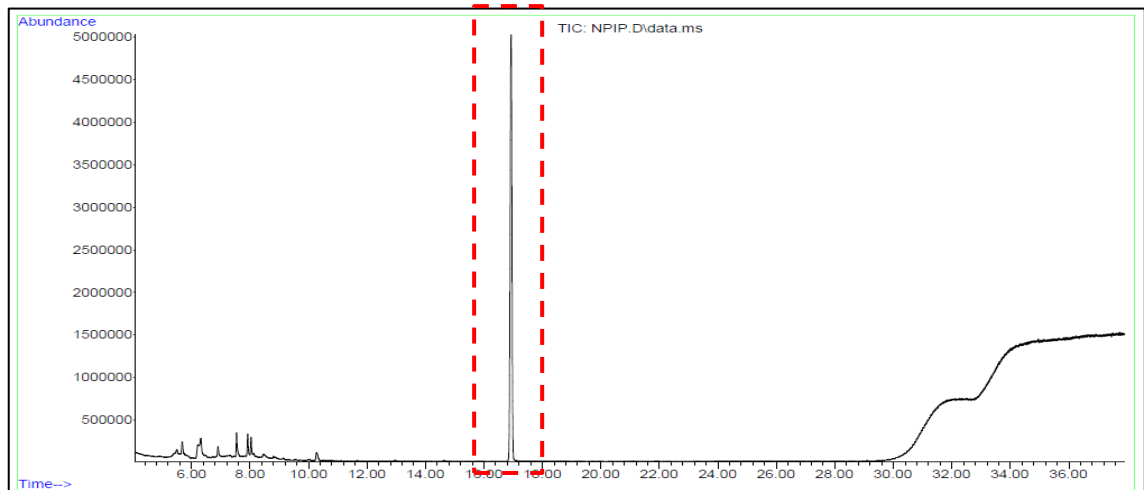


Şekil 3.11. Pyrrolidine, 1—nitroso kütle spektrumu



Şekil 3.12. NPYR kütle spektrumu

d) NPIP



Şekil 3.13. NPIP kromatogramı

Scan 3425 (16.926 min): NPIP.D\data.ms
NPIP

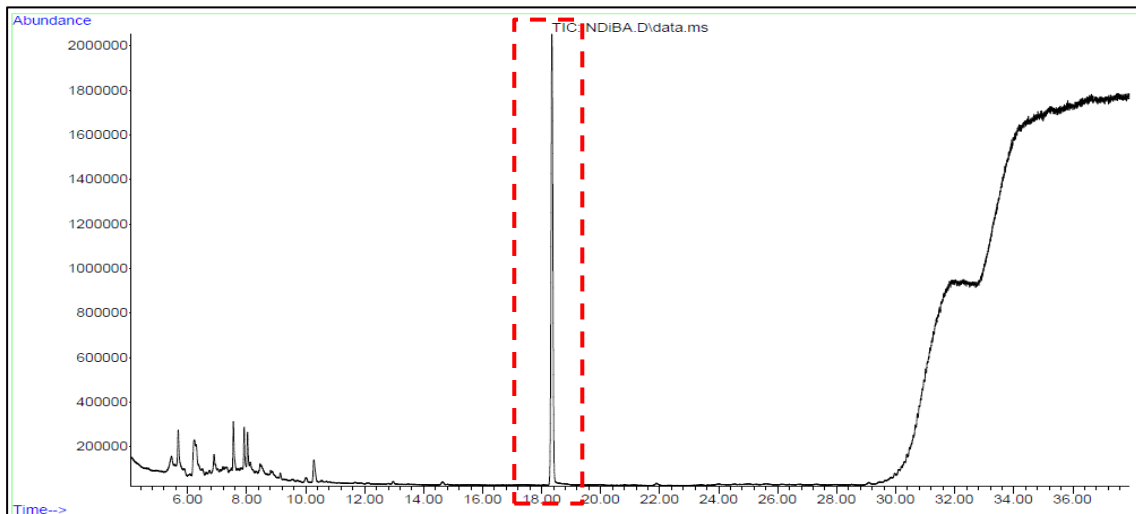
Ra Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dK	F1	%	Co	C1	Ti	Re	XCORR
1 Propanamide, N-(2-fluorophenyl)-3-(4-mor	252	C13H17FN2O2	64		284679-89-6	124255	41	58	1	75	10	37	10	35	9701
2 2-Imidazolidinone, 1,3-dimethyl-	114	C5H10N2O	39	*	000080-73-9	7888	30	72	3	69	19	15	0	29	9720
3 2,3-Dimethoxy-1,3-butadiene	114	C6H10O2	9	*	003588-31-6	8012	23	85	3	67	26	1	0	9	9055
4 2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, dihydro-	114	C4H6N2O2	9	*	000504-07-4	7861	26	60	1	67	24	1	0	9	9698
5 5H-Tetrazol-5-one, 1-ethyl-1,2-dihydro-	114	C3H6N4O	9	*	069048-98-2	7818	23	87	1	67	26	1	0	9	8560
6 2,4-Imidazolidinedione, 1-methyl-	114	C4H6N2O2	9	*	000616-04-6	7855	26	26	2	80	26	1	0	9	9652
7 Propanamide, N-[3,5-bis(trifluoromethyl)	370	C15H16F6N2O2	9		100026-85-0	244767	28	86	3	92	21	1	0	9	9637
8 dl-2-Aminocaprylic acid	159	C8H17NO2	9		000644-90-6	34413	32	55	1	86	22	1	0	9	9701
9 2H-1,3-Oxazine, tetrahydro-2,3,6-trimeth	129	C7H15NO	9		130191-20-7	14517	29	78	2	67	19	1	0	9	9654
10 Morpholine-4-carboxylic acid 2,6-dibromo	391	C12H11Br2NO4	9		100027-42-3	259769	29	97	2	98	17	1	0	9	9738
11 Oxalic acid, monomorpholide, propyl este	201	C9H15NO4	9		100030-94-4	71982	28	76	3	93	19	1	0	9	9697
12 N-Ethyl-4-hydroxypiperidine	129	C7H15NO	9		003518-83-0	14458	29	74	2	92	19	1	0	9	9681
13 Morpholine-4-carboxylic acid, 2-ethoxy-4	279	C14H17NO5	9		100026-98-7	153192	31	81	3	99	15	1	0	9	9775
14 2-Diisopropylaminoethyl ethyl ether	173	C10H23NO	9		032996-95-5	45871	30	84	2	99	19	1	0	9	9723
15 2-propenoic acid, 2-methyl-, 2-[[[(1-met	269	C11H15N3O3S	9		100039-69-9	142230	31	75	2	90	26	1	0	9	9471
16 Piperidin-4-ol, 2,3-dimethyl-, trans-	129	C7H15NO	9		327175-92-8	14504	29	81	2	68	22	1	0	9	8738
17 Oxalic acid, monomorpholide, isobutyl es	215	C10H17NO4	9		100030-94-5	85853	32	70	2	69	19	1	0	9	9727
18 Bis(2-diisopropylaminoethyl) sulfide	288	C16H36N2S	9		110501-56-9	163401	28	71	1	75	26	1	0	9	9487
19 1H-1,2,4-Triazole, 3-nitro-	114	C2H2N4O2	7	*	024807-55-4	7791	22	67	2	84	36	1	0	7	9359
20 2,5-Piperazinedione	114	C4H6N2O2	7	*	000106-57-0	7840	22	58	2	27	19	1	0	7	9689

Şekil 3.14. NPIP kütüphane taraması

Şekil 3.13’de verilen kromatogramda 16,926 alıkonma zamanında çıkan pikin kütüphane taraması (Şekil 3.14) yapılmış ve kütüphanede oransal olarak NPIP maddesi verilmemiştir. Dolayısıyla bu yolla doğrulama yapılamamıştır fakat cihazda okutulan NPIP maddesi sertifikalı bir referans malzeme olduğu için bu pikin söz konusu maddeye ait olduğu bilindiğinden alıkonma zamanı kaydedilmiştir.

e) NDiBA

Şekil 3.15’de verilmiş olan kromatograma göre alıkonma süresi (tr) 18,241 olan pikin kütle spektrumu ve kütüphane taraması sonuçları (Şekil 3.16) incelendiğinde NDiBA maddesine ait olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 3.15. NDiBA kromatogramı

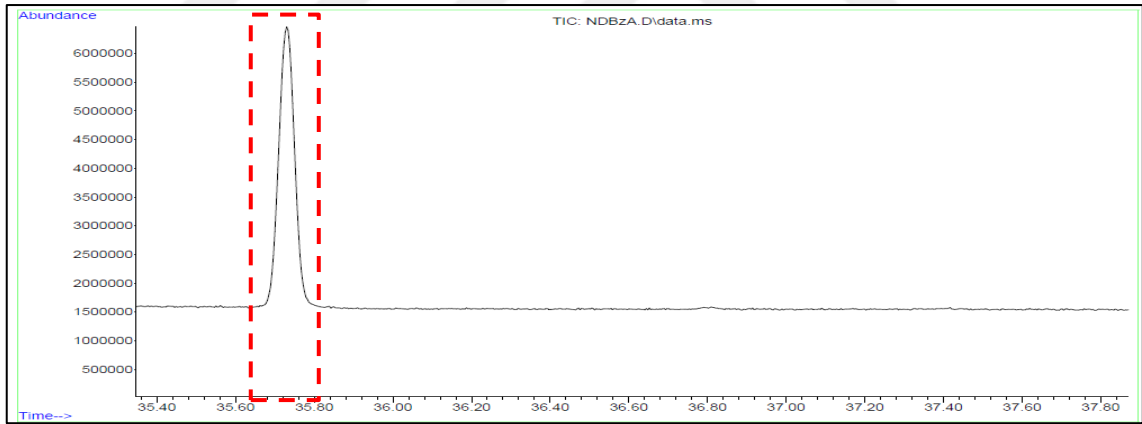
Average of 17.560 to 20.210 min.: NDiBA.D\data.ms
NDiBA

Ra	Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dk	F1	%	Co	C1	Ti	Re	XCORR
1	1-Pipecolinic acid	156	C ₈ H ₁₃ NO ₂	43	*	000997-95-5	33817	63	46	0	56	34	27	14	47	9207
2	2-Pipecolinic acid	156	C ₈ H ₁₃ NO ₂	43	*	003105-95-1	14322	34	47	1	94	43	18	0	39	7766
3	Aziridine, 2-methyl-3-(1-methylethyl)-	99	C ₆ H ₁₃ N	43	*	010027-95-9	3949	39	59	1	71	43	18	0	39	8248
4	2-(2-Hydroxyethyl)piperidine	129	C ₇ H ₁₅ NO	38	*	001484-84-0	14462	44	38	1	96	48	14	0	40	7546
5	2-Dodecyl-5-methylpyrrolidine	253	C ₁₇ H ₃₅ N	38	*	063896-04-8	125832	43	54	2	95	53	14	0	44	7593
6	3-Amino-s-triazole	84	C ₂ H ₄ N ₄	38	*	000061-82-5	1481	33	49	1	96	47	14	1	40	9156
7	2-Cyclohexylpiperidine	167	C ₁₁ H ₂₁ N	35	*	056528-77-9	40500	45	37	3	96	51	11	0	39	7534
8	Cyclohexylamine, N-ethyl-	127	C ₈ H ₁₇ N	35	*	005459-93-8	13274	33	49	2	75	53	11	18	40	7564
9	1H-Pyrrole-1-ethanamine, tetrahydro-.alp	128	C ₇ H ₁₂ N ₂	35	*	100035-12-6	13835	40	42	1	78	54	11	0	39	7658
10	Pyrrolidine, N-(3-methyl-3-butenyl)-	139	C ₉ H ₁₇ N	35	*	100016-14-0	19962	33	42	0	10	54	11	0	41	7537
11	1-Methyl-2-pyrrolidineethanol	129	C ₇ H ₁₅ NO	30	*	067004-64-2	14467	46	32	0	69	58	9	0	44	7415
12	Piperidine, 2-propyl-, (S)-	127	C ₈ H ₁₇ N	30	*	000458-88-8	13284	43	28	1	76	58	9	0	44	7471
13	Pyrimidin-2,4-dione, 1,2,3,4-tetrahydro-	269	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	30	*	141039-01-2	142334	55	67	3	89	56	9	0	49	7465
14	2-Pyrrolidinepropanol, 1-methyl-	143	C ₈ H ₁₇ NO	27	*	014498-44-3	22684	36	42	1	92	58	8	0	41	7415
15	1-Aminocyclopentane hydroxamic acid	144	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	27	*	062104-33-0	22919	34	42	2	73	56	8	0	41	7585
16	Procyclidine	287	C ₁₉ H ₂₉ NO	27	*	000077-37-2	162653	36	64	1	73	57	8	0	41	7453
17	Pyrrolidine, 1-[2-(4-bromophenoxy)ethyl]	269	C ₁₂ H ₁₆ BrNO	27	*	001081-73-8	142321	34	59	1	85	57	8	0	39	7453
18	Pyrrolidophene	351	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O	27	*	015686-97-2	229518	57	54	2	71	56	8	0	39	7471
19	Pyrrolidine, 2-hexyl-1-methyl-	169	C ₁₁ H ₂₃ N	27	*	003447-05-0	42371	34	39	2	75	56	8	0	39	7692
20	Pivalamide, N-allyl-	141	C ₈ H ₁₅ NO	25	*	100034-57-4	21222	45	49	1	56	65	7	0	44	7493

Şekil 3.16. NDiBA kütüphane taraması

f) NDBzA

Şekil 3.17’de verilen kromatograma göre alıkonma süresi (t_R) 35,730 olan pikin kütle spektrumu ve kütüphane taraması (Şekil 3.18) sonuçları incelendiğinde NDBzA maddesine ait olduğu görülmüştür.



Şekil 3.17. NDBzA kromatogramı

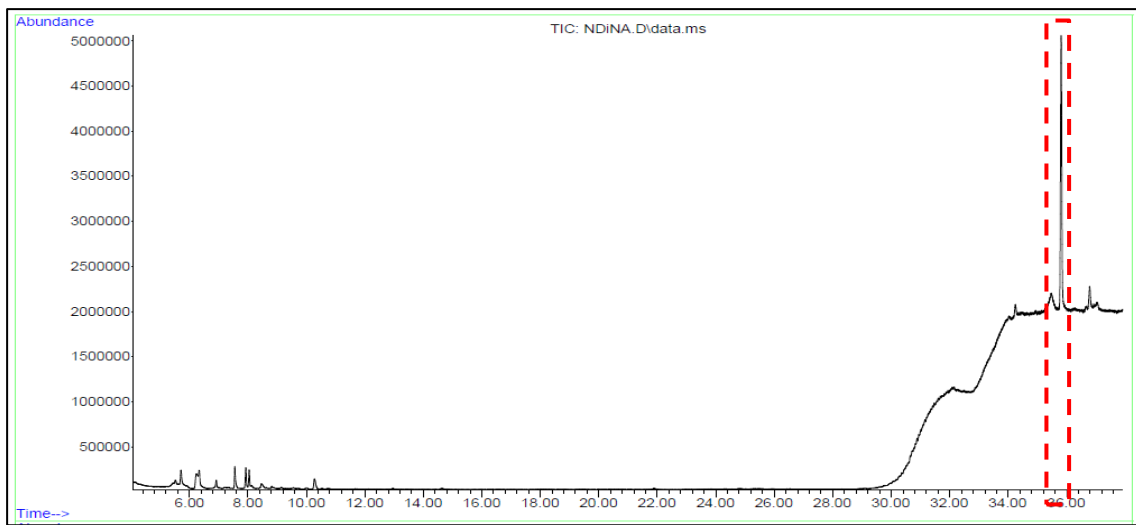
Scan 8441 (35.730 min): NDBzA.D\data.ms
NDBzA

Ra	Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dk	F1	%	Co	C1	Ti	Re	XCORR
1	Iron, tricarbonyl[(5a,5b,11a,11b-.eta.)-]	342	C ₁₈ H ₂₂ FeO ₃	90	*	069815-45-8	220862	10	94	3	99	77	59	0	97	9542
2	Benzeneethanamine, N-nitroso-N-(phenylmethyl)-	226	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O	43	*	005336-53-8	97934	73	24	1	88	45	23	13	59	9721
3	Carbonic acid, monoamide, N-benzyl-N-propan-2-yl-	207	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₂	43	*	100045-14-5	77966	49	49	3	99	48	18	0	46	9706
4	Benzeneethanamine, N-nitroso-N-(phenylmethyl)-	226	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O	43	*	005336-53-8	97936	55	37	2	84	45	18	5	40	9739
5	2-Benzylthio-1-methyl-4(3H)-quinazolinone	282	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	38	*	304449-45-4	156525	64	11	3	83	62	14	0	64	7016
6	Benzeneacetic acid, phenylmethyl ester	226	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	38	*	000102-16-9	98141	49	38	2	76	54	14	0	46	9671
7	Silane, trichloro(4-methylphenyl)-	224	C ₇ H ₇ Cl ₃ Si	35	*	000701-35-9	96196	39	50	3	99	54	11	11	40	9670
8	Benzeneacetic acid, phenylmethyl ester	226	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	35	*	000102-16-9	98132	62	29	2	72	54	11	14	43	9639
9	Benzeneacetic acid, phenylmethyl ester	226	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	35	*	000102-16-9	98140	59	31	3	86	54	11	10	43	9614
10	N-Benzyl-1H-benzimidazole	208	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	27	*	004981-92-4	79097	55	35	2	70	60	8	4	40	9125
11	1,2,5-Oxadiazol-3-amine, 4-(phenylmethoxy)-	191	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	25	*	100033-75-8	62098	46	30	3	82	65	7	0	44	9584
12	Bibenzyl	182	C ₁₄ H ₁₄	22	*	000103-29-7	53935	55	20	2	70	65	5	1	40	9585
13	Anisole, 2-(benzyloxy)-5-(2-nitrovinyl)-	285	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄	22	*	001860-56-6	160124	44	46	2	68	65	5	0	39	9587
14	Bibenzyl	182	C ₁₄ H ₁₄	22	*	000103-29-7	53936	47	25	1	67	65	5	1	40	9584
15	3-Benzyl-4-chloro-1,2,3-triazole 1-oxide	209	C ₉ H ₈ ClN ₃ O	22	*	116932-63-9	80353	37	52	3	95	65	5	1	40	9592
16	.alpha.-Benzylsuccinic acid	208	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	22	*	000884-33-3	78438	46	92	3	78	65	5	0	39	9292
17	6-Difluoromethyl-5-phenylmethanesulfonyl	316	C ₁₂ H ₁₀ F ₂ N ₂ O ₄	22	*	100031-79-5	193441	45	49	2	68	65	5	0	39	9584
18	4-Benzoyloxybenzotrile	209	C ₁₄ H ₁₁ NO	22	*	052805-36-4	80141	47	27	1	99	65	5	7	40	9586
19	Benzene, (phenoxymethyl)-	184	C ₁₃ H ₁₂ O	22	*	000946-80-5	55728	57	15	2	99	65	5	16	41	9584
20	Phenylacetic acid, 3-fluorophenyl ester	230	C ₁₄ H ₁₁ FO ₂	22	*	100033-11-6	101997	44	41	2	93	65	5	16	41	9581

Şekil 3.18. NDBzA kütüphane taraması

g) NDiNA

Şekil 3.19’da verilmiş olan kromatogramda 35,827 alıkonma zamanında çıkan pikin kütüphane taraması (Şekil 3.20) yapılmıştır. Ancak kütüphanede oransal olarak NDiNA verilmemiştir. Dolayısıyla bu yolla doğrulama yapılamamıştır fakat NDiNA sertifikalı referans maddesi kullanıldığı için bu pikin bu maddeye ait olduğu bilindiğinden alıkonma zamanı kaydedilmiştir. Tüm maddelerin alıkonma zamanları açıklanan şekilde belirlenmiş olup Çizelge 3.5’de özetlenmiştir.



Şekil 3.19. NDiNA kromatogramı

Scan 8467 (35.827 min): NDiNA.D\data.ms													
NDiNA													
Ra Name	MW	Formula	Qu	M	CAS #	Ref #	K	dk	Fl	%	Co	C1	Ti
1 2-p-Nitrophenyl-oxadiazol-1,3,4-one-5	207	C8H5N3O4	64	*	990084-34-4	211586	86	74	3	99	68	37	0
2 4-Methoxy-6-methyl-5-nitroisobenzofuran-	237	C10H7NO6	60	*	089586-40-3	316177	78	93	3	99	68	35	0
3 Indole-3-carbonitrile, 2-cyclohexylamino	267	C17H21N3	35	*	296246-82-7	426477	63	56	2	52	67	11	0
4 Ethoxy(phenyl)silanediol, 2TMS	328	C14H28O3Si3	25	*	990372-41-0	635418	79	67	2	99	64	7	0
5 Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	222	C6H18O3Si3	25	*	000541-05-9	261334	82	33	2	89	64	7	0
6 1,3,6-Trimethyl-2-trideuteriomethyltricy	225	C15H23D3O	25	*	990116-20-1	266273	35	64	3	99	64	7	18
7 (+)-(1S,2R,4aS,8aS)-Octahydro-2,5,5,8a-t	222	C15H26O	22	*	990116-11-2	266090	62	11	3	99	64	5	0
8 1-(4-Methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]pheny	222	C12H18O2Si	22	*	097389-70-3	263679	34	55	3	99	64	5	0
9 6-Decyloxynaphthalene-2-carbonitrile	309	C21H27NO	20	*	066217-28-5	575081	71	50	2	56	68	4	28
10 8-Fluoro-6-methyltetrazolo[1,5-c]pyrimid	169	C5H4FN5O	18	*	144877-46-3	103126	37	42	2	75	68	3	13
11 2-[(Cyclohexylamino)methyl]-1-methyl-1H-	267	C17H21N3	18	*	296246-82-7	426478	53	68	2	52	67	3	0
12 1H-Indole-3-carbonitrile, 2-(4-chloroben	344	C17H13ClN2O2	18	*	990410-46-1	685352	55	66	2	54	68	3	0
13 (4-Phenylphenyl)amine	169	C12H11N	18	*	000092-67-1	104386	36	45	2	64	68	3	16
14 [1,1'-Biphenyl]-4-amine	169	C12H11N	18	*	000092-67-1	104384	52	34	2	51	68	3	0
15 [1,1'-Biphenyl]-4-amine	169	C12H11N	18	*	000092-67-1	104379	61	24	1	51	68	3	20
16 2-Methyl-6-(5-methyl-2-thiazolin-2-ylami	207	C10H13N3S	14	*	339352-50-0	212143	37	12	3	99	68	2	0
17 (3-Phenylphenyl)amine	169	C12H11N	14	*	002243-47-2	104423	33	30	2	68	68	2	0
18 4-Methoxy-3-nitro-phenol	169	C7H7NO4	14	*	990029-94-5	103293	34	51	3	52	68	2	0
19 4-Methyl-2-trimethylsilyloxy-acetophenon	222	C12H18O2Si	14	*	097389-70-3	263678	37	66	3	73	68	2	0
20 Fumaric acid, 4-heptyl pentyl ester	284	C16H28O4	14	*	990263-70-0	487073	70	54	3	56	68	2	0

Şekil 3.20. NDiNA Kütüphane Taraması

Çizelge 3.5. Yedi Adet Nitrozamin Maddesinin Alıkonma Süreleri

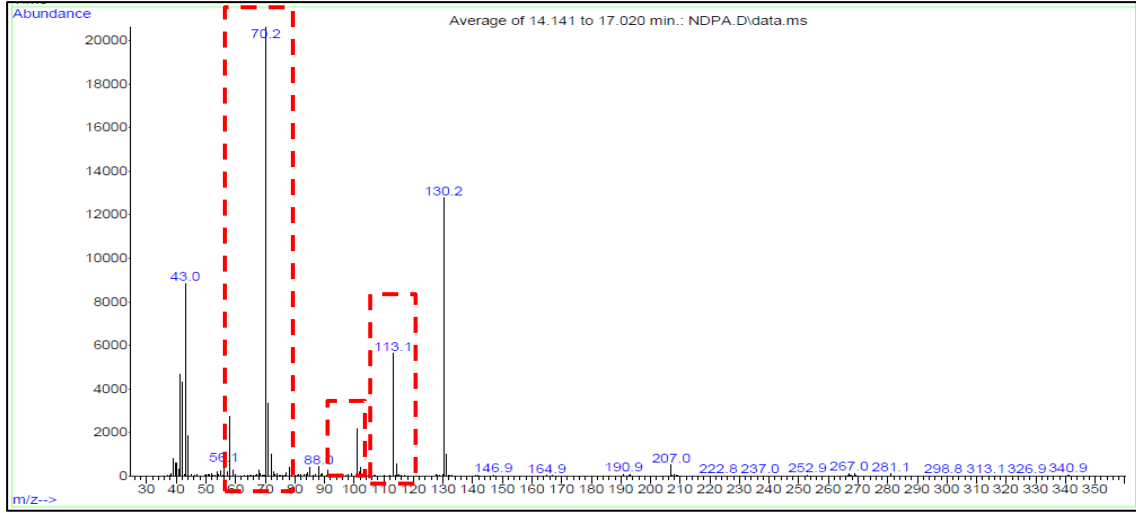
Madde	Alıkonma Süresi (t _R), dk
NDPA	14,955
NMOR	15,270
NPYR	15,704
NPIP	16,926
NDiBA	18,241
NDBzA	35,730
NDiNA	35,827

3.3.1.2. Hedef ve Tanımlayıcı İyonların Belirlenmesi

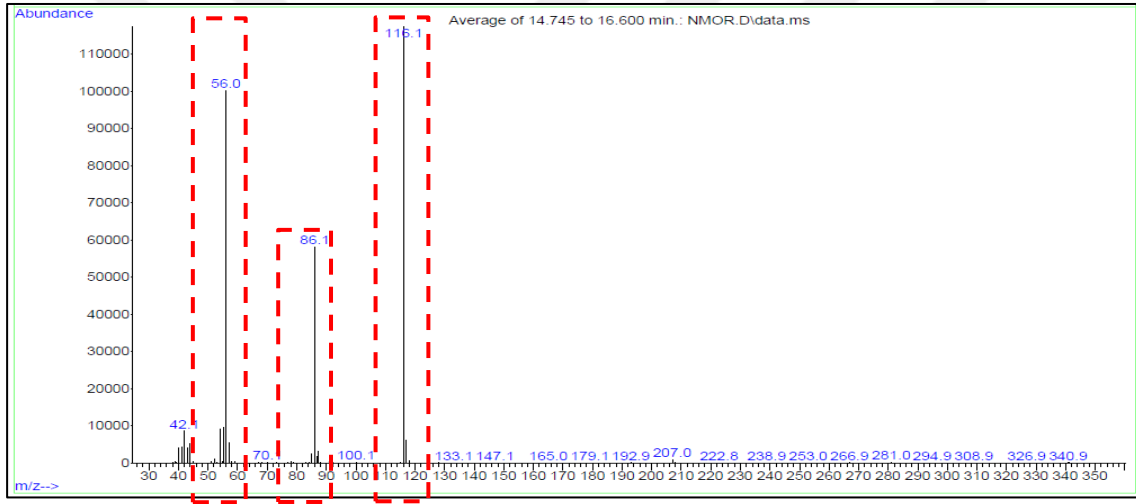
Maddelerin alıkonma zamanları belirlendikten sonra bu piklere ait kütle spektrumları incelenmiş olup Şekil 3.21-3.27’de verilmiştir. Elde edilen verilerle, ilgili standartlar, uygulama notları ve literatür çalışmaları karşılaştırılmış ve sonuçları Çizelge 3.6’da verilmiştir. Bu veriler ışığında maddelerin spektrumlarına da bakılarak spektrumdaki en yüksek pik hedef iyon olarak seçilmiş ve diğer pikler arasından tanımlayıcı iyonlar belirlenmiş ve şekillerde işaretlenmiş olan iyonlar özet olarak Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Hedef ve tanımlayıcı iyon literatür taraması

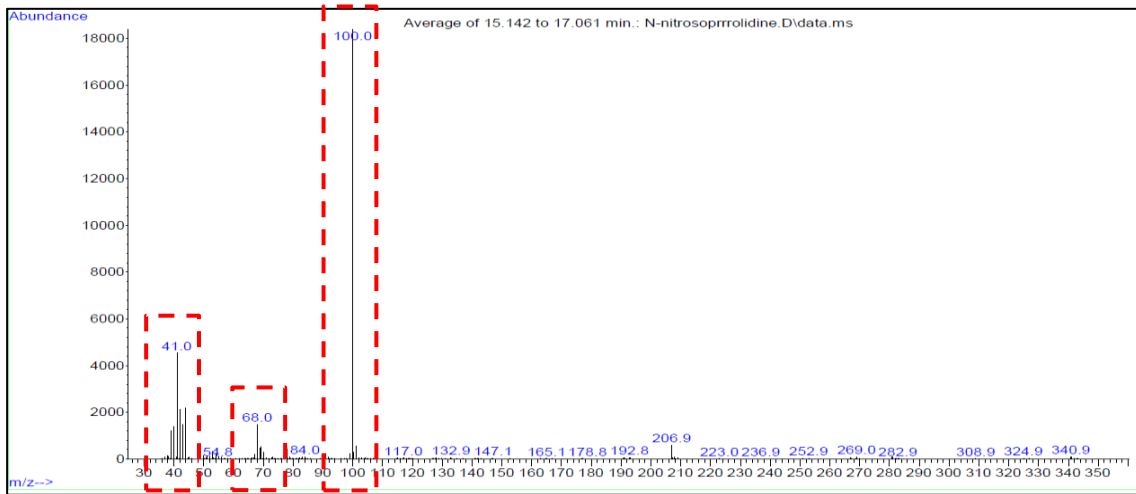
Kaynak	[13]		[12]		[82]		[18]		[95]	
Madde	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2
NDPA	131.1	89.1 43.1	131.1	89.1 43.1	130	113 43	70.1	113.1 130.1	70	42 43 130
NMOR	117.0	86.9 85.9	117.0	86.9 85.9	116	86 56	-	-	56	86 116
NPYR	-	-	-	-	100	55 70	100.1	71.1 85.1	100	41 42 68
NPIP	115.1	69.1 40.9	115.1	69.1 40.9	114	84 97	114.1	71.1 85.1	114	42 44 55
NDiBA	159.1	57.1 103.0	159.1	57.1 103.0	115	84 57	-	-		
NDBzA	226.9	91.1 65.1	226.9	91.1 65.1	-	-	-	-		
NDiNA	299.0	57.1 71.1	299.0	57.1 173.1	-	-	-	-		



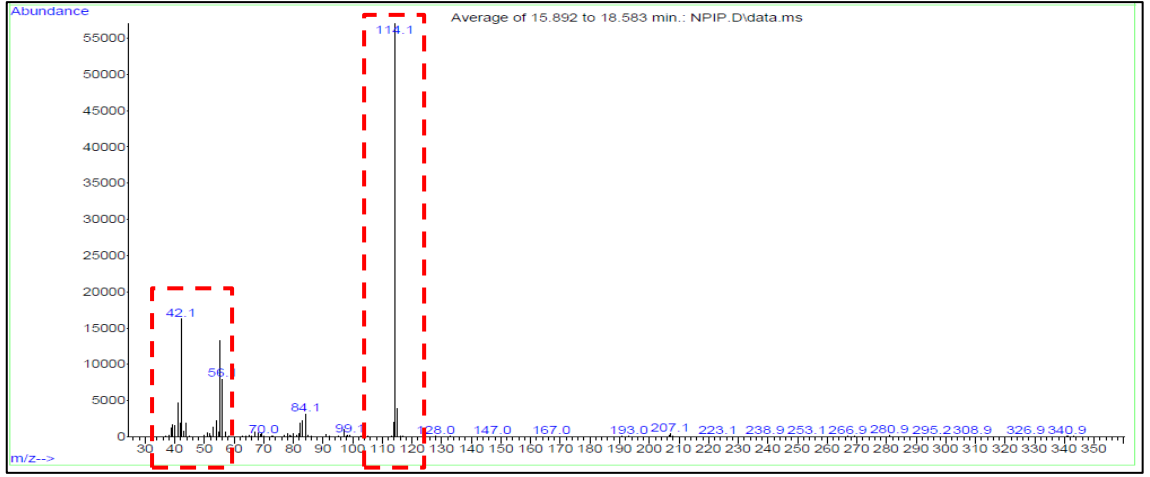
Şekil 3.21. NDPA kütle spektrumu



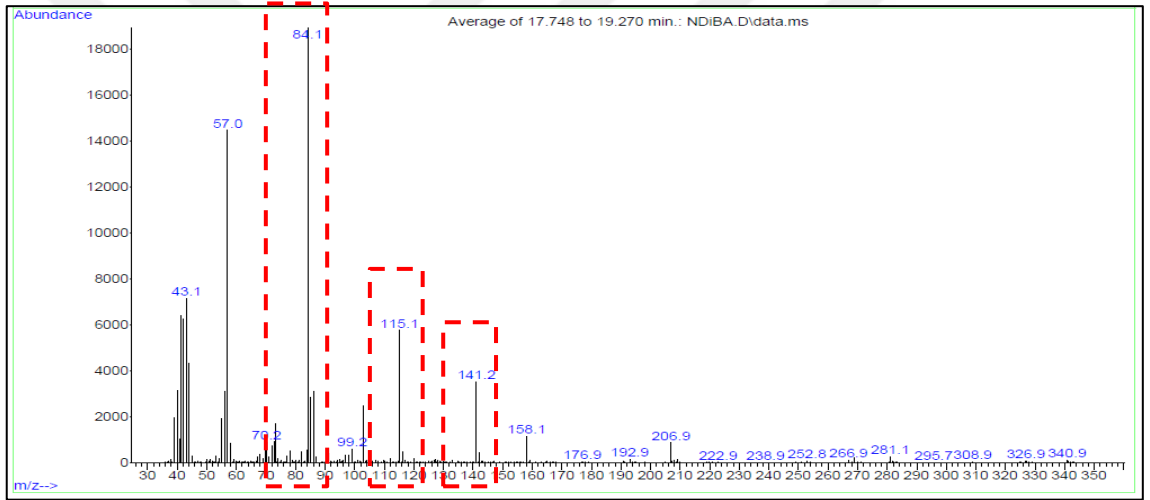
Şekil 3.22. NMOR kütle spektrumu



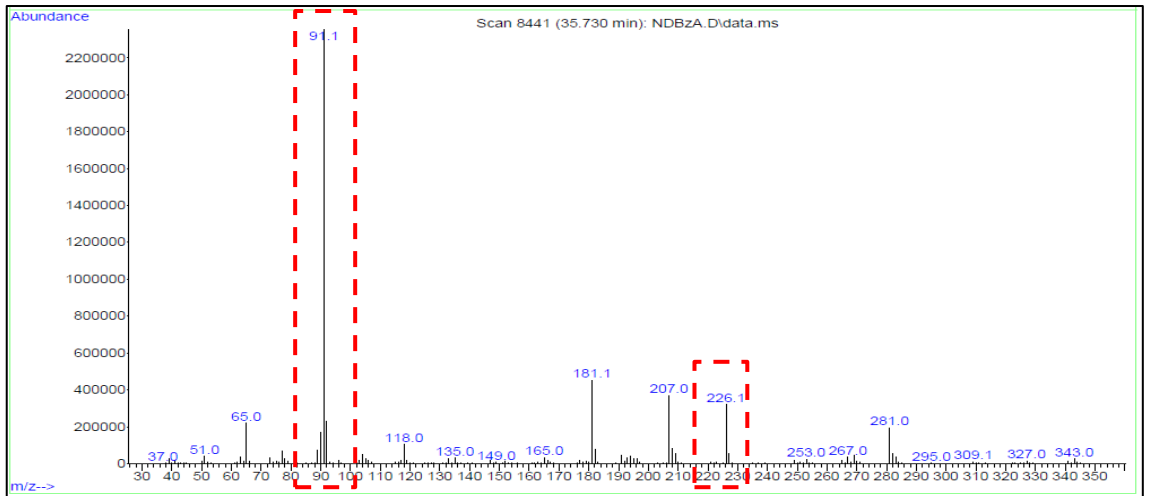
Şekil 3.23. NPYR kütle spektrumu



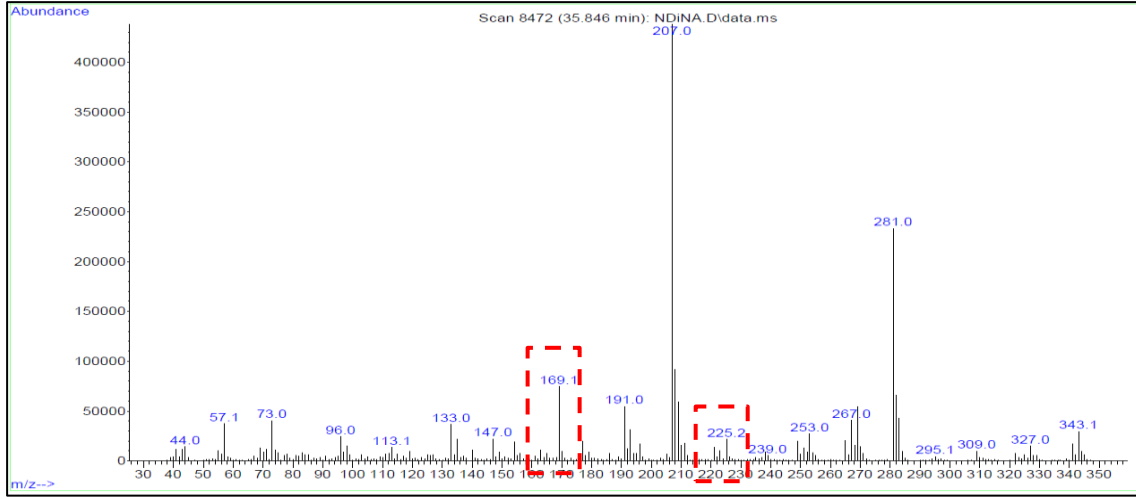
Şekil 3.24. NPIP kütle spektrumu



Şekil 3.25. NDiBA kütle spektrumu



Şekil 3.26. NDBzA kütle spektrumu



Şekil 3.27. NDiNA kütle spektrumu

Çizelge 3.7. Belirlenmiş hedef ve tanımlayıcı iyonlar

Madde	Q1	Q2
NDPA	70.2	101.0 113.1
NMOR	116.1	56.0 86.1
NPYR	100.0	41.0 68.0
NPIP	114.1	42.1 56.1
NDiBA	84.1	115.1 141.2
NDBzA	91.1	226.1
NDiNA	169.1	225.2

3.3.2. SIM (Selected Ion Monitoring) Modda Yapılan Çalışmalar

Tüm maddeler için SCAN modda belirlenen alıkonma süreleri ile hedef ve tanımlayıcı iyonlar kullanılarak, hedef analite yönelik bir analiz metodu oluşturabilmek amacıyla SIM modunda metot oluşturma çalışmalarına devam edilmiştir. Metot parametreleri belirlenirken Çizelge 3.8’de özet halinde sunulmuş olan uygulama notları, standart ve literatür çalışmaları verilerinden faydalanılmıştır. Bu veriler ışığında, tıbbi malzemelerden süzulebilen nitrozamin ve nitrozlanabilen madde analizi yapmak amacıyla oluşturulan GC-MS metot parametreleri Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.8. Nitrozamin analizi GC-MS metot parametrelerinin karşılaştırması

	Metotlar					
Kaynak	[96]	[97]	[12]	[98]	[99]	[80]
GC Koşulları						
Enjeksiyon Modu	Splitless (bölüntüsüz)	Split (bölüntülü)	Split/ Splitless	Pulsed Splitless	Splitless	Splitless
Taşıyıcı Gaz	Helyum	Helyum	Helyum	Helyum	Helyum	Helyum
	2,1 mL/dk	1 mL/dk	40 mL/dk	1 mL/dk	1 mL/dk	1 mL/dk
	Sabit akış	Sabit akış	Sabit akış	Sabit akış	Sabit akış	Sabit akış
Giriş Sıcaklığı	250 °C	220 °C	250 °C	250 °C		-
Enjeksiyon Hacmi	1 µL	-	-	2 µL	2 µL	-
Analitik Kolon	Agilent J&W DB-624	Agilent J&W DB-1701	DB-FFAP	-	Agilent HP-5MS UI	5% polysilarylene polydimethylsiloxane capillary ZB, 5 ms
	30 m × 0,25 mm × 1,40 µm	30 m × 250 µm × 1,0 µm	30 m × 0,53 mm × 1,5 µm		30 m × 0,25 mm × 0,25 µm	30 m × 0,25 mm × 0,25 m
Fırın Programı	60 °C 5 dk	40 °C 0,5 dk	60 °C 0,2 dk	40 °C 0,5 dk	50 °C 3 dk	50 °C 1 dk
	20 °C/dk ile 120 °C 5 dk	20 °C/dk ile 160 °C 2 dk	15 °C/dk ile 82 °C	20 °C/dk ile 200 °C 0 dk	20 °C/dk ile 80 °C 2 dk	3 °C/dk ile 80 °C 1 dk
	3 °C/dk ile 140 °C 3 dk	10 °C/dk ile 240 °C 2 dk	1 °C/dk ile 88 °C	60 °C/dk ile 250 °C 3 dk	5 °C/dk ile 100 °C 2 dk	1 °C/dk ile 85 °C 1 dk
	20 °C/dk ile 160 °C 5 dk	20 °C/dk ile 160 °C 2 dk	15 °C/dk ile 140 °C 7 dk	20 °C/dk ile 160 °C 2 dk	35 °C/dk ile 280 °C 2,36 dk	10 °C/dk ile 290 °C 5 dk
	40 °C/dk ile 240 °C 8 dk		25 °C/dk ile 250 °C 10 dk			
	Postrun 250 °C 2 dk					
MS Koşulları						
Mod	Elektron Yakalama	-	-	Elektron Yakalama	Elektron Yakalama	Elektron Yakalama
Transfer Hattı Sıcaklığı	250 °C	-	-	250 °C	250 °C	-
Çözücü Gecikmesi	4 dk	-	-	6,5 dk	4,01 dk	-
Kaynak Sıcaklığı	230 °C	230 °C	-	250 °C	230 °C	-
Quadrupole Sıcaklığı	150 °C	150 °C	-	150 °C	150 °C	-

Çizelge 3.9. Oluşturulan GC-MS-SIM metot parametreleri

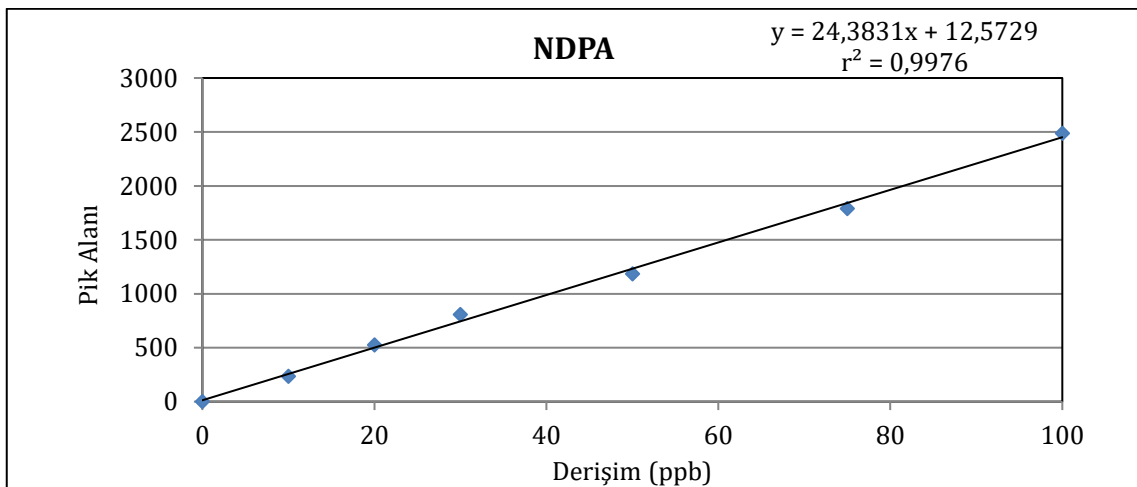
GC	Agilent Intuvo 9000 GC Sistemi			
Autosampler	Agilent 7693A enjektör ve numune tablası			
Enjeksiyon Modu	Splitless			
Taşıyıcı Gaz	Helyum			
Kolon Akış Hızı	2.1 mL/dk sabit akış			
Giriş Sıcaklığı	250 °C			
Enjeksiyon Hacmi	1 µL			
Purge Akışı	50 mL/dk-0,75dk			
Gaz Tasarrufu	Açık (20 mL/dk- 5,0dk'dan sonra)			
Kolon	Agilent 122-1334UI-INT:US20360306 DB-624 UI 30 m x 250 µm x 1.4 µm			
Fırın Sıcaklık Programı	°C/dk	°C	Bekleme Süresi, dk	Analiz Süresi, dk
		60	5	5
	20	120	5	13
	3	140	3	22,667
	20	160	5	28,667
	40	240	2	32,667
	40	250	4	36,917
	Post Run: 255 °C, 2dk			
MS	Agilent 5977B GC-MSD Sistemi			
Mod	Elektron Yakalama, 70 eV			
Transfer line sıcaklığı	250°C			
Solvent gecikmesi	6 dk			
Source sıcaklığı	230°C			
Quadrupole Sıcaklığı	150°C			
Gain Factor	1			
EM Voltage	1061			

3.3.2.1. İç Standart Kullanmadan Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

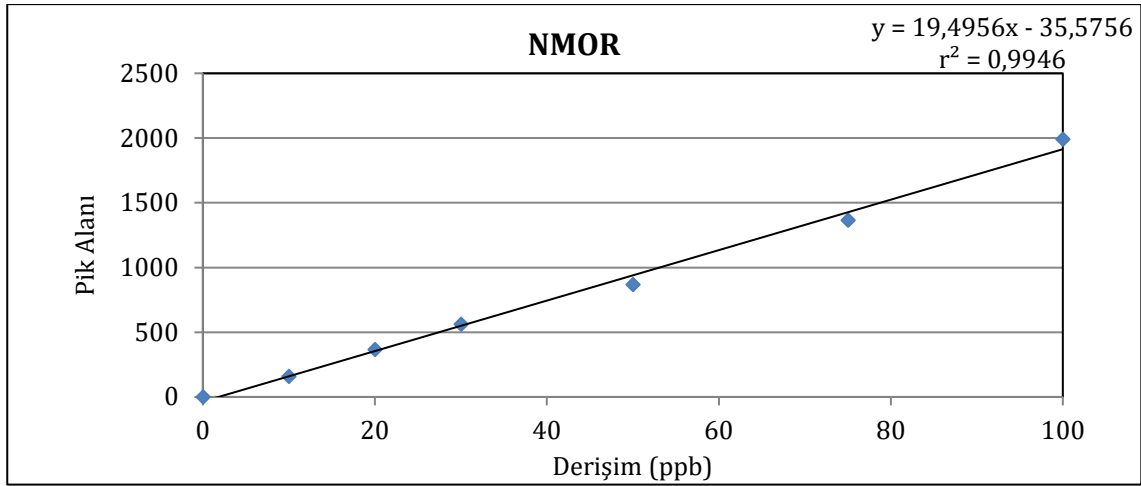
Çizelge 3.1’de bilgileri verilmiş olan referans malzeme karışımı kullanılarak çözeltiler hazırlanırken, sertifikalarında belirtildiği üzere çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanıp GC-MS cihazında analiz edilmiş ve derişime karşı hesaplanan pik alanları grafiğe geçirilmiştir. Çizelge 3.10’da yedi adet nitrozamin maddesine ilişkin kalibrasyon değerleri ve sonrasında bu değerlere karşılık gelen kalibrasyon eğrileri verilmiştir.

Çizelge 3.10. Kalibrasyon Verileri (iç standart kullanmadan)

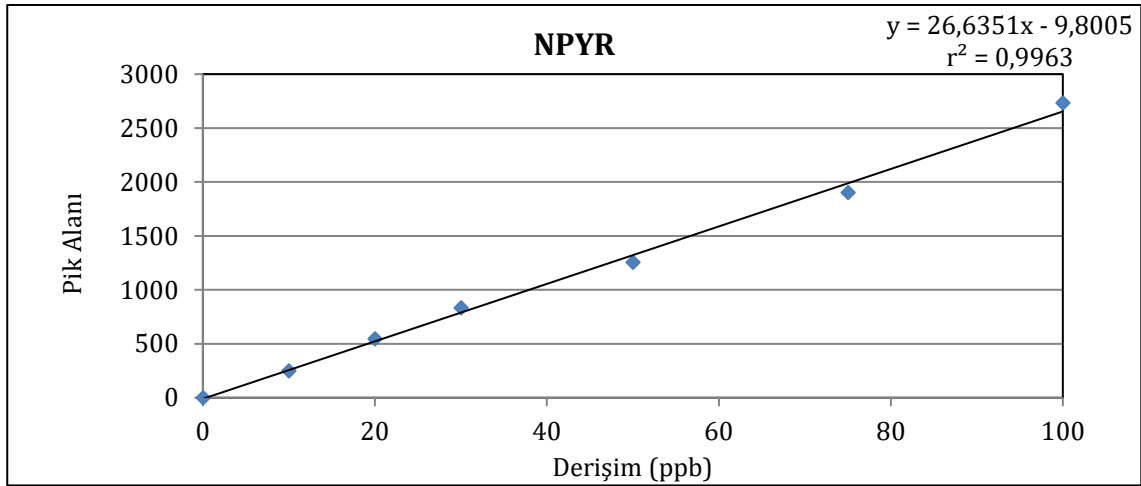
Madde	Derişim	10 µg/L	20 µg/L	30 µg/L	50 µg/L	75 µg/L	100 µg/L
NDPA	t _R	14,85	14,87	14,86	14,87	14,87	14,87
	Derişim	10,92	19,00	29,87	47,32	72,79	103,14
	Alan	258,23	490,76	803,71	1306,15	2039,66	2913,42
NMOR	t _R	15,12	15,15	15,15	15,14	15,14	15,15
	Derişim	10,76	21,31	31,09	46,59	71,82	103,43
	Alan	158,06	366,60	560,12	866,50	1365,52	1990,61
NPYR	t _R	15,59	15,61	15,61	15,61	15,60	15,61
	Derişim	9,90	21,09	31,78	47,56	71,77	102,90
	Alan	249,48	548,33	833,76	1255,35	1902,18	2733,58
NPiP	t _R	16,81	16,83	16,82	16,82	16,82	16,83
	Derişim	8,46	21,02	31,96	49,25	73,30	101,02
	Alan	269,08	667,28	1014,13	1562,41	2325,09	3204,04
NDiBA	t _R	18,24	18,25	18,25	18,25	18,24	18,25
	Derişim	8,88	20,95	32,47	48,03	73,00	101,66
	Alan	235,09	528,17	807,90	1185,79	1792,07	2488,17
NDBZA	t _R	35,63	35,64	35,64	35,64	35,64	35,64
	Derişim	9,93	20,90	31,77	47,77	71,87	102,76
	Alan	663,95	1359,51	2048,40	3063,33	4591,70	6550,53
NDiNA	t _R	35,72	35,73	35,73	35,72	35,73	35,73
	Derişim	10,89	20,27	31,00	48,53	70,69	103,52
	Alan	127,08	237,51	363,86	570,24	831,07	1217,59



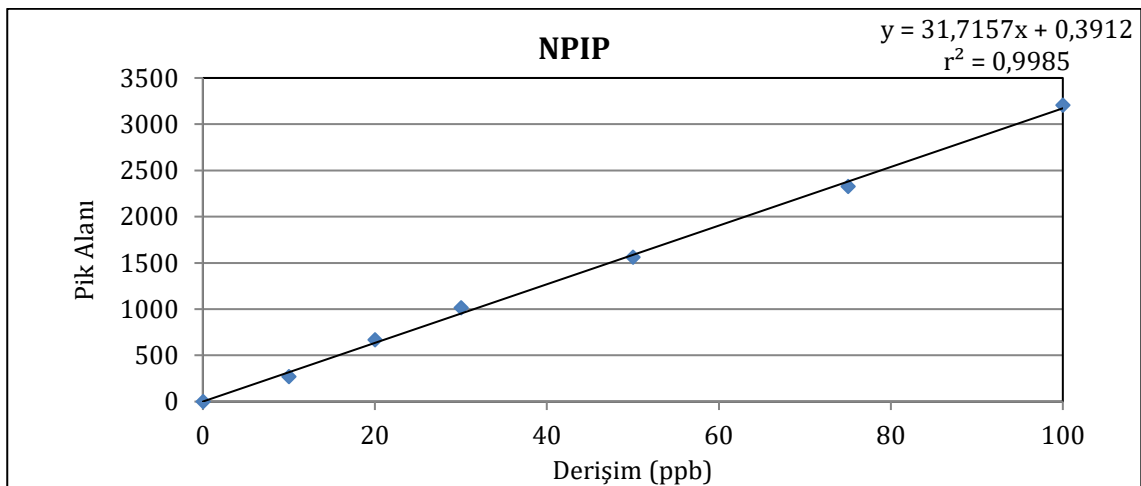
Şekil 3.28. NDPA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



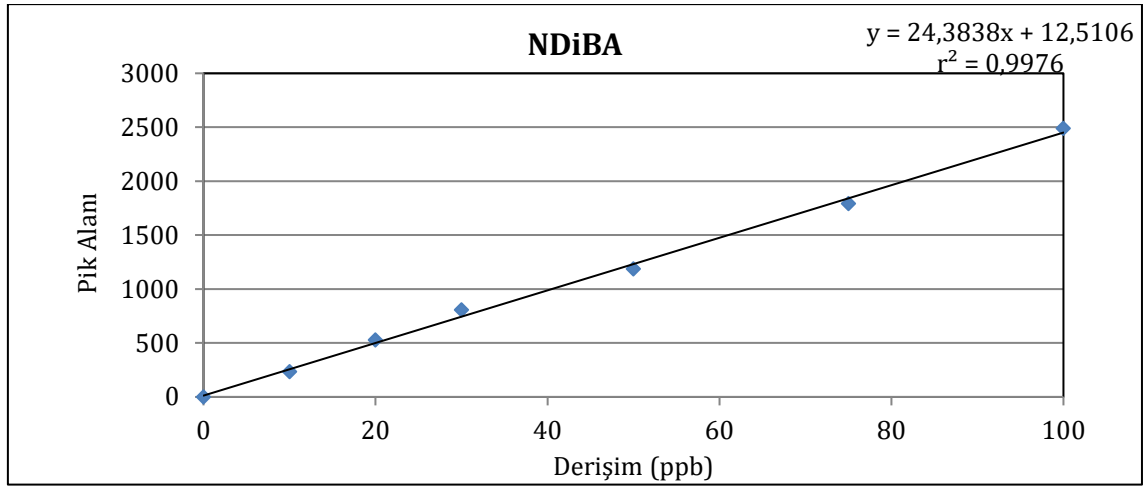
Şekil 3.29. NMOR Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



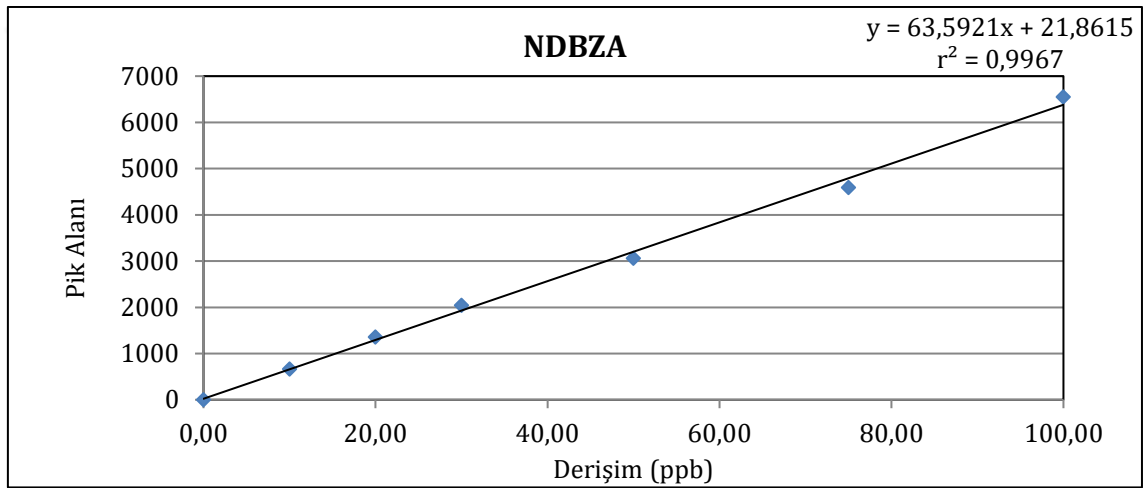
Şekil 3.30. NPYR Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



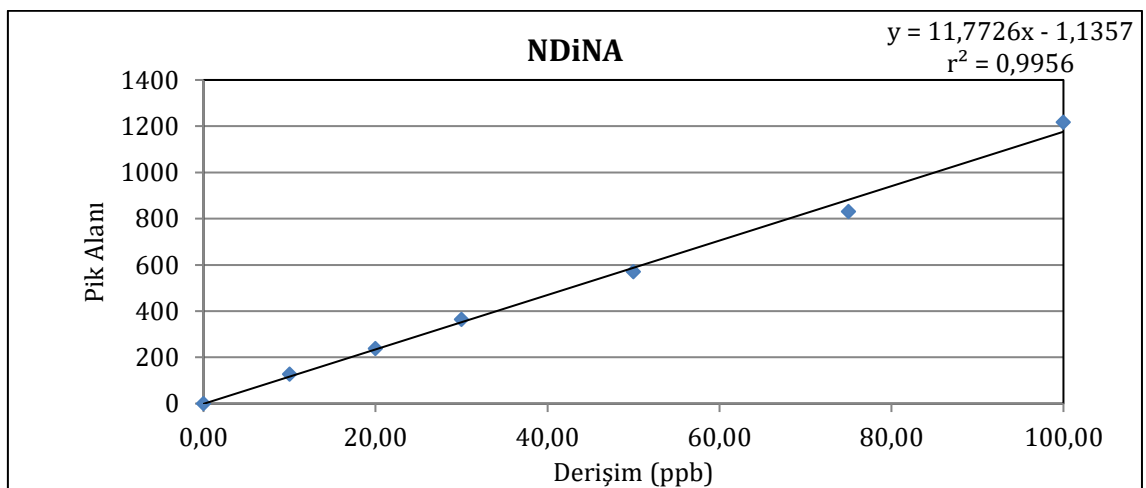
Şekil 3.31. NPIP Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



Şekil 3.32. NDiBA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



Şekil 3.33. NDBzA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)



Şekil 3.34. NDiNA Kalibrasyon Eğrisi (iç standart kullanmadan)

Şekil 3.28-3.34’de verilmiş olan 7 adet nitrozamin maddesinin kalibrasyon eğrileri çizdirildikten kısa bir süre sonra tekrarlanabilirlik şartları (kısa zaman aralığı, aynı laboratuvar, aynı cihaz, aynı analizci) altında çözücü körüne (metanol), 100 µg/L referans nitrozamin karışımından eklenerek yedi farklı geri kazanım çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalamaları ($\bar{x}$), standart sapmaları (SD), % bağıl standart sapmaları (%RSD) ve geri kazanım değerleri (%R) aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.11’de verilmiştir.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.1)$$

$$\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (2.3)$$

$$\%R = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} * 100 \quad (2.9)$$

Çizelge 3.11. İç standart kullanmadan yapılan tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

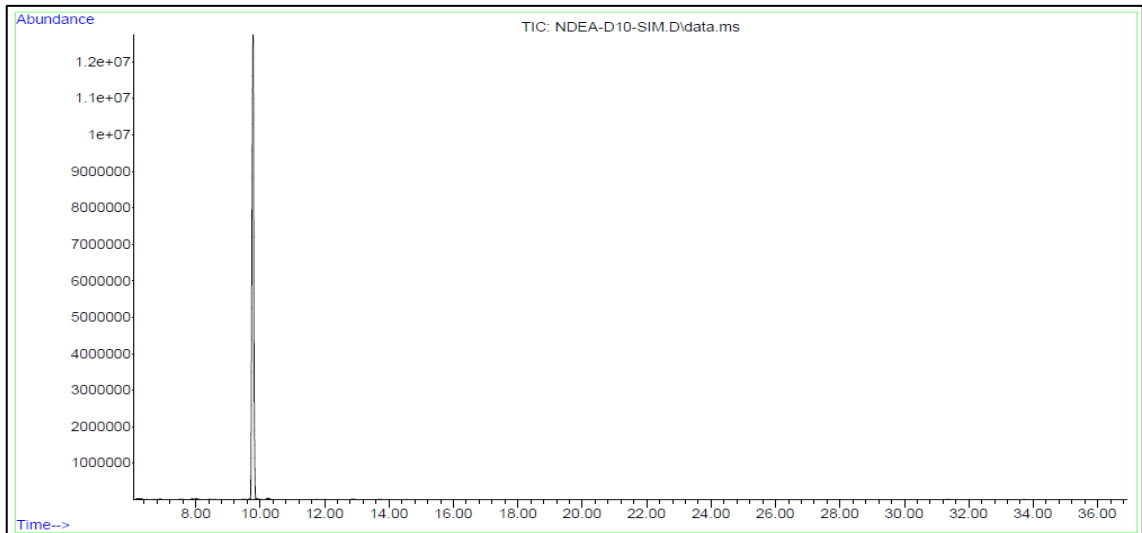
		$x_{ref} = 100 \mu\text{g/L}$			
Madde	r^2	$\bar{x}$	SD	%RSD	%R
NDPA	0,9976	177,5	7,6	4,3	177,5
NMOR	0,9946	191,2	7,2	3,8	191,2
NPYR	0,9963	215,8	9,3	4,3	215,8
NPIP	0,9985	197,7	8,6	4,4	197,7
NDiBA	0,9976	234,7	6,8	2,9	234,7
NDBzA	0,9967	230,2	17,5	7,6	230,2
NDiNA	0,9956	177,8	11,8	6,7	177,8

Bu çalışma sonucunda geri kazanım değerlerinin kabul kriterlerinin (%95±30) çok üzerinde olduğu görülmüştür. Bunun da kalibrasyonun kısa sürede bozulmasından ve sık sık kalibrasyon yenilemeye ihtiyaç olmasından kaynaklandığı yönünde değerlendirme yapılmıştır. Çalışmaların iç standart varlığında yürütülmesinin kromatografik yöntemlerde bu probleme çözüm olacağı bilinmektedir. İç standardın dedektörde verdiği

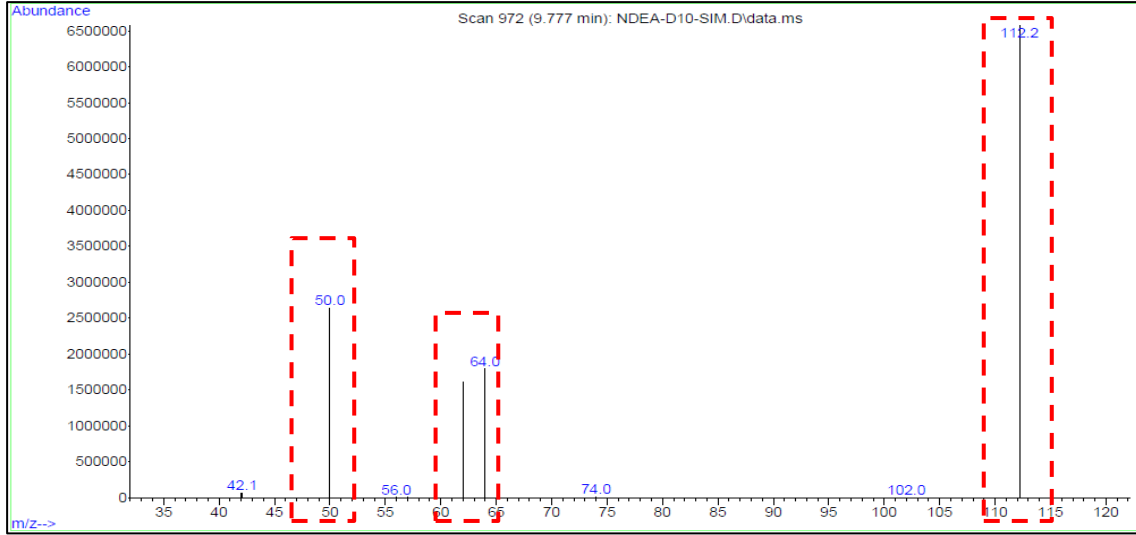
cevap yaklaşık olarak aynı kaldığı sürece, iç kalite kontrol yapmak şartıyla uzun bir zaman diliminde aynı kalibrasyon üzerinden çalışmalar sağlıklı bir şekilde yürütülebilmektedir. Böylece cihazın doğru sonuçlar ürettiğini tespit etmek ve uzun süre tekrarlanabilir sonuçlar almak mümkün olacaktır. Bu nedenle, sonuçların güvence altına alınması amacıyla metot oluşturma ve geçerli kılma çalışmalarının tüm aşamalarında iç standart kullanılmasına karar verilmiştir.

3.3.2.2. İç Standart Kullanarak Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

Bu çalışmada iç standart olarak Bölüm 3.1- Çizelge 3.2’de özellikleri verilen N-nitrosodiethylamine-d10 (NDEA-d10) maddesi kullanılmıştır. NDEA-d10, GC-MS cihazında analiz edilmiş ve Şekil 3.35’de verilmiş olan iyon kromatogramında 9,777 alıkonma zamanında pik vermiştir. Maddenin kütle spektrumuna (Şekil 3.36) bakıldığında 112.2 piki hedef iyon olarak seçilmiş ve 50.0, 62.0 ve 64.0 pikleri ise tanımlayıcı iyonlar olarak belirlenmiştir. Bu veriler GC-MS cihazında metoda iç standart parametresi eklenerek girilmiş ve tüm nitrozamin maddelerine iç standart olarak NDEA-d10 bağlanmıştır.



Şekil 3.35. NDEA-d10 kromatogramı



Şekil 3.36. NDEA-d10 spektrumu

NDEA-d10, derişimi 100 µg/L olacak şekilde tüm kalibrasyon noktalarına aynı miktarda ilave edilerek kalibrasyon çözeltileri yeniden hazırlanmıştır. İç standart kullanılarak yapılan kalibrasyon çalışmasının sonuçları Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. İç standart (ISTD) kullanılarak yapılan kalibrasyon verileri

Madde		Blank	10 µg/L	20 µg/L	30 µg/L	50 µg/L	75 µg/L	100 µg/L
NDPA	t _R		14,84	14,85	14,85	14,84	14,84	14,84
	Derişim		11,52	20,77	28,17	48,37	75,43	100,73
	Alan		211,25	442,85	642,26	1240,14	1848,00	2990,57
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51
NMOR	t _R		15,11	15,12	15,11	15,12	15,12	15,11
	Derişim		10,71	18,67	31,61	48,12	75,96	99,94
	Alan		302,78	546,47	964,65	1585,44	2350,20	3716,94
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51
NPYR	t _R		15,58	15,58	15,58	15,57	15,57	15,57
	Derişim		11,00	19,93	30,49	47,81	74,60	101,16
	Alan		478,20	912,99	1460,07	2485,11	3650,31	5960,05
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51
NPIP	t _R		16,80	16,79	16,80	16,80	16,80	16,80
	Derişim		11,09	20,35	30,56	46,65	75,11	101,25
	Alan		525,81	1014,09	1587,69	2627,10	3982,83	6462,55
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51
NDiBA	t _R		18,22	18,22	18,23	18,22	18,23	18,23
	Derişim		10,21	20,40	31,07	46,96	76,06	100,31
	Alan		419,49	878,84	1390,54	2270,54	3456,37	5480,88
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51

	t _R		35,63	35,63	35,63	35,63	35,62	35,63
NDBzA	Derişim		11,13	20,33	29,87	47,67	74,90	101,10
	Alan		1321,09	2507,72	3821,76	6599,60	9739,88	15812,09
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51
	t _R		35,72	35,71	35,71	35,71	35,71	35,71
NDiNA	Derişim		12,50	19,41	29,54	47,89	73,41	102,25
	Alan		167,28	295,15	493,74	899,99	1321,91	2238,30
ISTD	Alan	25060,91	25866,93	25815,40	26385,41	28213,09	26314,21	31544,51

İç standardın varlığında bu verilere istinaden cihazda iç standarda karşılık gelen bağıl derişim ve bağıl alanlar hesaplanarak kalibrasyonun doğrusallığında iyileştirme sağlanmıştır. Bu da iç standart kullanarak metot kalibrasyonun uzun süre verimli kullanılması yönünde bir avantaj sağlamaktadır. Kalibrasyon eğrisi, her bir nitrozaminin toplam iyon kromatogramındaki pik alanının, iç standarda ait pikin alanına bölünmesiyle elde edilen bağıl alana karşı bağıl derişim değerine göre çizilmiştir. Bağıl cevap değeri (bağıl alan) ve bağıl derişimler Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2 ile hesaplanmış olup Çizelge 3.13-3.19’da değerleri verilmiştir.

$$\text{Bağıl alan: } \frac{\text{Analitin pik alanı}}{\text{İç standardın pik alanı}} \quad (3.1)$$

$$\text{Bağıl derişim: } \frac{\text{Analitin derişimi}}{\text{İç standardın derişimi}} \quad (3.2)$$

Çizelge 3.13. NDPA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NDPA	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	211	25867	0,0082
	20	100	0,20	443	25815	0,0172
	30	100	0,30	642	26385	0,0243
	50	100	0,50	1240	28213	0,0440
	75	100	0,75	1848	26314	0,0702
	100	100	1,00	2991	31545	0,0948

Çizelge 3.14. NMOR maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NMOR	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	303	25867	0,0117
	20	100	0,20	546	25815	0,0212
	30	100	0,30	965	26385	0,0366
	50	100	0,50	1585	28213	0,0562
	75	100	0,75	2350	26314	0,0893
	100	100	1,00	3717	31545	0,1178

Çizelge 3.15. NPYR maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NPYR	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	478	25867	0,0185
	20	100	0,20	913	25815	0,0354
	30	100	0,30	1460	26385	0,0553
	50	100	0,50	2485	28213	0,0881
	75	100	0,75	3650	26314	0,1387
	100	100	1,00	5960	31545	0,1889

Çizelge 3.16. NPIP maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NPIP	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	526	25867	0,0203
	20	100	0,20	1014	25815	0,0393
	30	100	0,30	1588	26385	0,0602
	50	100	0,50	2627	28213	0,0931
	75	100	0,75	3983	26314	0,1514
	100	100	1,00	6463	31545	0,2049

Çizelge 3.17. NDiBA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NDiBA	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	419	25867	0,0162
	20	100	0,20	879	25815	0,0340
	30	100	0,30	1391	26385	0,0527
	50	100	0,50	2271	28213	0,0805
	75	100	0,75	3456	26314	0,1314
	100	100	1,00	5481	31545	0,1738

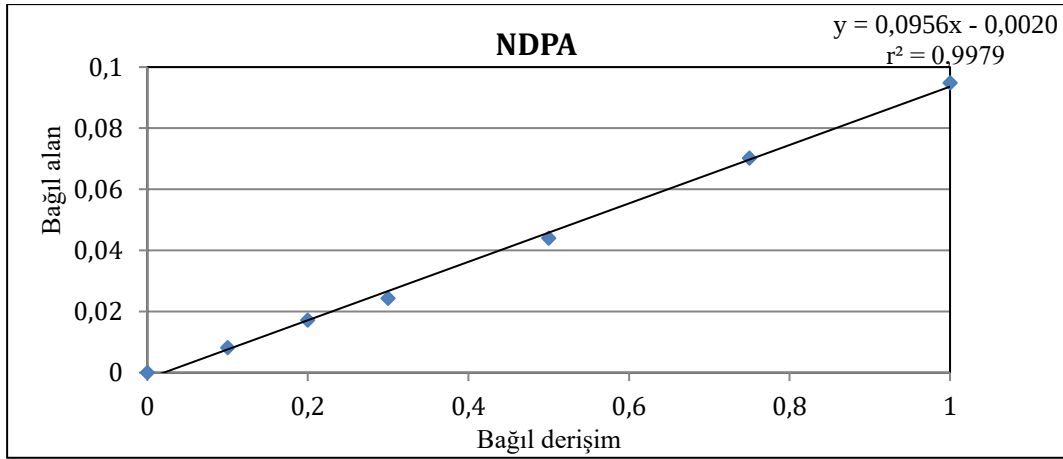
Çizelge 3.18. NDBzA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NDBzA	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	1321	25867	0,0511
	20	100	0,20	2508	25815	0,0971
	30	100	0,30	3822	26385	0,1448
	50	100	0,50	6600	28213	0,2339
	75	100	0,75	9740	26314	0,3701
	100	100	1,00	15812	31545	0,5013

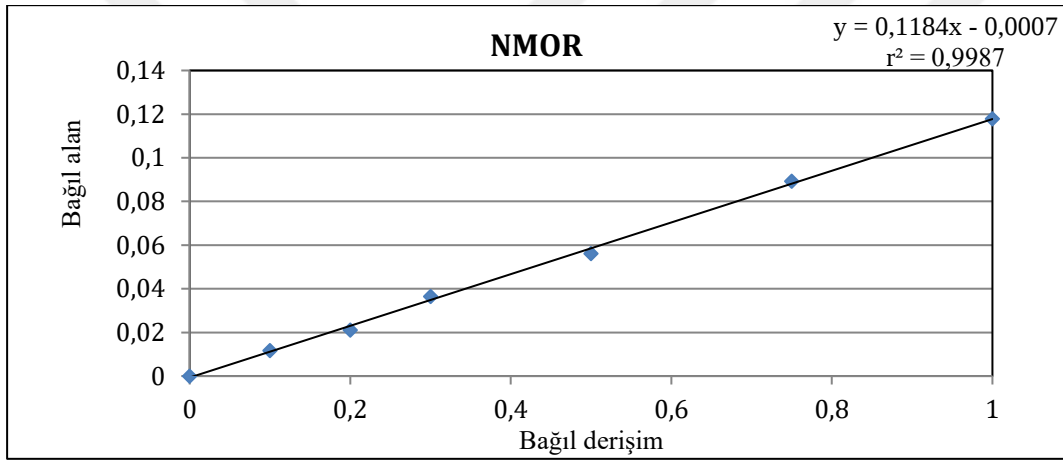
Çizelge 3.19. NDiNA maddesinin bağıl alan-bağıl derişim değerleri

Madde	Analit Derişimi, µg/L	ISTD Derişimi, µg/L	Bağıl Derişim	Analit Pik Alanı	ISTD Pik Alanı	Bağıl Alan
NDiNA	0	100	0,00	0	25061	0,0000
	10	100	0,10	167	25867	0,0065
	20	100	0,20	295	25815	0,0114
	30	100	0,30	494	26385	0,0187
	50	100	0,50	900	28213	0,0319
	75	100	0,75	1322	26314	0,0502
	100	100	1,00	2238	31545	0,0710

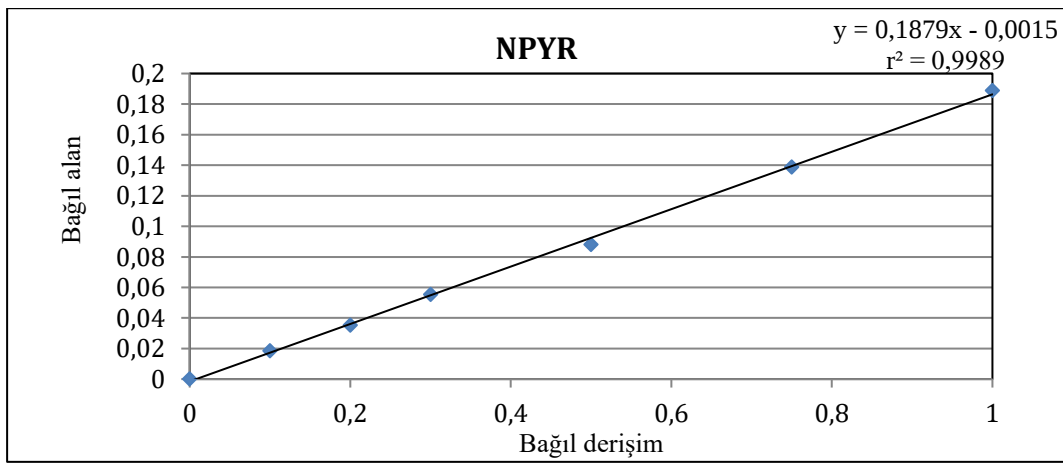
Yukarıdaki çizelgelerdeki bağıl alan ve bağıl derişim değerleri grafiğe geçirilerek iç standartlı kalibrasyon grafikleri elde edilmiş ve Şekil 3.37-3.43’de verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayıları ise Çizelge 3.20’de verilmiştir.



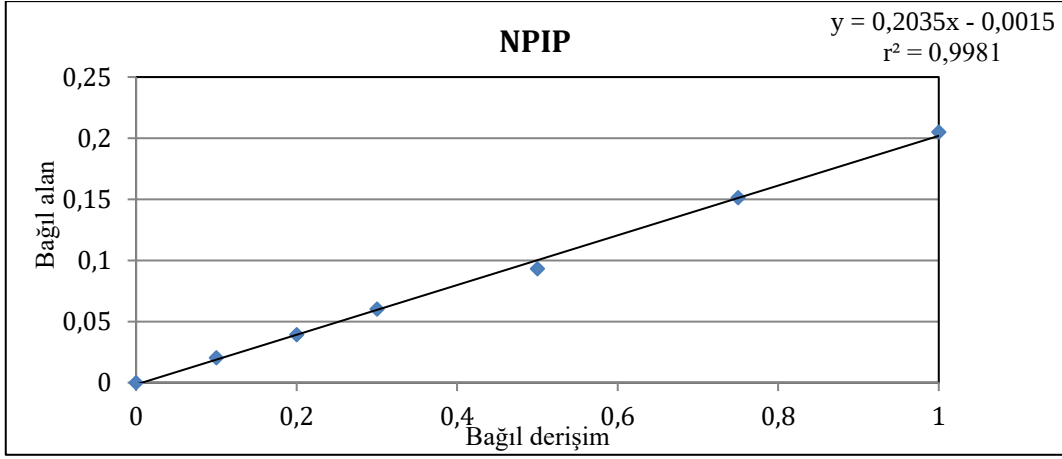
Şekil 3.37. NDPA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



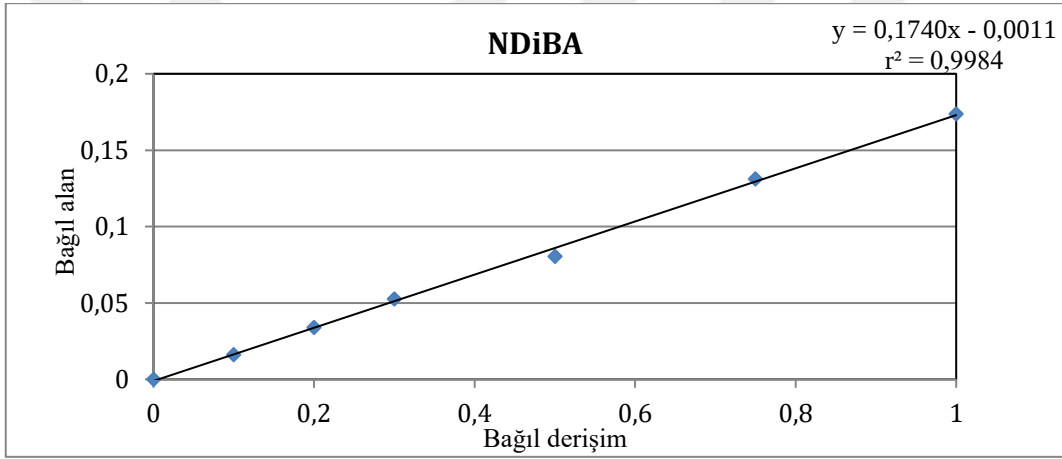
Şekil 3.38. NMOR kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



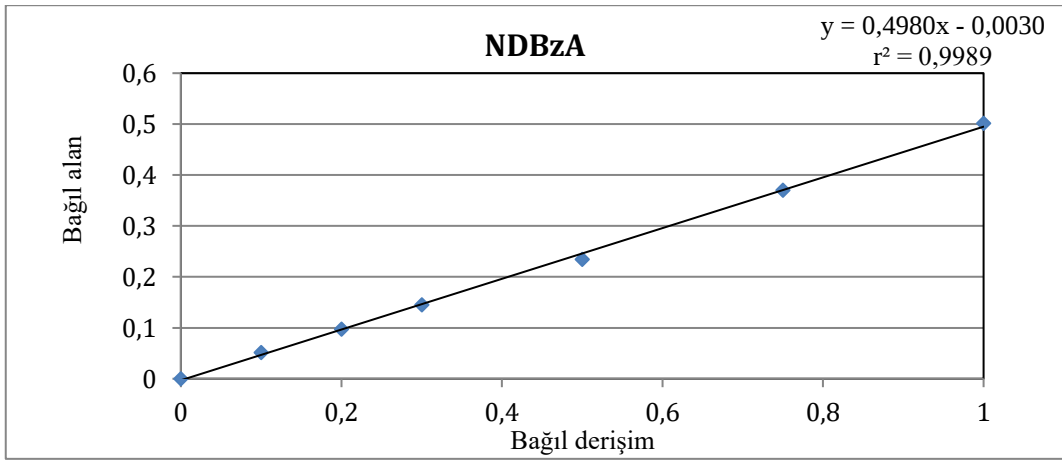
Şekil 3.39. NPYR kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



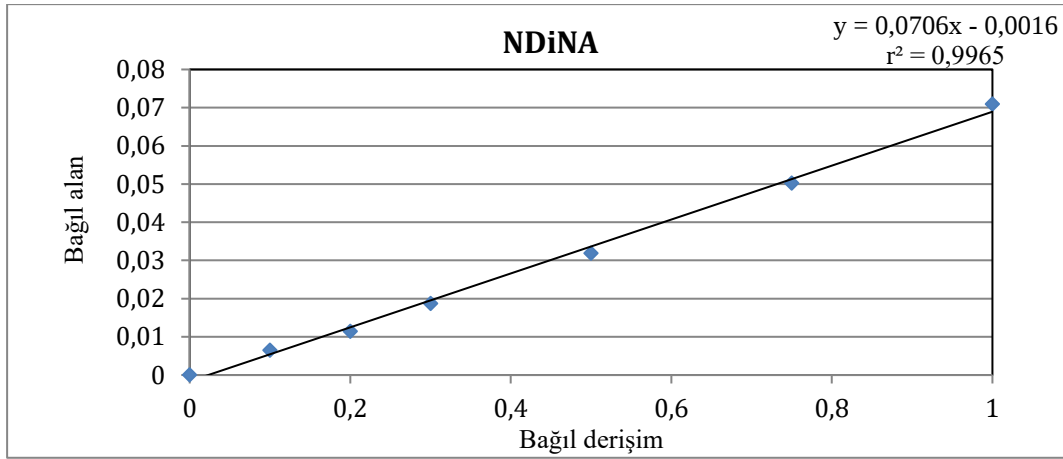
Şekil 3.40. NPIP kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



Şekil 3.41. NDiBA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



Şekil 3.42. NDBzA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)



Şekil 3.43. NDiNA kalibrasyon eğrisi (iç standartlı)

Çizelge 3.20. İç standart varlığında kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayıları (r^2)

Madde	r^2
NDPA	0,9979
NMOR	0,9987
NPYR	0,9989
NPIP	0,9981
NDiBA	0,9984
NDBzA	0,9989
NDiNA	0,9965

Kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayıları tüm maddelerde, kabul kriteri olan 0,995 değerinin üzerindedir [79]. Bu değerler, kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığının iyi derecede olduğunu göstermektedir. Böylece oluşturulan metot parametrelerinin, validasyon çalışmaların yürütülmesine elverişli olduğu görülmüştür.

3.4. GC-MS Cihazı ile Nitrozamin Analizi Metodunun Geçerli Kılınması

Tıbbi malzemelerden nitrozamin analizi için geliştirilen GC-MS metodunun geçerli kılınması amacıyla aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır:

- LOD (algılama limiti) ve LOQ (tayin limiti) değerlerinin belirlenmesi
- İç kalite kontrol çalışmaları
- Geri kazanım çalışmaları
- Tekrarlanabilirlik çalışmaları
- Tekrar üretilebilirlik çalışmaları
- Ölçüm belirsizliği hesaplamaları

3.4.1. LOD-LOQ Çalışmaları

Geliştirilen GC-MS motunda güvenli çalışma limitlerini saptamak için tespit ve tayin limitleri belirlenmiştir. Bu çalışmada çözücü körü düşük derişimlerde nitrozamin karışımı ile kirletilerek metot şartları altında GC-MS cihazında analiz edilmiştir. GC-MS cihazından alınan Sinyal/Gürültü (S/N) oranlarının 3 olduğu nokta LOD ve bu oranın yaklaşık 10 olduğu nokta LOQ olarak kabul edilir [80, 81, 82, 83]. Ancak Çizelge 3.21’de yer alan S/N gürültü oranları tam olarak bu değerlerde olmadığı için S/N oranlarının 3 ve 10 olduğu noktaları tespit etmek için ekstrapolasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.21. GC-MS Cihazından Alınan Sinyal/Gürültü (S/N) Oranları

Madde		1 µg/L	2 µg/L	3 µg/L	5 µg/L	7 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	30 µg/L	50 µg/L	75 µg/L
NDPA	Alan	14	43	92	132	130	211	443	642	1108	1848
	S/N	0,46	0,83	1,52	1,56	2,41	3,41	6,24	10,35	12,51	29,77
NMOR	Alan	30	54	175	159	169	303	546	965	1413	2350
	S/N	0,82	0,85	1,08	2,01	2,65	3,87	6,88	15,27	17,53	28,77
NPYR	Alan	72	107	134	275	268	478	913	1460	2485	3650
	S/N	2,12	3,26	4,13	4,85	5,52	10,49	19,97	29,11	71,47	91,69
NPIP	Alan	73	113	155	295	316	526	1014	1588	2627	3983
	S/N	1,38	4,05	5,09	8,99	12,86	14,62	22,03	40,85	67,41	109,91
NDiBA	Alan	84	112	131	242	259	419	879	1391	2271	3456
	S/N	0,93	2,55	2,71	2,80	2,87	5,46	12,15	22,92	19,22	42,23
NDBzA	Alan	548	798	835	969	1061	1564	2508	3822	6566	9740
	S/N	1,27	1,09	2,03	2,19	2,79	4,08	6,01	8,52	16,57	12,88
NDiNA	Alan				128	79	167	295	494	873	1322
	S/N				1,38	1,14	1,91	3,12	5,48	8,07	15,59

Tablodaki NDPA maddesine ait verilerle yapılan örnek bir ekstrapolasyon işlemi aşağıda verilmiş olup diğer maddeler için de aynı şekilde hesaplama yapılmıştır. 7 adet nitrozamin maddesine ait LOD/LOQ değerleri hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 3.24'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. NDPA için LOD değerinin ekstrapolasyon hesaplaması verileri

Derişim	S/N
7 µg/L	2,41
x	3,00
10 µg/L	3,41

$$\frac{10-x}{x-7} = \frac{3,41-3,00}{3,00-2,41} \quad (3.3)$$

$$0,41 x - 2,87 = 5,9 - 0,59 x$$

$$x = 8,7$$

Çizelge 3.23. NDPA için LOQ değerinin ekstrapolasyon hesaplaması verileri

Derişim	S/N
20 µg/L	6,24
x	10,00
30 µg/L	10,35

$$\frac{30-x}{x-20} = \frac{10,35-10,00}{10,00-6,24} \quad (3.4)$$

$$0,35 x - 7 = 112,8 - 3,76 x$$

$$x = 29,2$$

Çizelge 3.24. Yedi adet nitrozamin maddesi için belirlenen LOD/LOQ değerleri

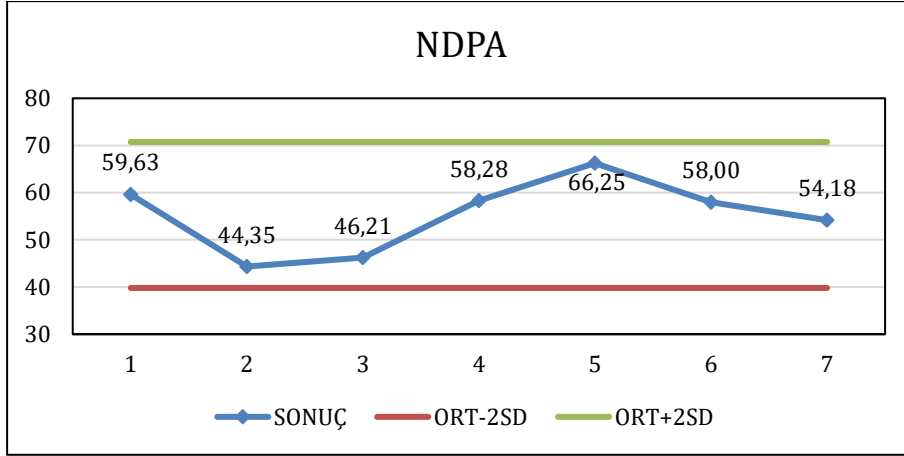
Madde	LOD, µg/L	LOQ, µg/L
NDPA	8,7	29,2
NMOR	7,8	23,7
NPYR	1,7	9,7
NPIP	1,6	5,5
NDiBA	7,1	16,7
NDBzA	7,4	33,6
NDiNA	19,0	56,4

3.4.2. İç Kalite Kontrol Çalışmaları

Geliştirilmiş olan deney metodu kullanılarak 7 adet nitrozamin maddesi için 7 farklı iç kalite kontrol çalışması yapılmıştır. Kalibrasyon aralığının orta noktası olan 50 µg/L derişimi iç kalite kontrol noktası seçilmiştir. 50 µg/L derişimde metanol ile hazırlanan karışım çözeltisi periyodik aralıklarla cihazda analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.25-3.33 ve grafiklerde verilmiştir.

Çizelge 3.25. NDPA iç kalite kontrol verileri

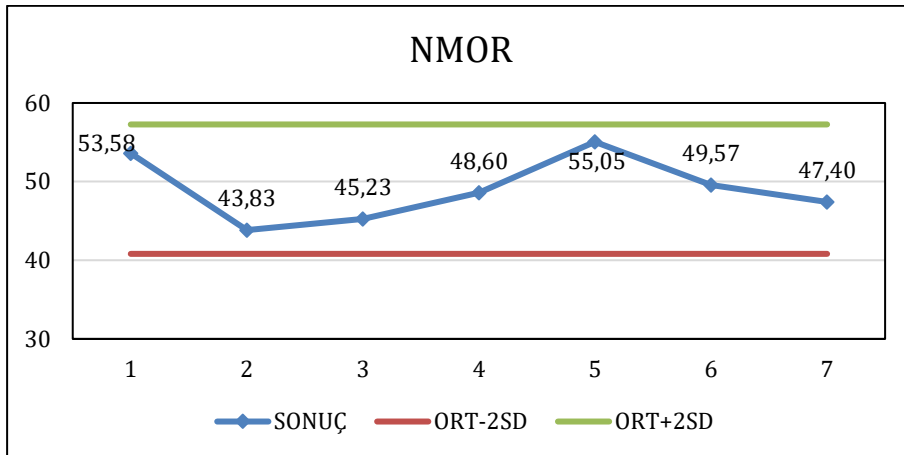
NDPA	50 µg/L-QC
	59,63
	44,35
	46,21
	58,28
	66,25
	58,00
	54,18
$\bar{x}$	55,27
SD	7,73
%RSD	13,99
$\bar{x} - 2SD$	39,80
$\bar{x} + 2SD$	70,74



Şekil 3.44. NDPA iç kalite kontrol grafiği

Çizelge 3.26. NMOR iç kalite kontrol verileri

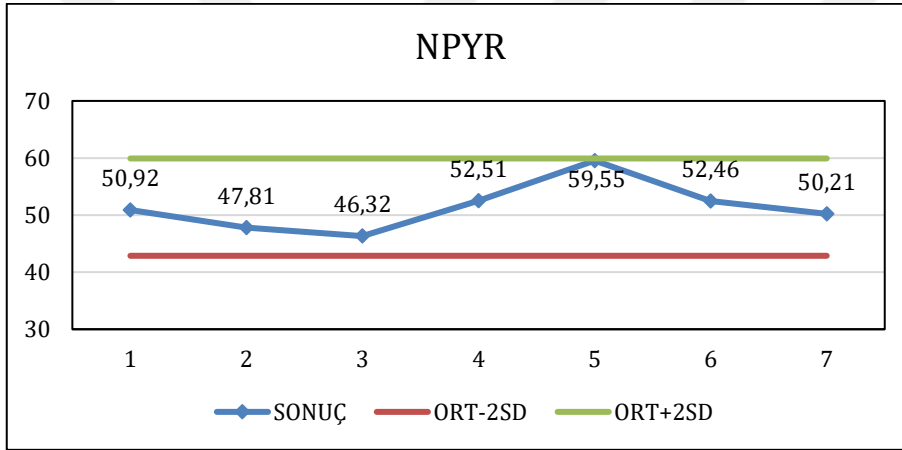
NMOR	50 µg/L-QC
	53,58
	43,83
	45,23
	48,60
	55,05
	49,57
	47,40
$\bar{x}$	49,04
SD	4,11
%RSD	8,39
$\bar{x} - 2SD$	40,81
$\bar{x} + 2SD$	57,27



Şekil 3.45. NMOR iç kalite kontrol verileri

Çizelge 3.27. NPYR iç kalite kontrol verileri

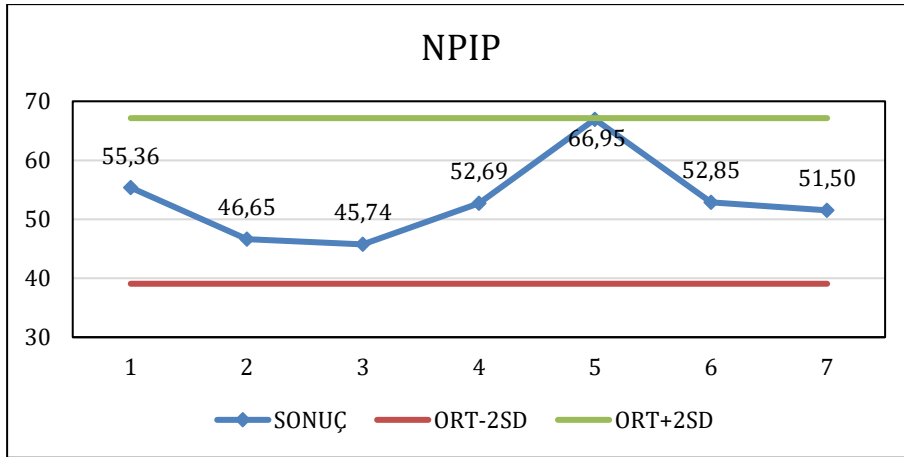
NPYR	50 µg/L-QC
	50,92
	47,81
	46,32
	52,51
	59,55
	52,46
	50,21
$\bar{x}$	51,40
SD	4,26
%RSD	8,29
$\bar{x} - 2SD$	42,87
$\bar{x} + 2SD$	59,92



Şekil 3.46. NPYR iç kalite kontrol grafiği

Çizelge 3.28. NPIP iç kalite kontrol verileri

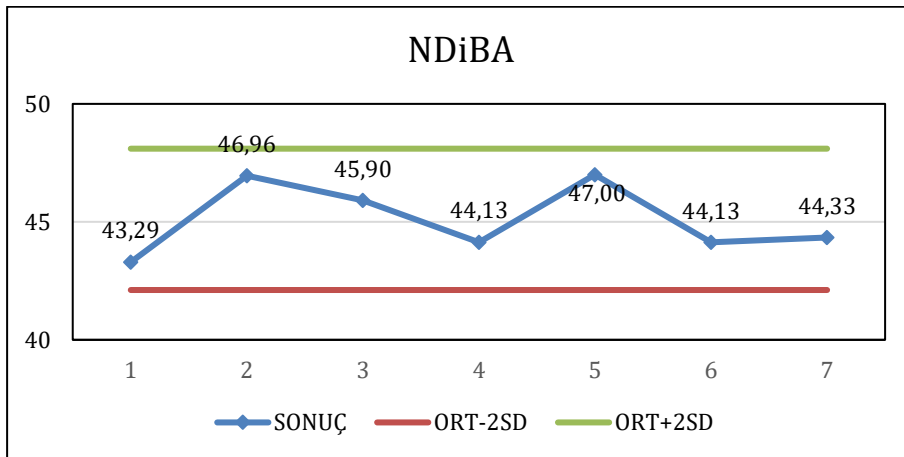
NPIP	50 µg/L-QC
	55,36
	46,65
	45,74
	52,69
	66,95
	52,85
	51,50
$\bar{x}$	53,10
SD	7,02
%RSD	13,22
$\bar{x} - 2SD$	39,07
$\bar{x} + 2SD$	67,14



Şekil 3.47. NPIP iç kalite kontrol grafiği

Çizelge 3.29. NDİBA iç kalite kontrol verileri

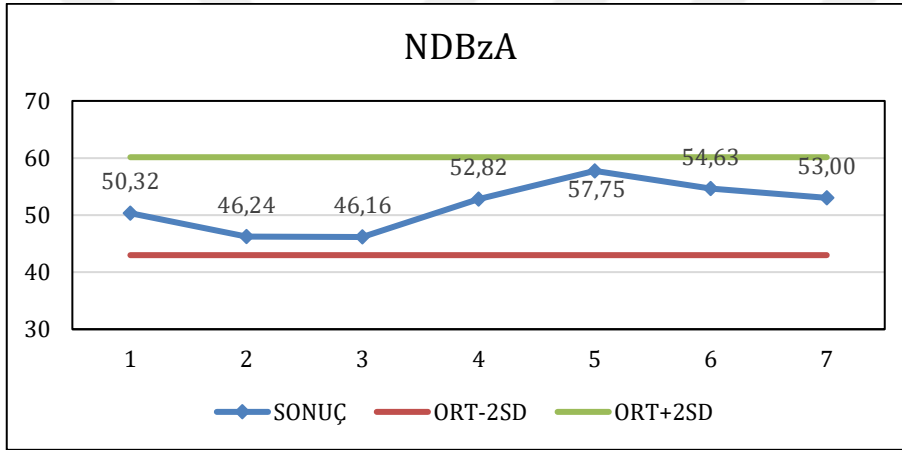
NDİBA	50 µg/L-QC
	43,29
	46,96
	45,90
	44,13
	47,00
	44,13
	44,33
$\bar{x}$	45,11
SD	1,50
%RSD	3,32
$\bar{x} - 2SD$	42,11
$\bar{x} + 2SD$	48,10



Şekil 3.48. NDİBA iç kalite kontrol grafiği

Çizelge 3.30. NDBzA iç kalite kontrol verileri

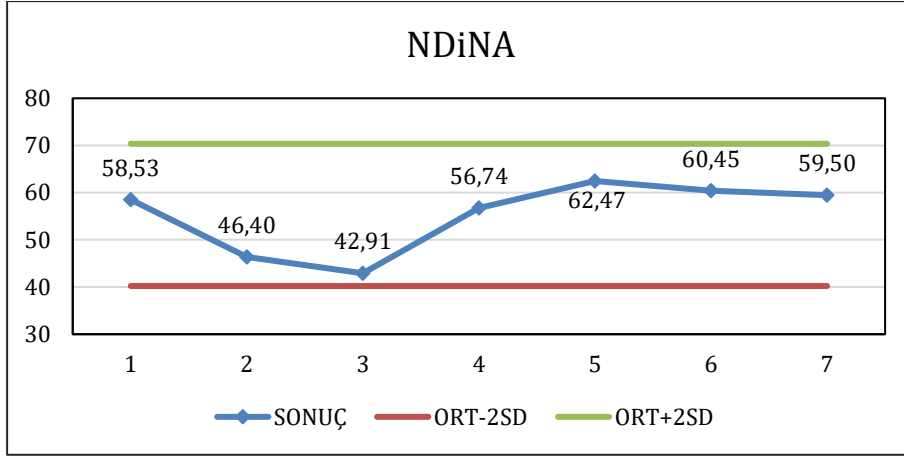
NDBzA	50 µg/L-QC
	50,32
	46,24
	46,16
	52,82
	57,75
	54,63
	53,00
$\bar{x}$	51,56
SD	4,29
%RSD	8,32
$\bar{x} - 2SD$	42,98
$\bar{x} + 2SD$	60,14



Şekil 3.49. NDBzA iç kalite kontrol grafiği

Çizelge 3.31. NDiNA iç kalite kontrol verileri

NDiNA	50 µg/L-QC
	58,53
	46,40
	42,91
	56,74
	62,47
	60,45
	59,50
$\bar{x}$	55,29
SD	7,54
%RSD	13,63
$\bar{x} - 2SD$	40,21
$\bar{x} + 2SD$	70,36



Şekil 3.50. NDiNA iç kalite kontrol grafiği

İç kalite kontrol çalışmaları neticesinde, 7 farklı analiz sonucunun da $ORT \pm 2SD$ aralığında ve bağıl standart sapma değerlerinin ($\% RSD$) ≤ 15 olduğu, dolayısıyla kabul kriterlerinin sağlandığı görülmüştür. Bu sayede oluşturulan metodun, deney sonuçlarının kalitesini güvence altına aldığı belirlenmiştir.

3.4.3. Geri Kazanım Çalışmaları

Tıbbi malzemelerde nitrozamin ve nitrozlanabilen madde analizi metodunun geçerli kılınması (doğruluk) bağlamında, Madde 3.3'de belirtilen şartlara göre oluşturulan GC-MS metodu ile geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım aşamasında nitrozaminler, özütleme işleminden geçerek, geliştirilen GC-MS metodunda analiz edilmiştir. Geri kazanım çalışmasında iki farklı ekstraksiyon prensibi uygulanmıştır:

- EN ISO 10993-18 ve EN ISO 10993-12 standartlarındaki ekstraksiyon koşulları ile özütleme işlemi
- EN 12868 ve EN 71-12 standartlarındaki ekstraksiyon koşulları ile özütleme işlemi

3.4.3.1. EN ISO 10993-18 ve EN ISO 10993-12 Prensiplerine Göre Yapılan Özütleme İşlemi

Çalışmanın bu kısmında tıbbi malzemelerin kimyasal karakterizasyonu kapsamında, EN 10993-18 ve EN 10993-12’de belirtilen özütleme prensiplerini de kapsayan ve Çizelge 2.1’de yer alan özütleme koşulları incelenmiş ve Çizelge 3.32’de verilen özütleme koşulları ve ortamı belirlenmiştir.

Çizelge 3.32. EN ISO 10993-18 ve EN ISO 10993-12 kapsamında özütleme koşulları [10,15]

Özütleme Ortamı	Özütleme Sıcaklığı	Özütleme Süresi
Metanol	37°C	72 saat

Metanol körüne (blank) 100 µg/L nitrozamin karışım çözeltisi ekilerek paralel çalışma koşullarında 72 saat süreyle 37°C sıcaklıkta bekletilerek özütleme işlemi yapılmıştır. Çalışma sonunda verimliliğin tespit edilmesi amacıyla geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Geri kazanım oranları (%R) Çizelge 3.33’de verilmiştir.

Çizelge 3.33. EN 10993-18 ve EN 71-12’de belirtilen koşullarda özütleme ile geri kazanım verileri

			NDPA	NMOR	NPYR	NPIP	NDiBA	NDBzA	NDiNA
100 µg/L	t=0	x ₁	77,95	91,44	90,09	87,96	130,53	126,75	86,06
		x ₂	78,96	87,50	88,77	85,41	125,62	124,64	83,54
		x ₃	80,26	88,06	91,75	86,36	128,33	123,24	77,97
		$\bar{x}$	79,05	89,00	90,20	86,58	128,16	124,88	82,52
	t=72	x ₁	85,52	93,06	92,15	85,85	126,73	109,90	49,53
		x ₂	85,47	91,66	93,70	85,96	116,68	105,11	46,87
		x ₃	86,80	95,81	96,78	89,24	116,19	102,10	50,80
		$\bar{x}$	85,93	93,51	94,21	87,02	119,87	105,70	49,07
	% R		108,7	105,1	104,4	100,5	93,5	84,6	59,5

Nitrozaminlerin güneş ışını etkisinde bozunmaya uğradığı ve nitrozamin ve nitrozlanabilen madde göçü analizi ile ilgili bu duruma dikkat edilmesi gerekliliği ve alınacak önlemler belirtilmiştir. Ekstraksiyon işleminde madde kaybının önlenmesi için amber cam malzemelerin kullanılması ve güneş ışınından koruma sağlayacak diğer yöntemler (alüminyum folyo ile kaplanma) belirtilmiştir. 72 saat süreyle 37°C’de gerçekleştirilen çalışmada (ekstraktın güneş ışınından korunması ile ilgili özel bir önlem – amber cam şişe kullanımı vb.- alınmaksızın) 7 nitrozamin maddesi için geri kazanım çalışma sonuçlarının 95 ± 30 dahilinde gerçekleşmeyeceği öngörülmüştü. Ancak Çizelge 3.33’de yer alan geri kazanım çalışma sonuçları neticesinde 6 nitrozamin için geri kazanım çalışma sonuçları karar kriterleri dahilinde gözlemlenirken sadece NDİNA için ekstraksiyon işlemi sonucunda madde kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Geri kazanım çalışmasında 6 nitrozamin için beklenen durumun gerçekleşmemesinin olası sebebinin laboratuvar ortam koşullarından kaynakladığı öngörülmektedir. Özütleme yapılan laboratuvarın 1. katta yer alması ve ekstraksiyonun yapıldığı çalkalamalı inkübatörün konumunun güneş görmeyen yerde olmasının geri kazanım çalışmasında nitrozaminlerin degradasyonuna sebep olabilecek bir ortam (güneş ışınlarına maruziyetin sınırlı kalması) oluşturmadığı düşünülmektedir.

3.4.3.2. EN 12868 ve EN 71-12 Prensiplerine Göre Yapılan Özütleme İşlemi

EN 10993-18 ve EN 10993-12’de belirtilen özütleme prensiplerine göre yapılan geri kazanım çalışmalarının önceki bölümde de bahsedilen risklerinden ötürü tezin bu aşamasında geri kazanım çalışmaları yapılırken EN 12868 ve EN 71-12 standartlarında belirtilen özütleme prensiplerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Geri kazanım çalışmaları, referans malzemeyi spikleama işlemi üzerinden yürütüldüğü için bu çalışmada EN 10993-18 ve EN 10993-12 standartları uyarınca, tıbbi malzemelerden salınan N-nitrozaminler için aşağıda belirtilen prosedürler uygulanmıştır.

- Saliva çözeltisinin (yapay tükürük tuzu) hazırlanışı:

Aşağıda miktarları verilmiş olan tuzlar (950 ± 5) ml suda çözülür. Yapay tükürük tuzu çözeltisinin pH değeri ($9,0 \pm 0,1$) olmalıdır ve stabilitesi sınırlı olduğundan 5 günden fazla kullanılmamalıdır.

Çizelge 3.34. Tuzlar ve 1 L yapay tükürük tuzu çözeltisi için kütleleri

Tuzlar	CAS	Kütle (g)
Sodyum hidrojen karbonat	144-55-8	$4,2 \pm 0,021$
Sodyum klorür	7647-14-5	$0,5 \pm 0,0025$
Potasyum karbonat	584-08-7	$0,2 \pm 0,001$
Sodyum nitrit	7632-00-0	$0,03 \pm 0,001$

- N-Nitrozaminler için göç çözeltisinin hazırlanışı:

4 mL saliva çözeltisine 20 ppb, 60 ppb ve 100 ppb nitrozamin karışım çözeltisi ilave edilir. Ağzı kapatılan şişe yaklaşık vücut sıcaklığı olan (40 ± 2) °C'de $(24 \pm 0,5)$ saat boyunca etüvde bekletilir. Süre sonunda numune kabı etüvden alınır ve kuvvetlice çalkalanır. Özellikle bazı N-nitrozaminler yapay tükürük tuzu çözeltisinde daha düşük çözünürlüğe sahiptir ve ayrıca kabın ve numunenin yüzeylerine yapışabilirler. Bu durum verimde önemli değişikliklere neden olabilir. Bu varyasyonları azaltmak için tüm işlemlerden önce kuvvetli çalkalama yapılmıştır. Elde edilen göç çözeltisini içeren reaksiyon kabına $0,6 \pm 0,01$ mL 1M sodyum hidroksit çözeltisi eklenir ve hızlıca çalkalanır. Ardından $0,5 \pm 0,01$ mL iç standart çözeltisi konulur ve kapatılır. Elde edilen çözelti ışıktan korunmalı ve gece boyunca saklanacaksa buzdolabında tutulmalıdır. Daha uzun süreler için uygun kaplarda dondurulmuş olarak saklanılmalıdır.

- N-Nitrozaminler için ekstraktın hazırlanışı:

Elde edilen çözelti, ekstraksiyon işlemine tabi tutulur. Ekstraksiyon işlemlerinde diatome toprak dolgulu ekstraksiyon kolonları kullanılır. Çözelti yavaşça ekstraksiyon kolonuna aktarılır. Çözeltinin diatome toprak tarafından emilmesi için 15 ± 1 dk beklenilir. Bu sırada reaksiyon şişesine $30 \pm 0,5$ mL diklorometan (DCM) eklenir, kapak kapatılır ve kuvvetlice çalkalanır. Süre sonunda kolonun üstünden DCM yavaşça ilave edilir. Reaksiyon şişesi tekrar $30 \pm 0,5$ mL DCM ile yıkanır ve aynı şekilde kolona ilave edilir. Bu çalışmada, daha yüksek geri kazanımlar elde edebilmek amacıyla toplam 90 mL DCM ilave edilerek yapılmıştır. Ekstrakt tamamen toplandıktan sonra buharlaştırma şişesine $1 \pm 0,01$ mL metanol eklenir. Daha sonra elde edilen ekstraktlar, $0,9 \pm 0,1$ mL hacme gelene kadar azot altında uçurulur ve GC-MS cihazında analiz edilmek üzere amber viallere alınır.

3.4.3.3. Geri Kazanım Çalışma Sonuçları

Geri kazanım çalışmaları, kalibrasyon aralığının alt, orta ve üst düzeylerini temsil etmesi açısından 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişim noktalarında yapılmıştır. Numune hazırlama işlemi Madde 3.4.3.2’de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu prosedüre göre yapılan geri kazanım çalışma sonuçları Çizelge 3.35’de verilmiştir. Çizelgedeki çalışma sonuçlarından Eşitlik 2.9 ile geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır.

$$\text{Bağıl geri kazanım: } \% R = \frac{x}{x_{\text{ref}}} * 100 \quad (2.12)$$

Çizelge 3.35. 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişimlerinde geri kazanım çalışmaları

Geri Kazanım Çalışmaları, µg/L							
NDPA	20 µg/L	23,87	26,08	27,28	17,71	15,72	23,68
	60 µg/L	65,54	69,23	48,20	75,08	64,23	72,78
	100 µg/L	127,14	104,61	103,05	122,80	111,53	70,12
NMOR	20 µg/L	21,83	23,12	25,74	16,09	23,82	13,78
	60 µg/L	62,25	65,89	47,68	70,11	74,36	67,37
	100 µg/L	123,30	98,39	83,67	91,77	122,36	92,85
NPYR	20 µg/L	29,73	27,07	15,70	21,61	18,31	15,71
	60 µg/L	63,68	50,81	66,11	75,46	73,05	76,10
	100 µg/L	125,34	126,75	121,64	111,47	117,99	75,70
NPIP	20 µg/L	22,85	29,17	22,48	25,13	24,74	18,35
	60 µg/L	62,55	44,43	67,25	52,76	54,86	50,90
	100 µg/L	107,72	89,80	122,46	104,13	103,17	82,54
NDiBA	20 µg/L	22,07	26,38	12,60	18,39	23,08	21,29
	60 µg/L	59,71	63,07	43,20	72,50	70,20	66,86
	100 µg/L	124,95	121,52	132,59	120,76	123,41	80,07
NDBzA	20 µg/L	30,34	28,51	25,59	25,71	20,90	19,07
	60 µg/L	78,66	73,34	65,53	73,35	64,33	57,88
	100 µg/L	124,95	121,52	132,59	120,76	123,41	95,33
NDiNA	20 µg/L	27,87	32,54	16,30	27,07	29,25	24,22
	60 µg/L	79,00	74,24	64,56	56,34	73,65	44,66
	100 µg/L	118,41	125,07	122,97	76,94	106,05	72,59

Çizelge 3.36. Geri kazanım (%R) değerleri

%R								$\bar{x}$	S_R
NDPA	20 µg/L	119,33	130,40	136,41	88,55	78,61	118,42	111,95	23,21
	60 µg/L	109,23	115,38	80,33	125,13	107,05	121,30	109,74	15,97
	100 µg/L	127,14	104,61	103,05	122,80	111,53	70,12	106,54	20,28
NMOR	20 µg/L	109,13	115,60	128,72	80,47	119,10	68,88	103,65	23,61
	60 µg/L	103,75	109,81	79,46	116,85	123,94	112,28	107,68	15,40
	100 µg/L	123,30	98,39	83,67	91,77	122,36	92,85	102,06	16,77
NPYR	20 µg/L	148,67	135,37	78,52	108,07	91,54	78,53	106,78	29,67
	60 µg/L	106,13	84,69	110,19	125,77	121,74	126,84	112,56	16,04
	100 µg/L	125,34	126,75	121,64	111,47	117,99	75,70	113,15	19,15
NPIP	20 µg/L	114,26	145,84	112,40	125,63	123,68	91,77	118,93	17,85
	60 µg/L	104,25	74,05	112,09	87,94	91,43	84,83	92,43	13,73
	100 µg/L	107,72	89,80	122,46	104,13	103,17	82,54	101,64	14,03
NDiBA	20 µg/L	110,37	131,92	62,99	91,94	115,42	106,47	103,18	23,58
	60 µg/L	99,52	105,12	72,00	120,83	116,99	111,44	104,32	17,62
	100 µg/L	124,95	121,52	132,59	120,76	123,41	80,07	117,22	18,69
NDBzA	20 µg/L	30,34	151,69	142,56	127,96	128,56	104,49	114,27	44,12
	60 µg/L	131,09	122,24	109,22	122,26	107,22	96,46	114,75	12,66
	100 µg/L	124,95	121,52	132,59	120,76	123,41	95,33	119,76	12,70
NDiNA	20 µg/L	139,36	162,69	81,52	135,35	146,24	121,12	131,05	27,82
	60 µg/L	131,66	123,73	107,59	93,90	122,75	74,44	109,01	21,65
	100 µg/L	118,41	125,07	122,97	76,94	106,05	72,59	103,67	23,38

Çizelge 2.15'deki kabul kriterlerinde belirtilmiş olan $\%95 \pm 30$ geri kazanım limitleri bu çalışmada da karar kriteri olarak kullanılmıştır. Yalnızca NDiNA için 20 µg/L derişiminde geri kazanım oranları ortalaması $\%131,05$ olarak tespit edilmiş olup bu kriterin sağlanamadığı görülmüştür.

3.4.4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

7 adet nitrozamin maddesinde kısa zaman aralığında (3 gün) çözücü körüne (metanol), kalibrasyon aralığında 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişimde olacak şekilde referans nitrozamin karışımından eklenerek 8 farklı tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki eşitliklere göre yapılmış olup sonuçların değerlendirmesi Çizelge 2.15'de verilmiş olan tekrarlanabilirlik limiti ($|x_i - \bar{x}| \leq r$) ve HorRat ($0,3 \leq \text{HorRat} \leq 1,3$) kabul kriterlerine göre yapılmıştır. 7 madde için de tekrarlanabilirlik limiti değerlendirmesi ve HorRat değerlendirmesinin uygun olduğu belirlenmiştir.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.1)$$

$$\text{HorRat} = \frac{\text{RSD}_r}{\text{PRSD}_r} \quad (2.4)$$

$$\% \text{RSD}_r = \frac{s_r}{\bar{x}} * 100 \quad (2.3)$$

$$\text{PRSD}_r = 2C^{-0,15} \quad (2.5)$$

$$r = 2,8 * s_r \quad (2.7)$$

$$C: \frac{\text{analit kütlesi}}{\text{toplam kütle}} \quad (2.6)$$

- Kütle Fraksiyonu (C) hesaplaması:

Hesaplama örnek olarak 20 µg/L değeri kullanılmıştır.

$$\text{Kütle fraksiyonu (20 µg/L)} = \frac{\text{bileşen kütlesi}}{\text{toplam kütle}} = \frac{20}{1000000000} = 2 * 10^{-8}$$

Çizelge 3.37. NDPA tekrarlanabilirlik çalışmaları

NDPA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	23,17	63,09	108,40
	22,15	65,78	96,26
	21,25	60,48	114,22
	21,42	56,37	107,01
	24,85	64,20	97,72
	21,26	67,25	108,90
	20,79	55,56	113,40
	18,39	56,25	98,36
$\bar{x}$	21,66	61,12	105,54
s_r	1,87	4,63	7,15
r	5,24	12,97	20,01
Horrat Testi			
C	2,17E-08	6,11E-08	1,06E-07
PRSD _r (%)	28,23	24,16	22,26
RSD _r (%)	8,64	7,58	6,77
HorRat	0,31	0,31	0,30
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.38. NMOR tekrarlanabilirlik çalışmaları

NMOR	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	22,88	65,78	102,48
	19,55	56,18	99,17
	20,31	61,37	110,62
	18,98	63,28	102,25
	19,37	55,65	93,47
	21,64	65,45	109,70
	17,46	66,15	91,15
	18,50	54,62	92,54
$\bar{x}$	19,84	61,06	100,17
s_r	1,74	4,89	7,51
r	4,87	13,68	21,04
Horrat Testi			
C	1,98E-08	6,11E-08	1,00E-07
PRSD _r (%)	28,60	24,16	22,43
RSD _r (%)	8,77	8,00	7,50
HorRat	0,31	0,33	0,33
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.39. NPYR tekrarlanabilirlik çalışmaları

NPYR	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	21,45	53,70	106,18
	19,67	60,96	110,56
	20,18	53,06	103,07
	17,87	54,56	95,62
	18,36	63,39	90,99
	19,51	65,84	107,02
	16,63	54,03	91,86
	21,55	55,82	92,70
$\bar{x}$	19,40	57,67	99,75
s_r	1,72	4,98	7,82
r	4,80	13,94	21,89
Horrat Testi			
C	1,94E-08	5,77E-08	9,97E-08
PRSD _r (%)	28,70	24,37	22,45
RSD _r (%)	8,84	8,64	7,84
HorRat	0,31	0,35	0,35
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.40. NPIP tekrarlanabilirlik çalışmaları

NPIP	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	21,34	52,04	106,08
	19,95	66,10	92,23
	19,13	60,81	90,48
	17,77	62,98	106,04
	19,03	61,95	102,87
	22,08	63,71	109,16
	16,89	62,57	112,15
	18,82	54,22	99,39
$\bar{x}$	19,38	60,55	102,30
s_r	1,72	4,86	7,76
r	4,82	13,61	21,74
Horrat Testi			
C	1,94E-08	6,05E-08	1,02E-07
PRSD _r (%)	28,70	24,19	22,36
RSD _r (%)	8,88	8,03	7,59
HorRat	0,31	0,33	0,34
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.41. NDİBA tekrarlanabilirlik çalışmaları

NDİBA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	22,16	51,74	96,15
	19,08	67,97	90,51
	18,20	53,93	103,87
	19,10	61,17	95,15
	16,93	59,45	93,08
	18,81	60,22	100,28
	16,92	65,95	109,76
	18,63	61,89	91,01
$\bar{x}$	18,73	60,29	97,48
s_r	1,64	5,46	6,72
r	4,59	15,28	18,83
Horrat Testi			
C	1,87E-08	6,03E-08	9,75E-08
PRSD _r (%)	28,85	24,21	22,53
RSD _r (%)	8,75	9,05	6,90
HorRat	0,30	0,37	0,31
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.42. NDBzA tekrarlanabilirlik çalışmaları

NDBzA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	20,17	59,23	108,40
	22,24	65,55	104,32
	20,44	56,85	93,73
	18,03	65,98	119,07
	18,13	56,46	100,40
	18,02	64,28	108,11
	18,10	70,01	106,61
	17,40	59,64	94,48
$\bar{x}$	19,06	62,25	104,39
s_r	1,69	4,90	8,27
r	4,73	13,71	23,14
Horrat Testi			
C	1,91E-08	6,22E-08	1,04E-07
PRSD _r (%)	28,77	24,09	22,30
RSD _r (%)	8,85	7,87	7,92
HorRat	0,31	0,33	0,36
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.43. NDiNA tekrarlanabilirlik çalışmaları

NDiNA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	20,48	65,01	96,35
	24,95	69,29	106,08
	22,84	65,60	93,61
	19,20	57,75	113,97
	19,81	56,65	91,94
	18,82	55,23	106,65
	17,51	53,67	107,01
	18,54	68,03	91,22
$\bar{x}$	20,27	61,40	100,85
s_r	2,47	6,22	8,59
r	6,91	17,41	24,04
Horrat Testi			
C	2,03E-08	6,14E-08	1,01E-07
PRSD _r (%)	28,51	24,14	22,41
RSD _r (%)	12,18	10,12	8,51
HorRat	0,43	0,42	0,38
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

3.4.5. Tekrar Üretilirlik Çalışmaları

7 adet nitrozamin maddesinde uzun zaman aralığında (2 ay) çözücü körüne (metanol), kalibrasyon aralığında 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişimde olacak şekilde referans nitrozamin karışımından eklenerek 8 farklı tekrar üretilirlik çalışması yapılmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki eşitliklere göre yapılmış olup sonuçların değerlendirmesi Çizelge 2.15’de verilmiş olan tekrar üretilirlik limiti ($|x_i - \bar{x}| \leq R_w$) ve HorRat ($0,3 \leq \text{HorRat} \leq 1,3$) kabul kriterlerine göre yapılmıştır. 7 madde için de tekrar üretilirlik limiti değerlendirmesi ve HorRat değerlendirmesinin uygun olduğu belirlenmiştir.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.1) \quad \text{HorRat} = \frac{\text{RSD}_{Rw}}{\text{PRSD}_{Rw}} \quad (2.8)$$

$$\% \text{RSD} = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \quad (2.3) \quad \text{PRSD}_{Rw} = 2C^{-0,15} \quad (2.9)$$

$$R_w = 2,8 * s_{rw} \quad (2.11) \quad C: \frac{\text{analit kütlesi}}{\text{toplam kütle}} \quad (2.10)$$

Çizelge 3.44. NDPA tekrar üretilirlik çalışmaları

	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDPA	18,23	63,76	90,35
	19,43	65,78	102,64
	24,40	59,17	94,87
	21,18	67,55	90,74
	23,68	56,84	105,93
	21,17	66,83	97,47
	21,35	65,54	110,06
	21,66	55,35	93,68
$\bar{x}$	21,39	62,60	98,22
s_{rw}	2,01	4,78	7,26
R_w	5,63	13,39	20,34
Horrat Testi			
C	2,14E-08	6,26E-08	9,82E-08
PRSD _R (%)	28,28	24,07	22,50
RSD _R (%)	9,40	7,64	7,40
Horrat r	0,33	0,32	0,33
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.45. NMOR tekrar üretilebilirlik çalışmaları

NMOR	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	19,75	53,39	91,06
	18,79	64,49	99,73
	19,21	62,95	92,92
	16,88	52,50	106,38
	21,92	62,25	101,77
	18,90	54,90	92,42
	19,86	62,14	114,56
	25,53	66,00	108,27
$\bar{x}$	20,10	59,83	100,89
S_{rw}	2,60	5,35	8,50
R_w	7,28	14,98	23,79
Horrat Testi			
C	2,01E-08	5,98E-08	1,01E-07
PRSD _R (%)	28,55	24,24	22,41
RSD _R (%)	12,93	8,94	8,42
Horrat r	0,45	0,37	0,38
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.46. NPYR tekrar üretilebilirlik çalışmaları

NPYR	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	24,72	62,02	91,27
	17,30	54,89	95,38
	19,77	64,63	102,73
	19,58	56,55	90,65
	21,89	65,05	97,22
	18,79	64,66	100,44
	19,26	53,68	109,88
	20,02	66,22	111,88
$\bar{x}$	20,17	60,96	99,93
S_{rw}	2,24	5,10	7,92
R_w	6,28	14,28	22,18
Horrat Testi			
C	2,02E-08	6,10E-08	9,99E-08
PRSD _R (%)	28,53	24,17	22,44
RSD _R (%)	11,12	8,36	7,93
Horrat r	0,39	0,35	0,35
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.47. NPIP tekrar üretilebilirlik çalışmaları

	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NPIP	22,48	51,67	107,94
	18,62	64,44	91,09
	16,96	63,59	101,70
	19,06	64,72	109,60
	21,67	51,06	92,55
	18,48	64,32	103,69
	16,21	62,55	110,96
	19,88	67,11	93,07
$\bar{x}$	19,17	61,18	101,33
S_{rw}	2,14	6,20	8,11
R_w	6,00	17,35	22,71
Horrat Testi			
C	1,92E-08	6,12E-08	1,01E-07
PRSD _R (%)	28,75	24,16	22,40
RSD _R (%)	11,18	10,13	8,01
Horrat r	0,39	0,42	0,36
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.48. NDiBA tekrar üretilebilirlik çalışmaları

	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDiBA	16,19	56,03	99,78
	17,88	52,80	100,61
	18,06	58,68	95,46
	22,91	62,62	103,86
	21,29	55,37	118,28
	16,83	67,00	102,20
	19,22	53,71	109,54
	20,12	66,28	110,67
$\bar{x}$	19,06	59,06	105,05
S_{rw}	2,28	5,59	7,33
R_w	6,40	15,65	20,52
Horrat Testi			
C	1,91E-08	5,91E-08	1,05E-07
PRSD _R (%)	28,77	24,28	22,28
RSD _R (%)	11,99	9,46	6,98
Horrat r	0,42	0,39	0,31
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.49. NDBzA tekrar üretilebilirlik çalışmaları

NDBzA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	20,45	52,99	91,19
	19,22	66,78	99,64
	18,23	59,02	103,52
	23,58	67,75	105,19
	21,21	59,16	112,59
	18,56	67,50	108,46
	17,66	61,15	90,24
	21,52	70,76	93,42
$\bar{x}$	20,05	63,14	100,53
S_{rw}	2,00	5,99	8,31
R_w	5,61	16,78	23,27
Horrat Testi			
C	2,01E-08	6,31E-08	1,01E-07
PRSD _R (%)	28,56	24,04	22,42
RSD _R (%)	9,98	9,49	8,27
Horrat r	0,35	0,39	0,37
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

Çizelge 3.50. NDİNA tekrar üretilebilirlik çalışmaları

NDİNA	Çalışma Sonuçları, µg/L		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
	18,40	66,44	91,41
	20,29	66,62	96,93
	24,22	54,93	108,26
	18,94	68,99	92,14
	16,07	51,90	101,13
	20,83	58,31	111,77
	22,72	67,34	114,62
	21,65	56,65	107,61
$\bar{x}$	20,39	61,40	102,98
S_{rw}	2,58	6,65	8,89
R_w	7,23	18,63	24,90
Horrat Testi			
C	2,04E-08	6,14E-08	1,03E-07
PRSD _R (%)	28,48	24,14	22,34
RSD _R (%)	12,66	10,83	8,63
Horrat r	0,44	0,45	0,39
Değerlendirme	UYGUN	UYGUN	UYGUN

3.4.6. Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması

Bu çalışmada ölçüm belirsizliği hesaplanırken aşağıdaki adımlar izlenmiştir [79]:

1. Öncelikle ölçülen büyüklük tanımlanmıştır. Belirsizlik çalışmaları diğer çalışmalarda olduğu gibi 20 µg/L, 60 µg/L ve 100 µg/L derişim noktalarında yapılmıştır.
2. Ölçülen büyüklüğün belirsizliğine etki eden belirsizlik kaynakları belirlenmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların kalibrasyon sertifikalarından, referans malzemelerle yapılan kalibrasyon fonksiyonundan, ölçüm tekrarlanabilirliğinden, tekrar üretilebilirliğinden ve geri kazanımdan elde edilen belirsizlikler dikkate alınmıştır.
3. Tüm belirsizlik kaynaklarından gelen belirsizlikler ölçülmüştür.
4. Belirsizlikler ölçülen değerin dağılım tipine göre standart belirsizliğe dönüştürülmüştür.
5. Standart belirsizlikler kullanılarak birleşik belirsizlikler hesaplanmıştır.
6. Birleştirilmiş belirsizlikler kullanılarak genişletilmiş belirsizlik hesaplanmıştır.
7. Bu verilerden $\pm$ belirsizlik değerleri (sapmalar) hesaplanmıştır.

3.4.6.1. Kalibrasyon Eğrisinden Gelen Ölçüm Belirsizliği

Kullanılan tüm kalibrasyon grafikleri tezin 3.3.2.2 bölümünde verilmiştir. Belirsizlik hesabı yapılırken kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemlerinden faydalanılmıştır. Hesaplamalarda aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

$$U_{cal} = RSD = \frac{U(C_0)}{C_0} \quad (2.16)$$

$$U_{C_0} = \frac{S}{B} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - C_{ort})^2}{S_{xx}}} \quad (2.17)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{n - 2}} \quad (2.18)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - C_{ort})^2 \quad (2.19)$$

- **NDPA**

Çizelge 3.51. NDPA kalibrasyon grafiği verileri

NDPA	
Kalibrasyon Denklemi ($y=bx+a$)	$y = 0,0956x - 0,0020$
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0020
b	0,0956

Çizelge 3.52. NDPA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması (S)

NDPA			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0020	0,0020	0,00000400
0,0082	0,0076	0,0006	0,00000037
0,0172	0,0171	0,0000	0,00000000
0,0243	0,0267	-0,0023	0,00000547
0,0440	0,0458	-0,0018	0,00000340
0,0702	0,0697	0,0005	0,00000028
0,0948	0,0936	0,0012	0,00000145
		Toplam	0,00001352
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0016

Çizelge 3.53. NDPA için residual standart sapma (S_{xx}) hesabı

NDPA				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0	0,0000	0,0209	-0,3862	0,1492
0,10	0,0082	0,1063	-0,3008	0,0905
0,20	0,0172	0,2004	-0,2068	0,0428
0,30	0,0243	0,2755	-0,1316	0,0173
0,50	0,0440	0,4807	0,0736	0,0054
0,75	0,0702	0,7555	0,3484	0,1214
0,100	0,0948	1,0126	0,6055	0,3666
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		S_{xx}	0,7931

Çizelge 3.54. NDPA belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NDPA	
S	0,0016
B	0,0956
p	1
n	7
S/B	0,0172
1/p	1,0000
1/n	0,1429
C _{ort}	0,41
S _{xx}	0,7931

Çizelge 3.55. NDPA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplama

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0541
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0941
$U_{co}, \mu g/L$	0,0188
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0941
Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0469
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0908
$U_{co}, \mu g/L$	0,0188
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0313

Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4432
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2594
$U_{co}, \mu g/L$	0,0217
$RSD = \frac{U (C_0)}{C_0}$	0,0217

- **NMOR**

Çizelge 3.56. NMOR kalibrasyon grafiği verileri

NMOR	
Kalibrasyon Denklemi (y=bx+a)	y = 0,1184x - 0,0007
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0007
b	0,1184

Çizelge 3.57. NMOR için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NMOR			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0007	0,0007	0,00000049
0,0117	0,0111	0,0006	0,00000032
0,0212	0,0230	-0,0018	0,00000328
0,0366	0,0348	0,0017	0,00000303
0,0562	0,0585	-0,0023	0,00000531
0,0893	0,0881	0,0012	0,00000147
0,1178	0,1177	0,0001	0,00000002
		Toplam	0,00001390
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0017

Çizelge 3.58. NMOR için residual standart sapma hesabı

NMOR				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0	0,0000	0,0059	-0,4012	0,1610
0,10	0,0117	0,1048	-0,3024	0,0914
0,20	0,0212	0,1847	-0,2224	0,0495
0,30	0,0366	0,3147	-0,0924	0,0085
0,50	0,0562	0,4805	0,0734	0,0054
0,75	0,0893	0,7602	0,3531	0,1247
0,100	0,1178	1,0011	0,5940	0,3528
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		S_{xx}	0,7933

Çizelge 3.59. NMOR belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NMOR	
S	0,0017
B	0,1184
p	1
n	7
S/B	0,0141
1/p	1,0000
1/n	0,1429
C_{ort}	0,41
S_{xx}	0,7933

Çizelge 3.60. NMOR kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplama

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0541
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0940
$U_{co}, \mu g/L$	0,0154
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0770

Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0469
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0908
$U_{co}, \mu g/L$	0,0154
$RSD = \frac{U (C_0)}{C_0}$	0,0256
Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4431
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2593
$U_{co}, \mu g/L$	0,0177
$RSD = \frac{U (C_0)}{C_0}$	0,0177

- **NPYR**

Çizelge 3.61. NPYR kalibrasyon grafiği verileri

NPYR	
Kalibrasyon Denklemi (y=bx+a)	y = 0,2035x - 0,0015
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0015
b	0,2035

Çizelge 3.62. NPYR için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NPYR			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0015	0,0015	0,00000225
0,0203	0,0189	0,0015	0,00000218
0,0393	0,0392	0,0001	0,00000001
0,0602	0,0596	0,0006	0,00000039
0,0931	0,1003	-0,0071	0,00005089
0,1514	0,1511	0,0002	0,00000005
0,2049	0,2020	0,0029	0,00000824
		Toplam	0,00005577
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0033

Çizelge 3.63. NPYR için residual standart sapma hesabı

NPYR				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0,00	0,0000	0,0074	-0,3998	0,1598
0,10	0,0203	0,1073	-0,2999	0,0899
0,20	0,0393	0,2004	-0,2067	0,0427
0,30	0,0602	0,3031	-0,1041	0,0108
0,50	0,0931	0,4649	0,0578	0,0033
0,75	0,1514	0,7511	0,3440	0,1183
1,00	0,2049	1,0141	0,6070	0,3684
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		Sxx	0,7934

Çizelge 3.64. NPYR belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NPYR	
S	0,0033
B	0,2035
p	1
n	7
S/B	0,0164
1/p	1,0000
1/n	0,1429
C_{ort}	0,41
Sxx	0,7934

Çizelge 3.65. NPYR kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0556
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0948
$U_{co}, \mu g/L$	0,0128
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0638
Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0455
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0901
$U_{co}, \mu g/L$	0,0127
RSD	0,0212
Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4391
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2578
$U_{co}, \mu g/L$	0,0147
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0147

- **NPIP**

Çizelge 3.66. NPIP kalibrasyon grafiği verileri

NPIP	
Kalibrasyon Denklemi ($y=bx+a$)	$y = 0,2035x - 0,0015$
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0015
b	0,2035

Çizelge 3.67. NPIP için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NPIP			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0015	0,0015	0,00000225
0,0203	0,0189	0,0015	0,00000218
0,0393	0,0392	0,0001	0,00000001
0,0602	0,0596	0,0006	0,00000039
0,0931	0,1003	-0,0071	0,00005089
0,1514	0,1511	0,0002	0,00000005
0,2049	0,2020	0,0029	0,00000824
		Toplam	0,00005577
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0033

Çizelge 3.68. NPIP için residual standart sapma hesabı

NPIP				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0,00	0,0000	0,0074	-0,3998	0,1598
0,10	0,0203	0,1073	-0,2999	0,0899
0,20	0,0393	0,2004	-0,2067	0,0427
0,30	0,0602	0,3031	-0,1041	0,0108
0,50	0,0931	0,4649	0,0578	0,0033
0,75	0,1514	0,7511	0,3440	0,1183
1,00	0,2049	1,0141	0,6070	0,3684
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		S_{xx}	0,7934

Çizelge 3.69. NPIP belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NPIP	
S	0,0033
B	0,2035
p	1
n	7
S/B	0,0164
1/p	1,0000
1/n	0,1429
C _{ort}	0,41
S _{xx}	0,7934

Çizelge 3.70. NPIP kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0556
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0948
$U_{co}, \mu g/L$	0,0128
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0638
Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0455
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0901
$U_{co}, \mu g/L$	0,0127
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0212

Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4391
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2578
$U_{co}, \mu g/L$	0,0147
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0147

- **NDiBA**

Çizelge 3.71. NDiBA kalibrasyon grafiği verileri

NDiBA	
Kalibrasyon Denklemi (y=bx+a)	y = 0,1740x - 0,0011
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0011
b	0,1740

Çizelge 3.72. NDiBA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NDiBA			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0011	0,0011	0,00000121
0,0162	0,0163	-0,0001	0,00000001
0,0340	0,0337	0,0003	0,00000012
0,0527	0,0511	0,0016	0,00000256
0,0805	0,0859	-0,0054	0,00002940
0,1314	0,1294	0,0020	0,00000380
0,1738	0,1729	0,0009	0,00000072
		Toplam	0,00003710
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0027

Çizelge 3.73. NDiBA için residual standart sapma hesabı

NDiBA				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0,00	0,0000	0,0063	-0,4008	0,1607
0,10	0,0162	0,0995	-0,3076	0,0946
0,20	0,0340	0,2020	-0,2052	0,0421
0,30	0,0527	0,3092	-0,0979	0,0096
0,50	0,0805	0,4688	0,0617	0,0038
0,75	0,1314	0,7612	0,3541	0,1254
1,00	0,1738	1,0049	0,5977	0,3573
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		S_{xx}	0,7934

Çizelge 3.74. NDiBA belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NDiBA	
S	0,0027
B	0,1740
p	1
n	7
S/B	0,0157
1/p	1,0000
1/n	0,1429
C_{ort}	0,41
S_{xx}	0,7934

Çizelge 3.75. NDiBA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0556
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0947
$U_{co}, \mu g/L$	0,0171
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0857

Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0455
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0901
$U_{co}, \mu g/L$	0,0171
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0284
Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4387
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2576
$U_{co}, \mu g/L$	0,0197
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0197

- **NDBzA**

Çizelge 3.76. NDBzA kalibrasyon grafiği verileri

NDBzA	
Kalibrasyon Denklemi (y=bx+a)	y=0,4980x - 0,0030
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0030
b	0,4980

Çizelge 3.77. NDBzA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NDBzA			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0030	0,0030	0,00000900
0,0511	0,0468	0,0043	0,00001825
0,0971	0,0966	0,0005	0,00000029
0,1448	0,1464	-0,0016	0,00000242
0,2339	0,2460	-0,0121	0,00014593
0,3701	0,3705	-0,0004	0,00000013
0,5013	0,4950	0,0063	0,00003922
		Toplam	0,00017603
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0059

Çizelge 3.78. NDBzA için residual standart sapma hesabı

NDBzA				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0,00	0,0000	0,0060	-0,4011	0,1609
0,10	0,0511	0,1086	-0,2986	0,0891
0,20	0,0971	0,2011	-0,2061	0,0425
0,30	0,1448	0,2969	-0,1103	0,0122
0,50	0,2339	0,4757	0,0686	0,0047
0,75	0,3701	0,7493	0,3421	0,1171
1,00	0,5013	1,0126	0,6054	0,3665
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		Sxx	0,7930

Çizelge 3.79. NDBzA belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NDBzA	
S	0,0059
B	0,4980
p	1
n	7
S/B	0,0119
1/p	1,0000
1/n	0,1429
Cort	0,41
Sxx	0,7930

Çizelge 3.80. NDBzA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 ppb	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0556
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0947
$U_{co}, \mu g/L$	0,0130
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0652
Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0455
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0901
$U_{co}, \mu g/L$	0,0130
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0216
Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4390
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2577
$U_{co}, \mu g/L$	0,0150
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0150

- **NDiNA**

Çizelge 3.81. NDiNA kalibrasyon grafiği verileri

NDiNA	
Kalibrasyon Denklemi ($y=bx+a$)	$y= 0,0706x - 0,0016$
Çalışma Noktası, ppb	0, 10, 20, 30, 50, 75, 100
Çalışma Sayısı, n	7
a	-0,0016
b	0,0706

Çizelge 3.82. NDiNA için kalibrasyon eğrisinin standart sapması

NDiNA			
y_i	$a + bx_i$	$y_i - (a + bx_i)$	$(y_i - (a + bx_i))^2$
0,0000	-0,0016	0,0016	0,00000256
0,0065	0,0055	0,0010	0,00000101
0,0114	0,0125	-0,0011	0,00000118
0,0187	0,0196	-0,0009	0,00000075
0,0319	0,0337	-0,0018	0,00000324
0,0502	0,0514	-0,0011	0,00000124
0,0710	0,0690	0,0020	0,00000383
		Toplam	0,00000999
		n-2	5,00
Doğrunun Standart Sapması		S	0,0014

Çizelge 3.83. NDiNA için residual standart sapma hesabı

NDiNA				
c	y_i	$x_i = c_i = (y_i - a)/b$	$c_i - c_{ort}$	$(c_i - c_{ort})^2$
0,00	0,0000	0,0227	-0,3845	0,1478
0,10	0,0065	0,1143	-0,2929	0,0858
0,20	0,0114	0,1846	-0,2225	0,0495
0,30	0,0187	0,2877	-0,1194	0,0143
0,50	0,0319	0,4745	0,0674	0,0045
0,75	0,0502	0,7342	0,3271	0,1070
1,00	0,0710	1,0277	0,6206	0,3851
$C_{ort} = 0,41$	Residual Standart Sapma		Sxx	0,7940

Çizelge 3.84. NDiNA belirsizlik hesabında kullanılan değerler

NDiNA	
S	0,0014
B	0,0706
p	1
n	7
S/B	0,0200
1/p	1,0000
1/n	0,1429
Cort	0,41
Sxx	0,7940

Çizelge 3.85. NDiNA kalibrasyon fonksiyonu için RSD hesaplaması

Ölçüm Belirsizliği (U)- 20 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0555
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0947
$U_{co}, \mu g/L$	0,0219
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,1096
Ölçüm Belirsizliği (U)- 60 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,0455
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,0901
$U_{co}, \mu g/L$	0,0218
$RSD = \frac{U(C_0)}{C_0}$	0,0364

Ölçüm Belirsizliği (U)- 100 µg/L	
$\frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}$	0,4384
$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C_{ort})^2}{S_{xx}}}$	1,2575
$U_{co}, \mu g/L$	0,0252
$RSD = \frac{U(C_o)}{C_o}$	0,0252

Tüm maddelerin kalibrasyon fonksiyonlarının standart belirsizlik değerleri (RSD) Çizelge 3.86’da verilmiştir.

Çizelge 3.86. Kalibrasyon Fonksiyonu Özet Standart Belirsizlik Tablosu

Madde	RSD		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDPA	0,0941	0,0313	0,0217
NMOR	0,0770	0,0256	0,0177
NPYR	0,0638	0,0212	0,0147
NPIP	0,0898	0,0298	0,0206
NDiBA	0,0857	0,0284	0,0197
NDBzA	0,0652	0,0216	0,0150
NDiNA	0,1096	0,0364	0,0252

3.4.6.2. Tekrarlanabilirlikten Gelen Ölçüm Belirsizliği

Tezin 3.4.4 maddesinde yer alan tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait verileri ile bu verilerin bağlı standart sapma ve ölçüm sayısı değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmış olan standart belirsizlik değerleri Çizelge 3.87’da verilmiştir.

$$U_r = \frac{RSD_r}{\sqrt{n}} \quad (2.13)$$

Çizelge 3.87. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları Özet Belirsizlik Tablosu

Madde	$U_r (n = 8)$		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDPA	0,0305	0,0268	0,0239
NMOR	0,0310	0,0283	0,0265
NPYR	0,0313	0,0305	0,0277
NPIP	0,0314	0,0284	0,0268
NDiBA	0,0348	0,0320	0,0244
NDBzA	0,0313	0,0278	0,0280
NDiNA	0,0431	0,0358	0,0301

3.4.6.3. Tekrar Üretilirlikten Gelen Ölçüm Belirsizliği

Tezin 3.4.5 maddesinde yer alan tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait veriler ile bu verilerin RSD değerleri ve ölçüm sayısı değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanan standart belirsizlik değerleri Çizelge 3.88’de verilmiştir.

$$U_{Rw} = \frac{RSD_{Rw}}{\sqrt{n}} \quad (2.14)$$

Çizelge 3.88. Tekrar Üretilirlik Çalışmaları Özet Standart Belirsizlik Tablosu

Madde	$U_{Rw} (n = 8)$		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDPA	0,0332	0,0270	0,0262
NMOR	0,0457	0,0316	0,0298
NPYR	0,0393	0,0296	0,0280
NPIP	0,0395	0,0358	0,0283
NDiBA	0,0424	0,0334	0,0247
NDBzA	0,0353	0,0336	0,0292
NDiNA	0,0448	0,0383	0,0305

3.4.6.4. Geri Kazanımdan Gelen Ölçüm Belirsizliği

Çizelge 3.34’de belirtilmiş olan değerler kullanılarak n=6 ölçüm için hesaplanan standart belirsizlik değerleri Çizelge 3.89’da verilmiştir.

$$U_R = \frac{RSD_R}{\sqrt{n}} \quad (2.15)$$

Çizelge 3.89. Geri kazanım çalışmaları belirsizlik hesaplaması

Madde	c	$\bar{x}$	S_R	RSD_R
NDPA	20 µg/L	111,95	23,21	0,2073
	60 µg/L	109,74	15,97	0,1455
	100 µg/L	106,54	20,28	0,1903
NMOR	20 µg/L	103,65	23,61	0,2278
	60 µg/L	107,68	15,40	0,1430
	100 µg/L	102,06	16,77	0,1643
NPYR	20 µg/L	106,78	29,67	0,2779
	60 µg/L	112,56	16,04	0,1425
	100 µg/L	113,15	19,15	0,1693
NPIP	20 µg/L	118,93	17,85	0,1501
	60 µg/L	92,43	13,73	0,1486
	100 µg/L	101,64	14,03	0,1380
NDiBA	20 µg/L	103,18	23,58	0,2285
	60 µg/L	104,32	17,62	0,1689
	100 µg/L	117,22	18,69	0,1594
NDBzA	20 µg/L	114,27	44,12	0,3861
	60 µg/L	114,75	12,66	0,1103
	100 µg/L	119,76	12,70	0,1060
NDiNA	20 µg/L	131,05	27,82	0,2123
	60 µg/L	109,01	21,65	0,1986
	100 µg/L	103,67	23,38	0,2255

Çizelge 3.90. Geri kazanım çalışmaları özet standart belirsizlik tablosu

Madde	$U_R (n = 6)$		
	20 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
NDPA	0,0846	0,0594	0,0777
NMOR	0,0930	0,0584	0,0671
NPYR	0,1135	0,0582	0,0691
NPIP	0,0613	0,0607	0,0563
NDiBA	0,0933	0,0690	0,0651
NDBzA	0,1576	0,0450	0,0433
NDiNA	0,1135	0,0811	0,0921

3.4.6.5. Ölçüm Aletlerinden Gelen Ölçüm Belirsizliği

Özütleme ve analiz aşamasında kullanılan cihazlar ve cihazların kalibrasyon sertifikalarından gelen belirsizlikler Çizelge 3.91’de listelenmiştir. Kalibrasyon sertifikalarında, hesaplanan belirsizlik değerlerinin genişletilmiş ölçüm belirsizliği olduğu ve standart belirsizliğin %95 güven aralığında $k=2$ belirsizlik faktörü ile çarpılarak hesaplandığı belirtilmiştir. Bu sebeple sertifikadan gelen belirsizlikler Eşitlik 3.5 kullanılarak standart belirsizliğe dönüştürülmüştür.

$$\text{Standart Belirsizlik} = \frac{\text{Genişletilmiş Belirsizlik}}{2} \quad (3.5)$$

Çizelge 3.91. Ölçüm aletlerinden gelen ölçüm belirsizliği

Ölçüm aleti	x	U	k	U _x	RSD = $\frac{U_x}{x}$
Terazi	5,5 g	0,0003 g	2	0,00015 g	0,0000
Etüv	40 °C	0,74 °C	2	0,37 °C	0,0093
Mezür	30 ml	0,0467 ml	2	0,02335 ml	0,0008
Mikropipet	4 ml	0,0060 ml	2	0,0030 ml	0,0008
	0,5 ml	0,0013 ml	2	0,00065 ml	0,0013
	1 ml	0,0017 ml	2	0,00085 ml	0,0009
	0,9 ml	0,0017 ml	2	0,00085 ml	0,0009
	90 ml	0,0328 ml	2	0,0149 ml	0,0002

3.4.6.6. Birleştirilmiş ve Genişletilmiş Belirsizlik

Eurachem & CITAC kılavuzuna göre, en büyük belirsizliğin üçte birinden daha az olan belirsizlik bileşenlerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesine gerek olmayacağı belirtilmiştir [91]. Ölçüm aletlerinden gelen belirsizliğin hesaplamalara dahil edilip edilmeyeceğine bu kritere göre karar verilmiştir. 7 adet maddenin hepsinde tüm çalışma noktalarında en yüksek belirsizlik değerleri geri kazanım çalışmalarından elde edilmiştir. Geri kazanım verilerinin üçte biri hesaplanarak Çizelge 3.92’de verilmiştir. Ölçüm aletlerinden gelen belirsizlik, diğer belirsizlik kaynaklarından gelen belirsizliğin yanında anlamlı büyüklükte olmadığı için belirsizlik tahmini oluştururken ihmal edilmiştir.

Çizelge 3.92. Belirsizlik değerlendirmesi

Madde	c	U_R	$U_R/3$
NDPA	20 µg/L	0,0846	0,0282
	60 µg/L	0,0594	0,0198
	100 µg/L	0,0777	0,0259
NMOR	20 µg/L	0,0930	0,0310
	60 µg/L	0,0584	0,0195
	100 µg/L	0,0671	0,0224
NPYR	20 µg/L	0,1135	0,0378
	60 µg/L	0,0582	0,0194
	100 µg/L	0,0691	0,0230
NPIP	20 µg/L	0,0613	0,0204
	60 µg/L	0,0607	0,0202
	100 µg/L	0,0563	0,0188
NDiBA	20 µg/L	0,0933	0,0311
	60 µg/L	0,0690	0,0230
	100 µg/L	0,0651	0,0217
NDBzA	20 µg/L	0,1576	0,0525
	60 µg/L	0,0450	0,0150
	100 µg/L	0,0433	0,0144
NDiNA	20 µg/L	0,0867	0,0289
	60 µg/L	0,0811	0,0270
	100 µg/L	0,0921	0,0307

Bu çalışmada belirsizliğe anlamlı ölçüde etki eden faktörler ele alındığında hesaplamalar yapılırken kalibrasyon fonksiyonundan gelen ölçüm belirsizliği (U_{cal}), tekrarlanabilirlikten gelen ölçüm belirsizliği (U_r), tekrar üretilebilirlikten gelen ölçüm belirsizliği (U_{Rw}) ve geri kazanımdan gelen ölçüm belirsizliği (U_R) kullanılarak aşağıdaki eşitlikler yardımıyla birleştirilmiş ölçüm belirsizliği elde edilmiş ve Çizelge 3.93’de verilmiştir.

$$\text{Birleştirilmiş belirsizlik: } U_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + \dots + U_n^2} \quad (2.17)$$

$$\text{Genişletilmiş belirsizlik: } U = U_c * k \quad (2.18)$$

$$\text{Belirsizlik değeri: } \pm x * U \quad (2.19)$$

Çizelge 3.93. Birleştirilmiş ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği

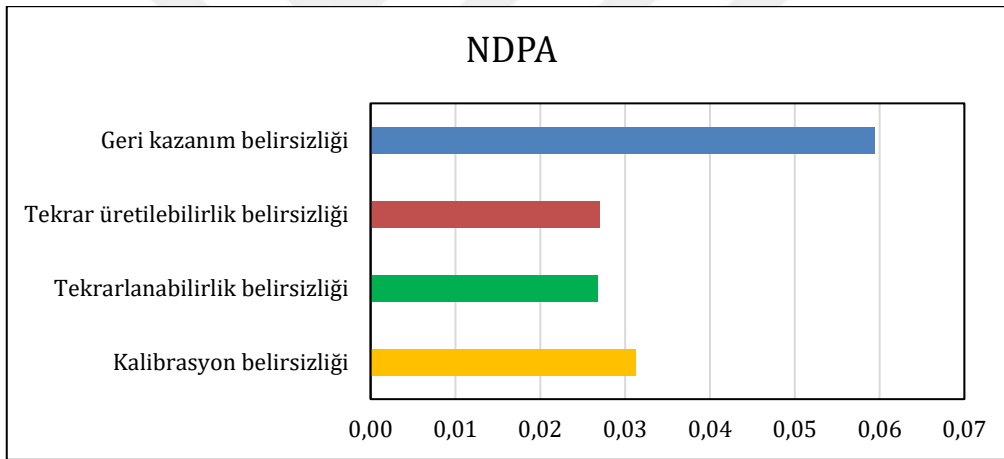
20 µg/L	U_{cal}	U_r	U_{Rw}	U_R	U_c	U
NDPA	0,0333	0,0108	0,0117	0,0346	0,0506	0,1011
NMOR	0,0770	0,0310	0,0457	0,0930	0,1328	0,2656
NPYR	0,0638	0,0313	0,0393	0,1135	0,1395	0,2790
NPIP	0,0898	0,0314	0,0395	0,0613	0,1199	0,2398
NDiBA	0,0857	0,0309	0,0424	0,0933	0,1371	0,2742
NDBzA	0,0652	0,0313	0,0353	0,1576	0,1770	0,3540
NDiNA	0,1096	0,0431	0,0447	0,0867	0,1529	0,3058
60 µg/L	U_{cal}	U_r	U_{Rw}	U_R	U_c	U
NDPA	0,0313	0,0268	0,0270	0,0594	0,0772	0,1543
NMOR	0,0256	0,0283	0,0316	0,0584	0,0766	0,1532
NPYR	0,0212	0,0305	0,0296	0,0582	0,0751	0,1502
NPIP	0,0298	0,0284	0,0358	0,0607	0,0816	0,1632
NDiBA	0,0284	0,0320	0,0335	0,0689	0,0878	0,1756
NDBzA	0,0216	0,0278	0,0336	0,0450	0,0663	0,1326
NDiNA	0,0364	0,0358	0,0383	0,0811	0,1032	0,2064
100 µg/L	U_{cal}	U_r	U_{Rw}	U_R	U_c	U
NDPA	0,0082	0,0085	0,0092	0,0317	0,0351	0,0702
NMOR	0,0177	0,0265	0,0298	0,0671	0,0800	0,1600
NPYR	0,0147	0,0277	0,0280	0,0691	0,0809	0,1618
NPIP	0,0206	0,0268	0,0283	0,0563	0,0716	0,1431
NDiBA	0,0197	0,0244	0,0247	0,0651	0,0763	0,1527
NDBzA	0,0150	0,0280	0,0292	0,0433	0,0611	0,1222
NDiNA	0,0252	0,0301	0,0305	0,0921	0,1046	0,2093

Elde edilen tüm veriler sonucunda ölçüm belirsizliği, genişletilmiş belirsizlik kullanılarak %95 güven aralığında " $x \pm x * U$ " olarak raporlanabilir. 7 madde için hesaplanmış $\pm$ belirsizlik değerleri Çizelge 3.94'de verilmiştir.

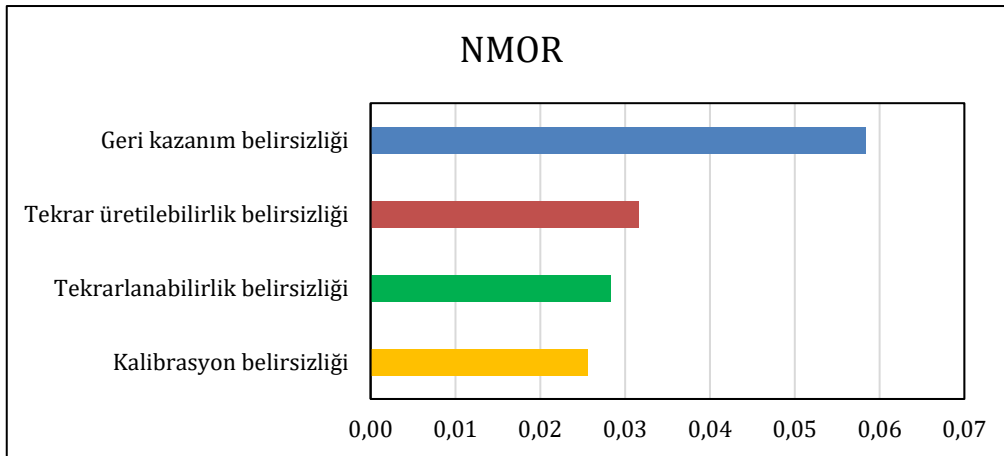
Çizelge 3.94. Belirsizliğin Raporlanması

	Belirsizlik: $\pm \mu\text{g/L}$						
Derişim	NDPA	NMOR	NPYR	NPIP	NDiBA	NDBzA	NDiNA
20 $\mu\text{g/L}$	2,02	5,31	5,58	4,80	5,48	7,08	6,12
60 $\mu\text{g/L}$	9,26	9,19	9,01	9,79	10,53	7,96	12,38
100 $\mu\text{g/L}$	7,02	16,00	16,18	14,31	15,27	12,22	20,93
	Belirsizlik: $\pm \%$						
Derişim	NDPA	NMOR	NPYR	NPIP	NDiBA	NDBzA	NDiNA
20 $\mu\text{g/L}$	10,1	26,6	27,9	24,0	27,4	35,4	30,6
60 $\mu\text{g/L}$	5,6	5,5	5,4	5,9	6,3	4,8	7,4
100 $\mu\text{g/L}$	7,0	16,0	16,2	14,3	15,3	12,2	20,9

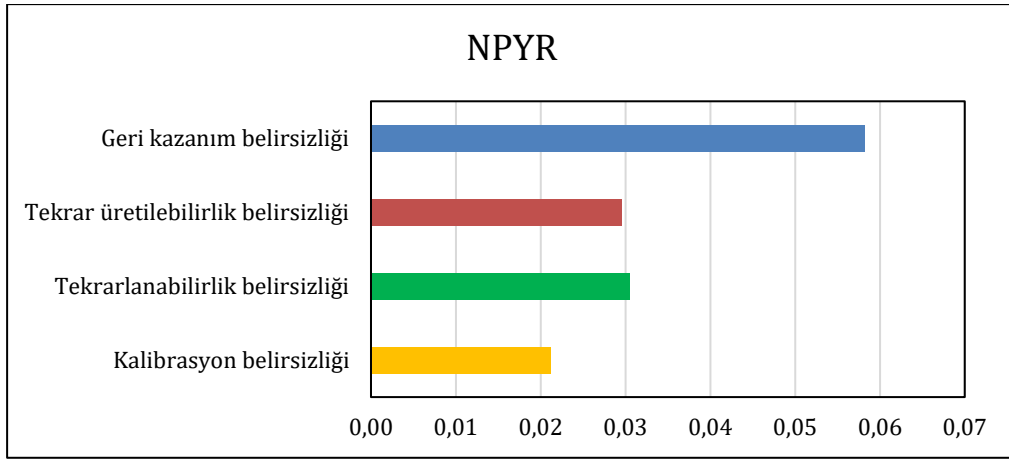
Belirsizlik kaynaklarından gelen belirsizlikler aşağıdaki şekillerde grafiksel olarak verilmiştir.



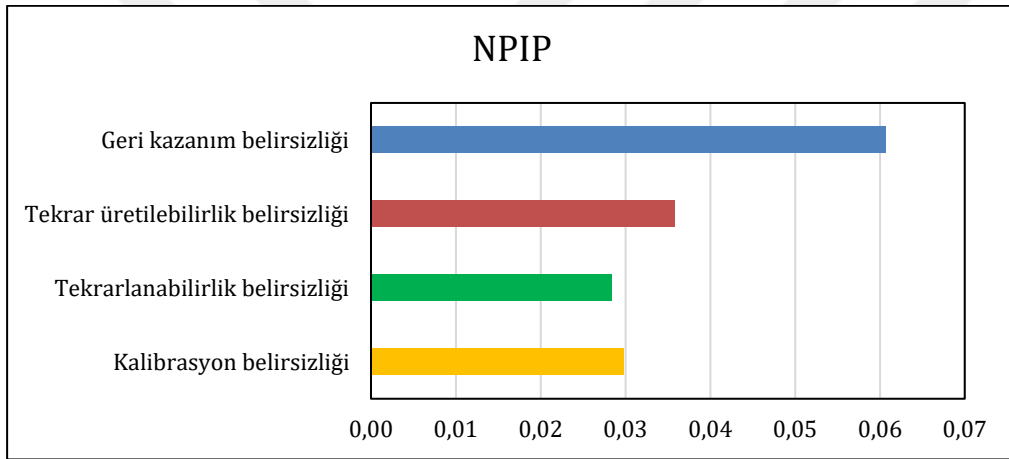
Şekil 3.51. NDPA belirsizlik kaynakları grafiği



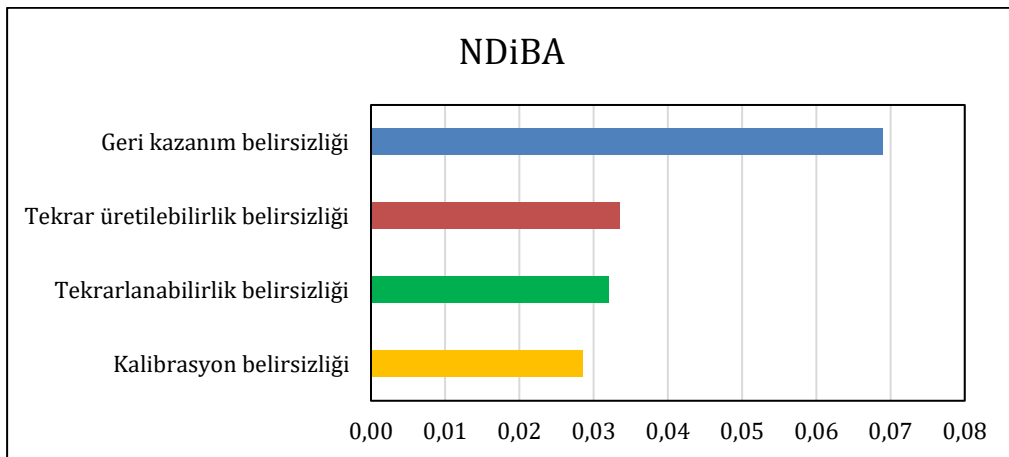
Şekil 3.52. NMOR belirsizlik kaynakları grafiği



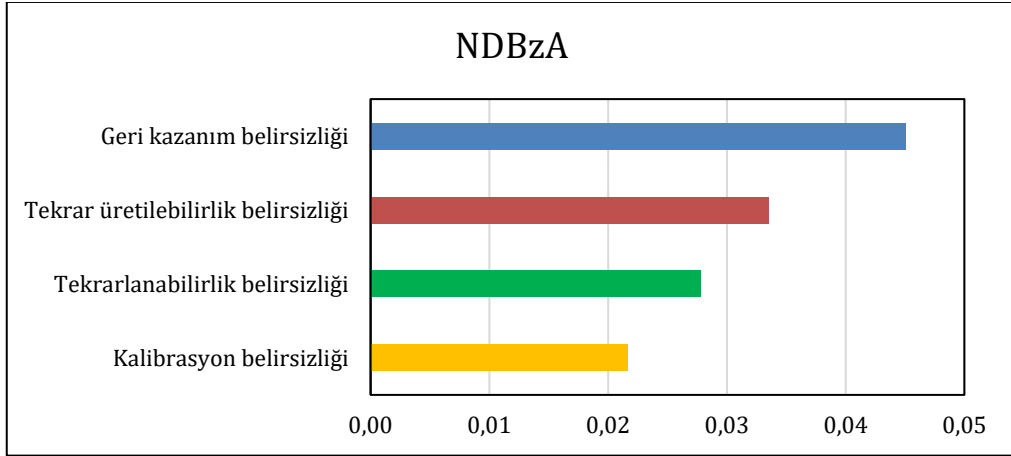
Şekil 3.53. NPYR belirsizlik kaynakları grafiği



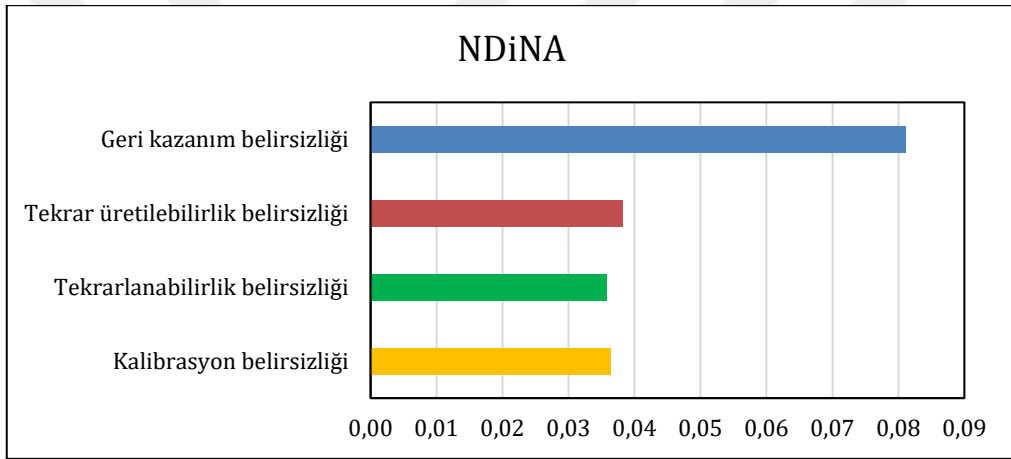
Şekil 3.54. NPIP belirsizlik kaynakları grafiği



Şekil 3.55. NDiBA belirsizlik kaynakları grafiği



Şekil 3.56. NDBzA belirsizlik kaynakları grafiği



Şekil 3.57. NDiNA belirsizlik kaynakları grafiği

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında 7 adet nitrozamin maddesinin tıbbi malzemelerde ekstrakte edilebilir/süzülebilir madde analizi bağlamında incelenmesi amacıyla bir GC-MS metodu geliştirme ve doğrulama çalışması yapılmıştır. Her bir madde için yapılan çalışmaların toplu sonuç tabloları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.1. NDPA- Sonuç Tablosu

NDPA		
t_R		14,955
Hedef İyon, Q1		70.2
Tanımlayıcı İyon, Q2		101.0
		113.1
r^2		0,9979
LOD, $\mu\text{g/L}$		8,7
LOQ, $\mu\text{g/L}$		29,2
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 $\mu\text{g/L}$	5,24
	60 $\mu\text{g/L}$	12,97
	100 $\mu\text{g/L}$	20,01
Tekrar Üretilirlik limiti (R_w)	20 $\mu\text{g/L}$	5,63
	60 $\mu\text{g/L}$	13,39
	100 $\mu\text{g/L}$	20,34
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 $\mu\text{g/L}$	111,95
	60 $\mu\text{g/L}$	109,74
	100 $\mu\text{g/L}$	106,54
Birleşik Belirsizlik, RSD	20 $\mu\text{g/L}$	0,0506
	60 $\mu\text{g/L}$	0,0772
	100 $\mu\text{g/L}$	0,0351
Genişletilmiş Belirsizlik	20 $\mu\text{g/L}$	0,1011
	60 $\mu\text{g/L}$	0,1543
	100 $\mu\text{g/L}$	0,0702
Ölçüm Belirsizliği, $\pm\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	2,02
	60 $\mu\text{g/L}$	9,26
	100 $\mu\text{g/L}$	7,02

Çizelge 4.2. NMOR- Sonuç Tablosu

NMOR		
t_R		15,270
Hedef İyon, Q1		116.1
Tanımlayıcı İyon, Q2		56.0 86.1
r^2		0,9987
LOD, µg/L		7,8
LOQ, µg/L		23,7
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 µg/L	4,87
	60 µg/L	13,68
	100 µg/L	21,04
Tekrar Üretilebilirlik limiti (R_w)	20 µg/L	7,28
	60 µg/L	14,98
	100 µg/L	23,79
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 µg/L	103,65
	60 µg/L	107,68
	100 µg/L	102,06
Birleşik Belirsizlik	20 µg/L	0,1328
	60 µg/L	0,0766
	100 µg/L	0,0800
Genişletilmiş Belirsizlik	20 µg/L	0,2656
	60 µg/L	0,1532
	100 µg/L	0,1600
Ölçüm Belirsizliği, ±µg/L	20 µg/L	5,31
	60 µg/L	9,19
	100 µg/L	16,00

Çizelge 4.3. NPYR- Sonuç Tablosu

NPYR		
t_R		15,704
Hedef İyon, Q1		100.0
Tanımlayıcı İyon, Q2		41.0 68.0
r^2		0,9989
LOD, µg/L		1,7
LOQ, µg/L		9,7
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 µg/L	4,80
	60 µg/L	13,94
	100 µg/L	21,89
Tekrar Üretilebilirlik limiti (R_w)	20 µg/L	6,28
	60 µg/L	14,28
	100 µg/L	22,18
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 µg/L	106,78
	60 µg/L	112,56

	100 µg/L	113,15
Birleşik Belirsizlik	20 µg/L	0,1395
	60 µg/L	0,0751
	100 µg/L	0,0809
Genişletilmiş Belirsizlik	20 µg/L	0,2790
	60 µg/L	0,1502
	100 µg/L	0,1618
Ölçüm Belirsizliği, ±µg/L	20 µg/L	5,58
	60 µg/L	9,01
	100 µg/L	16,18

Çizelge 4.4. NPIP- Sonuç Tablosu

NPIP		
t_R		16,926
Hedef İyon, Q1		114,1
Tanımlayıcı İyon, Q2		42,1
		56,1
r^2		0,9981
LOD, µg/L		1,6
LOQ, µg/L		5,5
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 µg/L	4,82
	60 µg/L	13,61
	100 µg/L	21,74
Tekrar Üretilirlik limiti (R_w)	20 µg/L	6,00
	60 µg/L	17,35
	100 µg/L	22,71
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 µg/L	118,93
	60 µg/L	92,43
	100 µg/L	101,64
Birleşik Belirsizlik	20 µg/L	0,1199
	60 µg/L	0,0816
	100 µg/L	0,0716
Genişletilmiş Belirsizlik	20 µg/L	0,2398
	60 µg/L	0,1632
	100 µg/L	0,1431
Ölçüm Belirsizliği, ±µg/L	20 µg/L	4,80
	60 µg/L	9,79
	100 µg/L	14,31

Çizelge 4.5. NDiBA- Sonuç Tablosu

NDiBA		
t_R		18,241
Hedef İyon, Q1		84.1
Tanımlayıcı İyon, Q2		115.1 141.2
r^2		0,9984
LOD, $\mu\text{g/L}$		7,1
LOQ, $\mu\text{g/L}$		16,7
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 $\mu\text{g/L}$	4,59
	60 $\mu\text{g/L}$	15,28
	100 $\mu\text{g/L}$	18,83
Tekrar Üretilirlik limiti (R_w)	20 $\mu\text{g/L}$	6,40
	60 $\mu\text{g/L}$	15,65
	100 $\mu\text{g/L}$	20,52
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 $\mu\text{g/L}$	103,18
	60 $\mu\text{g/L}$	104,32
	100 $\mu\text{g/L}$	117,22
Birleşik Belirsizlik	20 $\mu\text{g/L}$	0,1371
	60 $\mu\text{g/L}$	0,0878
	100 $\mu\text{g/L}$	0,0763
Genişletilmiş Belirsizlik	20 $\mu\text{g/L}$	0,2742
	60 $\mu\text{g/L}$	0,1756
	100 $\mu\text{g/L}$	0,1527
Ölçüm Belirsizliği, $\pm\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	5,48
	60 $\mu\text{g/L}$	10,53
	100 $\mu\text{g/L}$	15,27

Çizelge 4.6. NDBzA- Sonuç Tablosu

NDBzA		
t_R		35,730
Hedef İyon, Q1		91.1
Tanımlayıcı İyon, Q2		226.1
r^2		0,9989
LOD, $\mu\text{g/L}$		7,4
LOQ, $\mu\text{g/L}$		33,6
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 $\mu\text{g/L}$	4,73
	60 $\mu\text{g/L}$	13,71
	100 $\mu\text{g/L}$	23,14
Tekrar Üretilirlik limiti (R_w)	20 $\mu\text{g/L}$	5,61
	60 $\mu\text{g/L}$	16,78
	100 $\mu\text{g/L}$	23,27
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 $\mu\text{g/L}$	114,27
	60 $\mu\text{g/L}$	114,75

	100 µg/L	119,76
Birleşik Belirsizlik	20 µg/L	0,1770
	60 µg/L	0,0663
	100 µg/L	0,0611
Genişletilmiş Belirsizlik	20 µg/L	0,3540
	60 µg/L	0,1326
	100 µg/L	0,1222
Ölçüm Belirsizliği, ±µg/L	20 µg/L	7,08
	60 µg/L	7,96
	100 µg/L	12,22

Çizelge 4.7. NDiNA- Sonuç Tablosu

NDiNA		
t _R		35,827
Hedef İyon, Q1		169.1
Tanımlayıcı İyon, Q2		225.2
r ²		0,9965
LOD, µg/L		19
LOQ, µg/L		56,4
Kalibrasyon Fonksiyonu, RSD	20 µg/L	0,1096
	60 µg/L	0,0364
	100 µg/L	0,0252
Tekrarlanabilirlik limiti (r)	20 µg/L	6,91
	60 µg/L	17,41
	100 µg/L	24,04
Tekrar Üretilebilirlik limiti (R _w)	20 µg/L	7,23
	60 µg/L	18,63
	100 µg/L	24,90
Geri Kazanım Oranları (%R)	20 µg/L	131,05
	60 µg/L	109,01
	100 µg/L	103,67
Birleşik Belirsizlik	20 µg/L	0,1529
	60 µg/L	0,1032
	100 µg/L	0,1046
Genişletilmiş Belirsizlik	20 µg/L	0,3058
	60 µg/L	0,2064
	100 µg/L	0,2093
Ölçüm Belirsizliği, ±µg/L	20 µg/L	6,12
	60 µg/L	12,38
	100 µg/L	20,93

5. DEĞERLENDİRME

- Bu çalışmada doğrudan enjeksiyon yöntemiyle tıbbi malzemelerde NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA, NDBzA ve NDiNA maddelerinin analizi için GC-MS metodu geliştirilmiştir.
- İç standart olarak NDEA-d10 kullanılarak GC-MS için kritik parametreler optimize edilmiştir.
- Doğrusallık çalışmaları 10µg/L-100µg/L aralığında 6 noktalı kalibrasyon ile yapılmıştır.
- Her madde için bağıl derişim (maddelerin derişim değerlerinin iç standardın derişimine oranı) değerleri x eksenini oluştururken, bağıl alan (maddelerin pik alanı değerlerinin iç standardın pik alanına oranı) değerleri de y eksenini oluşturarak iç standartlı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.
- Kalibrasyon eğrilerinin tayin katsayıları (r^2) 0,9965 ile 0,9989 aralığında değişmektedir ve böylece kalibrasyonun yüksek doğrusal uyumu sağladığı belirlenmiştir.
- Belirlenen çalışma aralığının lineer olduğu doğrulandıktan sonra metodun LOD-LOQ tahminleri cihazdan alınan “Sinyal/Gürültü” oranlarına göre yapılmıştır. Tayin sınırları (LOQ) NDPA için 29,2 µg/L, NMOR için 23,7 µg/L, NPYR için 9,7 µg/L, NPIP için 5,5 µg/L, NDiBA için 16,7 µg/L, NDBzA için 33,6 µg/L ve NDiNA için 56,4 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre 10µg/L-100µg/L çalışma aralığının yalnızca NPYR ve NPIP için uygun olduğu, diğer maddeler için ise kalibrasyon eğrisinin alt derişim noktalarının tespit limitinin altında olması nedeniyle uygun olmadığı değerlendirilmiştir.
- Metodun kesinlik çalışmaları kapsamında tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik çalışmalarının tamamı HorRat testinden geçerek tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir veriler elde edilebildiği doğrulanmış olup metod performans

kriteri karşılanmıştır. Tüm maddeler için çalışma aralığının alt, orta ve üst düzeylerinde bağıl standart sapmalar %13'den az tespit edilmiştir. AOAC tarafından tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik bağıl standart sapmaları için belirlenen kabul kriteri maksimum %21 olup bu çalışmada geliştirilen metot için hassasiyetin minimum kabul edilebilir düzeyden daha iyi olduğu görülmektedir [88].

- Geri kazanım oranları NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA ve NDBzA için 20 µg/L (düşük), 60 µg/L (orta), 100 µg/L (yüksek) derişim noktalarında %95±30 aralığında bulunmuştur. Fakat NDiNA için 60 µg/L (orta) ve 100 µg/L (yüksek) derişim noktalarında geri kazanım %95±30 aralığında iken, 20 µg/L (düşük) derişim seviyesinde aralığın dışına çıkmıştır. NDiNA için tayin limiti (LOQ) 56,4 µg/L ve algılama limiti (LOD) 19,0 µg/L olması sebebiyle 20 µg/L çalışma değeri, cihazın bu maddeyi algılama limitinde olup tayin limitinin altındadır. Dolayısıyla bu seviyede yapılan geri kazanım çalışmasının NDiNA için anlamlı olmadığı görülmüştür.
- Gerçekleştirilen tüm bu çalışmaların verileri ile ölçüm belirsizliği hesaplanarak ölçüm sonuçlarının güven aralığı ortaya konulmuştur. NDPA, NMOR, NPYR, NPIP ve NDiBA için ölçüm belirsizlikleri üç farklı derişim seviyesinde de maksimum %30 olarak tespit edilmiş olup NDBzA ve NDiNA için belirsizlik değerleri 20 µg/L noktasında %30'un üzerindedir.
- Elde edilen sonuçlar ışığında NDiNA ve NDBzA için elde edilen LOD-LOQ seviyeleri ve geri kazanım oranları değerlendirildiğinde 20 µg/L derişim noktası çalışma için uygun bulunmamıştır. Bu maddeler için yeni bir çalışma aralığı belirlenmesi gerektiğine karar verilmiştir.
- Geliştirilen GC-MS metodunun gerçekte uygulanabilirliğinin araştırılması bağlamında öncelikle literatürde tıbbi malzemeler üzerinde GC-MS cihazı ile yapılmış olan çalışmalar incelenmiş fakat bu kapsamda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tıbbi malzemeler için nitrozamin analizi konusunda metot geliştirme çalışmaları yeterli veri sağlamamaktadır. Fakat, gıda ve ilaç

endüstrisinde yapılmış çalışmaların bu çalışmaya değerlendirme anlamında kaynak sağlayabileceği düşünülmüştür.

- İlaç ve gıda ürünlerinde yapılan çalışmalarda özütleme koşulları farkı nedeniyle geri kazanım açısından çalışmaların karşılaştırılamayacağı fakat matriks etkisinin söz konusu olmadığı durumlarda LOD-LOQ değerlerinin karşılaştırılabileceği değerlendirilmiştir. LOD-LOQ karşılaştırması için GC-MS cihazı kullanılarak yapılan benzer çalışmalar [100, 101, 102] ele alınmıştır. Roasa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada et ürünlerinde GC-MS cihazı ile uçucu nitrozamin analiz çalışmalarında LOQ değerleri maksimum 12 µg/kg bulunurken, Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada GC-MS cihazı ile türevlendirme işlemi yapılarak LOD değerleri 16-53 µg /L tespit edilmiştir. Chen ve arkadaşları çevre sularındaki nitrozamini tespit etmek için GC-MS cihazı ile yaptıkları metotta LOQ değerini 50 µg/L bulurken aynı çalışmada GC-MS-MS cihazı ile yapılan metotta LOQ değerini 100 kat daha iyi bulmuştur.
- GC-MS tekniği kullanılırken en büyük risk matriks etkilerinin miktarsal sonuçları etkileyebilmesidir. Bu problemin çözümü de iç standartların kullanımıdır.
- Cihaz üreticisi tarafından kromatografide kütle analizörlerinin sayısının metot performansına üzerine etkisini inceleyen bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada tek kuadropol kullanılarak NDMA, NDEA, NEIPA ve NDIPA maddeleri analiz edilmiş ve cihazdan alınan LOQ değerleri tüm maddeler için 50-100 µg/L aralığında tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında üç kuadropol kullanılarak LOQ değerlerinin 8-40 µg/L aralığında olduğu görülmektedir. Bu çalışma tekli quadropole sistemlerinin daha düşük hassasiyet ve daha düşük özgüllük sağladığını göstermektedir [103].
- Literatürde cihazların birbiriyle karşılaştırılmalarına yardımcı olabilecek pek çok yayın vardır. Fakat kromatografik cihazlar arasında en öne çıkan LC-MS/MS ve GC-MS ve GC-MS/MS cihazlarıdır. LC-MS/MS yüksek hassasiyetine rağmen yüksek analiz maliyetleri nedeniyle çok fazla tercih edilmemektedir. GC-MS ve GC-MS/MS arasındaki duyarlılık farkı nedeniyle GC-MS/MS daha fazla tercih

edilmiştir. Aynı matriks üzerinde yapılan karşılaştırma çalışmalarında GC-MS-MS cihazından alınan hassasiyetin GC-MS tekniklerine göre daha fazla olduğu görülmektedir. GC-MS/MS tekniği ile yapılan çalışmalardan elde edilen LOQ değerleri ppt-ppb aralığında son derece farklılık göstermektedir [102, 104].

- EN 12868 standardı kapsamında yapılmış olan validasyon çalışmalarının sonucu incelendiğinde çalışmaya katılan laboratuvarların LC-MS/MS, GC-MS/MS ve GC-MS kullandıkları raporlanmıştır. Doğrulama denemesinde bazı bireysel laboratuvarlardan LC-MS/MS veya GC-MS kullananların sonuçları doğrulama göstermesine rağmen sonuçların tüm sonuçlar içerisinde normal dağılım göstermemesi nedeniyle bu yöntemlerin genel doğrulaması mümkün olmamıştır. Bu, bazı bireysel laboratuvarların LC-MS/MS veya GC-MS kullanarak gerekli gereksinimleri karşılamadığını ima etmez, ancak genel olarak bu alternatif tekniklerden elde edilen sonuçların söz konusu validasyon çalışmaları kapsamında normal dağılım göstermediği görülmüştür.
- EN 71-12 standardının hazırlık çalışmalarında birçok laboratuvarın katılımıyla farklı cihazlarla yapılan validasyon çalışmasının sonucunda da 12 adet nitrozamin maddesinden yalnızca NDiNA'nın daha yüksek LOQ değerleri gösterdiği belirlenmiştir. NDiNA için tespit edilen LOQ seviyesinin altında gerçek örneklerle analiz yapılmış ve sonuçların geri kazanım oranları ve bağıl standart sapmalar yönüyle kabul edilebilir olduğu tespit edilmiştir.
- EN 12868 standardında da NDiNA gibi güvenli nitrozamin hızlandırıcıların kullanılmasını engellemek için, uzmanlar nitrozlanabilen NDiNA'nın yüksek miktarları için özel bir düzenlemeyle, limitini 0,1 mg/kg değerine çıkarma önerisinde bulunmuştur. Bu düzenlemeyi aşağıda listelendirilmiş gerekçelere dayandırılmıştır:
 - NDiNA maddesinin yüzeylerde birikmesi, diğerlerinden farklı olarak, tekrarlanabilirliği etkileyerek değişkenliği artırmıştır.
 - NDiNA'nın moleküler ağırlığı, NDMA'nın molekül ağırlığından 4 kat daha yüksektir. Bu durum, LOQ değerinin 4 kat daha yüksek ve dolayısıyla değişkenliğin de daha fazla olacağını göstermiştir. Bu nedenle, düşük

moleküler ağırlıklı nitrozaminler için düşük analitik toleransı korumanın daha önemli olduğu çıkarımına varılmıştır.

- "Güvenli-nitrozamin" kavramı, ya nitrozlanabilen maddelerin yüksek moleküler ağırlığı veya NDiNA gibi nitrozlayıcı aminlerin ve ilgili alkilleyici maddelerin mevcudiyetini sınırlaması anlamına gelir; ya da ilgili nitrozaminlerin kimyasal yapısının sadece stabil karbenyum iyonları üretmesi, bu iyonların zayıf alkilleyici maddeler olup RNA ve DNA'ya kanserojen etkide bulunmaması anlamına gelir, örneğin NDBzA ve NDiNA gibi. Sonuç olarak, bu maddelerin toksikolojisi kanserojen değildir.
- Kanserogen olmayan NDiNA maddesinin ve güvenli nitrozamin hızlandırıcılardan kaynaklanabilecek bazı düşük uçuculuklu nitrozaminlerin toksisitesinin belirgin şekilde düşük olması, proseslerde bu hızlandırıcıların tercih edilmesini savunur. Nitrozamin güvenli hızlandırıcıların analitik nedenlerle sınırlandırılmak yerine teşvik edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.
- EN 12868 standardında belirtilmiş olan bu bakış açısı ile bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar değerlendirilecek olursa en yüksek molekül ağırlıklı madde NDiNA (298,5 g/mol) ile en düşük molekül ağırlıklı madde olan NPYR (100,14 g/mol) maddesinin LOQ değerleri arasında molekül ağırlıkları oranında (3 kat) fark olmasının uygun olarak değerlendirilebileceği çıkarımı yapılmıştır. NPYR için LOQ değeri 9,7 bulunurken NDiNA için bu değer 56,4 olması bu çıkarıma göre de olması gerekenin üzerinde olduğunu göstermektedir.
- Bu tez çalışmasında biyoyumluluk çalışmalarının iki aşamasıdan birincisi olan metot geliştirme basamağı irdelenmiştir. Biyoyumluluk çalışmalarının ikinci aşaması ise toksikolojik risk değerlendirme aşamasıdır. Cihazla alakalı metot validasyon çalışması sonucunda elde ettiğimiz LOQ değeri, toksikolojik risk değerlendirmesi aşamasında günlük izin verilen doz alım miktarlarıyla doğrusal bir ilişki oluşturmaktadır. Bu ilişki, cihazın vücutta kullanım süresi ve ilgili kimyasal için izin verilen günlük alım doz miktarları çarpılarak o cihaz grubu için günlük izin verilen maksimum doz miktarı hesaplanarak kurulur. LOQ değeri ile ekstraksiyon yapmış olduğumuz miktarın hesaplanması ile elde ettiğimiz sonuçla, cihazdan sızabilecek izin verilen doz miktarının karşılaştırılması yapılır. LOQ

değerinin günlük izin verilen alım değerinden küçük olması durumunda bu metodun biyolojik değerlendirme kapsamında kimyasal karakterizasyon testleri bağlamında kullanılmasının mümkün olduğu sonucuna varılabilir.

- Özetle, geliştirilen bu metod kapsamında, metod validasyon çalışmaları için değerlendirme kriteri olan doğrusallık, gerçeklik ve kesinlik değerlendirmeleri yapılmış olup bu veriler sonucunda ölçüm belirsizliği hesaplaması yapılmıştır. 7 maddenin hepsi için belirlenen çalışma aralığında yüksek doğrusallık sağlanmıştır. Geri kazanım oranları NDiNA'nın alt derişim seviyesi hariç diğerleri için performans kriterlerini sağlamış olup çalışmalar gerçeklik parametresi kapsamında doğrulanmıştır. Kesinlik çalışmalarında, çalışma aralığının tamamında tüm maddeler için standart sapma değerleri %13'ün altında olup ilgili standartlarda verilen limitleri karşılamaktadır. LOD ve LOQ değerleri ile ölçüm belirsizliği sonuçları ele alındığında NDBzA ve NDiNA maddeleri kriterleri karşılamamıştır.
- Sonuç olarak metodun geliştirilmesinden sonra izlenecek adımlar ve metodun iyileştirilmesi için alınabilecek önlemler aşağıda listelenmiştir:
 - Yapılacak çalışmaların GC-MS cihazı ile sürdürülmesi durumunda kuadrupol sayısının üçe çıkarılmasının daha uygun olacağı değerlendirilmiştir.
 - Rutin uygulamadaki ekstraksiyon koşulları, toksikolojik risk değerlendirme çalışmaları sonucunda belirlenecektir.
 - Metod geliştirme çalışmalarının, matriks etkisini de değerlendirmek amacıyla gerçek numune matriksleri üzerinde yürütülmesi planlanmaktadır. Bu kapsamda da rutin uygulamada çalışılacak olan her matriks grubuna düşük konsantrasyon referans malzeme ilaveleri ile bir dizi analiz yapılacak ve elde edilen standart sapmalardan LOD-LOQ değerleri tekrar belirlenerek çalışma aralığı yeniden düzenlenecektir.
 - NDBzA ve NDiNA için ayrı ayrı iç standartlar kullanılarak etiketlenmelerinin hassasiyeti artırması anlamında fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Tıbbi Cihaz Yönetmeliği, 02.06.2021, T.C. Resmî Gazete, Sayı: 31499 (Mükerrer), **2021**.
- [2] Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Akıllı Yaşam ve Sağlık Ürün ve Teknolojileri Yol Haritası, 2022, <https://www.sanayi.gov.tr/assets/pdf/plan-program/AkilliYasamveSaglikUrunveTeknolojileriYolHaritasi.pdf>, Erişim Tarihi: **24.11.2023**.
- [3] MedTech Europe, The European Medical Technology Industry– in figures 2023, https://www.medtecheurope.org/wp-content/uploads/2023/10/the-european-medical-technology-industry-in-figures_2023.pdf, Erişim Tarihi: **24.11.2023**.
- [4] The ‘Blue Guide’ on the implementation of EU product rules, 2022, [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52022XC0629\(04\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52022XC0629(04)), Erişim Tarihi: **25.11.2023**.
- [5] Türkiye Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığı, Stareteji ve Bütçe Başkanlığı, On Birinci Kalkınma Planı (2019-2023), 2019, https://www.sbb.gov.tr/wp-content/uploads/2022/07/On_Birinci_Kalkinma_Plani-2019-2023.pdf, Erişim Tarihi: **25.11.2023**.
- [6] Deloitte Danışmanlık A.Ş., Sağlık dinamosu: Türkiye tıbbi teknoloji ve cihaz sektörü, 2021, https://www.seis.org.tr/cms-uploads/2022/03/Tibbi_Cihaz_Sektor_Raporu.pdf, Erişim Tarihi: **25.11.2023**.
- [7] T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Teknoloji Odaklı Sanayi Hamlesi, Tıbbi ve Dişçilikle İlgili Araç Gereçler Sektörü Öncelikli Ürün Listesi, <https://www.hamle.gov.tr/Home/UrunListesi>, Erişim Tarihi: **28.11.2023**.
- [8] European Committee For Standardization, EN ISO 10993-17:2023- Biological evaluation of medical devices- Part 17: Toxicological risk assessment of medical device constituents. Brussels: European Committee For Standardization, **2023**.
- [9] European Committee For Standardization, EN ISO 10993-1:2020- Biological evaluation of medical devices- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Brussels: European Committee For Standardization, **2021**.
- [10] International Organization for Standardization, ISO 10993-18: Biological evaluation of medical devices- Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process. Geneva: International Organization for Standardization, **2020**.
- [11] Manz, Katherine E.; Feerick, Anna; Braun, Joseph M.; Feng, Yong-Lai; Hall, Amber; Koelmel, Jeremy; Manzano, Carlos; Newton, Seth R.; Pennell, Kurt D.; Place, Benjamin J.; Pollitt, Krystal J. Godri; Prasse, Carsten; Young, Joshua A., Non-targeted analysis (NTA) and suspect screening analysis (SSA): a review of examining the chemical exposome, Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology, s. 524–536, sayı 33, **2023**.

- [12] European Committee for Standardization, EN 12868: Child use and care articles- Method for determining the release of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers. Brussels: European Committee For Standardization, **2017**.
- [13] European Committee For Standardization, EN 71-12: Safety of toys- Part 12: N-Nitrosamines and N-nitrosatable substances. Brussels: European Committee For Standardization, **2017**.
- [14] International Organization for Standardization, ISO 29941: Condoms- Determination of nitrosamines migrating from natural rubber latex condoms. Geneva: International Organization for Standardization, **2010**.
- [15] European Committee for Standardization, EN ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices- Part 12: Sample preparation and reference materials. Brussels: European Committee for Standardization, **2021**.
- [16] European Commission, Scientific Committee on Consumer Products, Opinion on the Presence and Release of Nitrosamines and Nitrosatable Compounds from Rubber Balloons, Brussels: European Commissions, **2007**.
- [17] National Toxicology Program, 15th Report on Carcinogens, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590783/>, Erişim tarihi: 07.05.**2024**.
- [18] Beard, JC; Swager, TM, An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants, J Org Chem, **2021**, 2037-2057, 86.
- [19] Ehrhardt Proksch, Review Toxicological evaluation of nitrosamines in condoms, International Journal of Hygiene and Environmental Health, Volume 204, Issues 2–3, Pages 103-110, **2001**.
- [20] Committee for Human Medicinal Products, **2015**. ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, London: European Medicines Agency.
- [21] Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency, Nitrosamine impurities in human medicinal products, Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004, 25.06.**2020**.
- [22] Fajen, J. M., G. A. Carson, D. P. Rounbehler, T. Y. Fan, R. Vita, U. E. Goff, M. H. Wolf, G. S. Edwards, D. H. Fine, V. Reinhold, K. Biemann: N-Nitrosamines in the rubber and tire industry. Science 205, 1262-1264 (**1979**).
- [23] Ghayor C, Gjoksi B, Dong J, Siegenthaler B, Caflisch A, Weber FE. N,N Dimethylacetamide a drug excipient that acts as bromodomain ligand for osteoporosis treatment. Sci Rep. **2017**.
- [24] Kim, Young-Min; Kim, Jae Woo; Moon, Hye Mi; Lee, Min-Jin; Hosaka, Akihiko; Watanabe, Atsushi; Teramae, Norio; Park, Young-Kwon; Myung, Seung-Woon,

- 2017**, Rapid Quantification of N-Methyl-2-pyrrolidone in Polymer Matrices by Thermal Desorption-GC-MS, *Analytical Sciences*, Issue 33, pp. 821-824.
- [25] Park, Ji Hoon; Tai, Guo Zhe; Lee, Bo Keun; Park, Seung Hun; Jang, Ja Yong; Lee, Jung Soo; Kim, Jae Ho; Park, Kwideok; Ju Woong, Jang; Kim, Moon Suk, **2015**, Preparation and investigation of hydrolyzed polyacrylonitrile as a preliminary biomedical hydrogel, *Biomaterials Research*, Issue 19:20, pp. 1-8.
- [26] J.P. Chesterman, B.G. Amsden, Triethylamine-based catalysts for the melt polymerization of carbonate monomers, *Polymer Chemistry*, Volume 7, Issue 45, Pages 6946-6953, **2016**.
- [27] Jerome M., K., Walse, S. S. & Mitch, W. A., **2010**, Quaternary Amines As Nitrosamine Precursors: A Role for Consumer Products, *Environmental Science & Technology*, Issue 44, pp. 1224-1231.
- [28] Banik, Bimal Krishna; Banerjee, Bubun; Kaur, Gurpreet; Saroch, Shivam; Rajat, Kumar, **2020**. Tetrabutylammonium Bromide (TBAB) Catalyzed Synthesis of Bioactive Heterocycles. *Molecules*, Issue 25, pp. 1-24.
- [29] Beard, J. & Swager, T., 2021. An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants. *J Org Chem*, Issue 86, pp. 2037-2057.
- [30] Cave, M., Falkner, K. C. & McClain, C., **2012**. Chapter 27- Occupational and Environmental Hepatotoxicity. In: W. Saunders, ed. *Zakim and Boyer's Hepatology*. s.l.: Elsevier Inc., pp. 476-492.
- [31] Bouma, K., Nab, F. M. & Schothorst, R. C., **2003**. Migration of N-nitrosamines, N-nitrosatable substances and 2-mercaptobenzthiazol from baby bottle teats and soothers: a Dutch retail survey. *Food Additives and Contaminants*, 9(20), pp. 853-858.
- [32] Golob, N., Grahek, R., Ross, M. & Roškar, R., **2022**. Nitrocellulose blister material as a source of N-nitrosamine contamination of pharmaceutical drug products. *International Journal of Pharmaceutics*, Issue 618.
- [33] Liao, Xiaobin; Chen, Chao; Zhang, Jingxu; Dai, Yu; Zhang, Xiaojian; Xie, Shuguang, **2015**. Dimethylamine biodegradation by mixed culture enriched from drinking water biofilter. *Chemosphere*, Issue 119, pp. 935-940.
- [34] Corral, Andrea F.; Cho, Yonghoon; Collister, Brian L.; Crosbie, Ewan; Dadashazar, Hossein; DiGangi, Joshua P.; Diskin, Glenn S.; Fenn, Marta; Kirschler, Simon; Moore, Richard H.; Nowak, John B.; Shook, Michael A.; Stahl, Connor T.; Shingler, Taylor; Thornhill, Kenneth L.; Voigt, Christiane; Ziemba, Luke D.; Sorooshian, Armin, **2022**. Dimethylamine in cloud water: a case study over Dimethylamine in cloud water: a case study over. *Environmental Science: Atmospheres*, Issue 2, pp. 1553-1550.
- [35] Lidbury, Ian; Mausz, Michaela A; Scanlan, David J; Chen, Yin, **2017**. Identification of dimethylamine monooxygenase in marine bacteria reveals a

- metabolic bottleneck in the methylated amine degradation pathway. The ISME Journal, Issue 11, pp. 1592-1601.
- [36] Eisenbrand, G.; Spiegelhalder, B.; Preussmann, R. **1980**. Nitrate and Nitrite in Saliva. *Oncology*, Volume 37, pp. 227-231.
- [37] Revelli, Alberto; Bergandi, Loredana; Massobrio, Marco; Lindblom, Bo; Bosia, Amalia; Ghigo, Dario, **2001**. The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration, sperm motility, leukocytospermia, or sperm culture. *Fertility and Sterility*, 3(76), pp. 496-500.
- [38] Park, Se-Jong; Jeong, Mi-Jin; Park, So-Ra; Choi, Jae Chun; Choi, Heeju; Kim, MeeKyung, Release of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from baby bottle teats and rubber kitchen tools in Korea, *Food Sci Biotechnol*, 27, 1519–1524, **2018**.
- [39] European Commission, Commission Directive 93/11/EEC concerning the release, of the N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers, **1993**, Brussels, Official Journal of the European Communities.
- [40] US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for N-Nitrosodi-n-Propylamine, <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp142.pdf>, Erişim Tarihi: 02.02.2024, **2019**.
- [41] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 12130, N-Nitrosodipropylamine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodipropylamine>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [42] CAMEO Chemicals, Chemical Data Sheet, N-Nitrosodipropylamine, <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/16114>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [43] National Center for Biotechnology Information, PubChem Annotation Record for, N-Nitrosodi-n-propylamine, Hazardous Substances Data Bank (HSDB), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/5108>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [44] International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human ,Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT, s. V17 178 (1978), <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [45] European Chemicals Agency, Substance Information, Nitrosodipropylamine, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.009.727>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [46] Mochizuki, Haruna & Nagazawa, Yukari & Arimoto-Kobayashi, Sakae, Genotoxicity and the stability of N-nitrosomorpholine activity following UVA irradiatio, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 893, 503721, **2023**.

- [47] Krauss, M., Hollender, J., **2008**, Analysis of nitrosamines in wastewater: exploring the trace level quantification capabilities of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Anal. Chem.*, 80 (3), 834e842.
- [48] Pitoi MM, Patterson BM, Furness AJ, Bastow TP, McKinley AJ. Fate of N-nitrosomorpholine in an anaerobic aquifer used for managed aquifer recharge: a column study. *Water Res.* **2011** Apr;45(8):2550-60.
- [49] Bo Zhao, Norihide Nakada, Kohei Okumura, Jiajun Zhou, Hiroaki Tanaka, N-nitrosomorpholine behavior in sewage treatment plants and urban rivers, *Water Research*, Volume 163, **2019**.
- [50] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 6046, N-Nitrosomorpholine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosomorpholine>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [51] Occupational Safety and Health Administration, OSHA Occupational Chemical Database, N-Nitrosomorpholine, <https://www.osha.gov/chemicaldata/854>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [52] National Center for Biotechnology Information, PubChem Annotation Record for, N-Nitrosomorpholine, Hazardous Substances Data Bank (HSDB), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/4308>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [53] International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human, Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT, s. V17 263, <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [54] European Chemicals Agency, Substance Information, 4-Nitrosomorpholine, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.155.913>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [55] Ghassemi Barghi, Nasrin & Bayrami, Zahra, (2023), N-Nitrosopyrrolidine, https://www.researchgate.net/publication/371229680_N-Nitrosopyrrolidine.
- [56] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 13591, 1-Nitrosopyrrolidine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Nitrosopyrrolidin>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [57] Occupational Safety and Health Administration, OSHA Occupational Chemical Database, N-nitrosopyrrolidin, <https://www.osha.gov/chemicaldata/856>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [58] LGC, Safety Data Sheet, 1-Nitrosopyrrolidine, <https://www.lgcstandards.com/PL/en/p/TRC-N545950>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.

- [59] European Chemicals Agency, Substance Information, 1-nitrosopyrrolidine, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.012.017>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [60] R. Preussmann, B.W. Stewart, N-Nitroso carcinogens, in: C.E. Searle (Eds.), Chemical Carcinogenesis, ASC Monograph 182, American Chemical Society, Washington, DC, **1984**, pp. 643–828.
- [61] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 7526, N-Nitrosopiperidine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosopiperidine>, Erişim Tarihi: 06.04.2024.
- [62] National Center for Biotechnology Information, PubChem Annotation Record for, N-Nitrosopiperidine, Hazardous Substances Data Bank (HSDB), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/6265>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [63] Occupational Safety and Health Administration, OSHA Occupational Chemical Database, N-nitrosopiperidine, <https://www.osha.gov/chemicaldata/855>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [64] LGC, Safety Data Sheet, N-nitrosopiperidine, <https://www.lgcstandards.com/ES/en/N-Nitrosopiperidine/p/DRE-C15606500>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [65] European Chemicals Agency, Substance Information, 1-nitrosopiperidine, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.002.624>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [66] Schrenk, Dieter & Bignami, Margherita & Bodin, Laurent & Chipman, James & del Mazo, Jesus & Hogstrand, Christer & Hoogenboom, Laurentius & Leblanc, Jean-Charles & Nebbia, Carlo & Nielsen, Elsa & Ntzani, Evangelia & Petersen, Annette & Sand, Salomon & Schwerdtle, Tanja & Vleminckx, Christiane & Wallace, Heather & Romualdo, Benigni & Fortes, Cristina & Hecht, Stephen & Grasl-Kraupp, Bettina. (2023). Risk assessment of N-nitrosamines in food. EFSA Journal. 21.
- [67] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 13829, N-Nitrosodiisobutylamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodiisobutylamine>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [68] LGC, Safety Data Sheet, N-nitrosopiperidine, N-Nitroso-diisobutylamine, <https://www.lgcstandards.com/CN/en/N-Nitroso-diisobutylamine/p/DRE-C15602450>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [69] European Chemicals Agency, Substance Information, N-nitrosodibutylamine, <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.011.911>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.

- [70] Jiao, J & Douglas, George & Gingerich, John & Soper, L. (1997). Analysis of tissue-specific lacZ mutations induced by N-nitrosodibenzylamine in transgenic mice, *Carcinogenesis*, vol.18, no.11, s: 2239-2245, **1997**.
- [71] N.P. Sen, P.A. Baddoo, S.W. Seaman, Nitrosamines in cured pork products packaged in elastic rubber nettings: An update, *Food Chemistry*, Volume 47, Issue 4, Pages 387-390, **1993**.
- [72] LGC, Safety Data Sheet, N-nitrosodibenzylamine, <https://www.lgcstandards.com/US/en/p/TRC-N525450>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [73] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 21421, N-Nitrosodibenzylamine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodibenzylamine>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [74] National Center for Biotechnology Information, PubChem Annotation Record for, N-Nitrosodibenzylamine, Hazardous Substances Data Bank (HSDB), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/21315>, Erişim Tarihi: 07.04.2024.
- [75] LGC, Safety Data Sheet, N-Nitrosodibenzylamine, <https://www.lgcstandards.com/US/en/p/TRC-N525450>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [76] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 71751127, N-Nitroso-N,N-di(3,5,5-trimethylhexyl)amine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitroso-N_N-di_3_5_5-trimethylhexyl_amine, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [77] LGC, Safety Data Sheet, N-nitroso-N, N-di(3,5,5-trimethylhexyl) amine, <https://www.lgcstandards.com/CN/en/p/TRC-N525800>, Erişim Tarihi: 08.04.2024.
- [78] European Committee for Standardization, EN ISO/IEC 17025: 2017-12: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Brussels: European Committee for Standardization, **2017**.
- [79] B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. **2014**).
- [80] Akyüz M, Ata Ş, Dinç E. A chemometric optimization of method for determination of nitrosamines in gastric juices by GC-MS. *J Pharm Biomed Anal.* **2016** Jan 5; 117:26-36.
- [81] Zhang, Y.J., Zhang, J.Q., Agilent Technologies, Analysis of the Release of N-Nitrosamines from Rubber Teats and Soothers, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-nitrosamines-rubber-8890-gc-5994-3031en-agilent.pdf>, Erişim Tarihi: 02.02.2024.

- [82] Chang SH, Ho HY, Chang CC, Zang CZ, Hsu YH, Lin MC, Tseng SH, Wang DY, Evaluation and optimization of a HS-SPME-assisted GC-MS/MS method for monitoring nitrosamine impurities in diverse pharmaceuticals, *J Pharm Biomed Anal*, **2022** Nov 30; 221:115003.
- [83] Kalauz A, Tiringier KV, Horváth V, Kapui I, Simultaneous determination of low molecular weight nitrosamines in pharmaceutical products by fast gas chromatography mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 11.10.**2023**, 1708:464323.
- [84] International Organization for Standardization, TS ISO 11095: Referans malzemeler kullanarak doğrusal kalibrasyon, Geneva: International Organization for Standardization, **2002**.
- [85] International Organization for Standardization, ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1, Geneva: International Organization for Standardization, **2023**.
- [86] International Organization for Standardization, ISO 21748-Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation, Geneva, International Organization for Standardization, **2020**.
- [87] Türk Akreditasyon Kurumu, Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması İçin Bilgilendirme Kılavuzu, 2022, https://secure.turkak.org.tr/TURKAKSITE/docs/bilgilendirme_kilavuzlari/METODUN_GE%C3%87ERL%C4%B0_KILINMASI_VE_DOGRULANMASI_ICIN_BILGILENDIRME_KILAVUZU_30122022.pdf, Erişim tarihi: 01.05.**2024**.
- [88] Association of Official Analytical Chemists, AOAC Official Methods of Analysis Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf, Erişim tarihi: 03.01.**2024**.
- [89] International Organization of Legal Metrology, International Vocabulary of Metrology, Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3rd edition, OIML V 2-200:**2007**, https://www.oiml.org/en/files/pdf_v/v002-200-e07.pdf, Erişim tarihi: 05.01.2024.
- [90] Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 100:2008, **2008**, GUM 1995 with Minor Corrections, Evaluation of Measurement Data- Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement.
- [91] Eurachem & CITAC Guide CG 4, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, third edition, QUAM: **2012.P1**, https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf, Erişim tarihi: 17.02.2024.
- [92] International Organization for Standardization, ISO/IEC Guide 98:3- Uncertainty of measurement -Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995), Geneva, International Organization for Standardization, **1995**.

- [93] Fundamentals of Quality Control and Improvement, Fifth Edition, Amitava Mitra, 2021 John Wiley & Sons, Inc. Published 2021 by John Wiley & Sons, Inc. www.wiley.com/go/mitra/QualityControl5e, Erişim tarihi: 13.05.2024.
- [94] EMA- Committee for Medicinal Products for Human Use, ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, 2022, Amsterdam, European Medicines Agency.
- [95] Giménez-Campillo C, Pastor-Belda M, Campillo N, Hernández-Córdoba M, Viñas P, Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, **2021**, 223(Pt 2):121659.
- [96] Zou, Y., Agilent Technologies, Determination of the N-Nitrosamine Content in Rubber Articles Using the Agilent 7000A Triple Quadrupole GC-MS System, Application Note, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-5828EN.pdf>, Erişim Tarihi: 13.03.2024.
- [97] Fausett, A., Agilent Technologies, Analysis of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosodiethylamine Using the Agilent 7697A Headspace Sampler, 8890/5977 GC-MSD System, Application Note, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-sartan-impurities-8890-GC-5994-1132en-agilent.pdf>, Erişim Tarihi: 14.03.2024.
- [98] Agilent Technologies, Nitrosamine Impurities Application Guide, Confidently Detect and Quantify Mutagenic Impurities in APIs and Drug Products, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/Nitrosamine%20and%20Mutagenic%20Impurities%20Application%20Guide.pdf>, Erişim tarihi: 10.03.2024.
- [99] Claudia Giménez-Campillo, Marta Pastor-Belda, Natalia Campillo, Manuel Hernández-Córdoba, Pilar Viñas, Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, Volume 223, Part 2, **2021**.
- [100] Roasa, J., Liu, H., & Shao, S. (2019). An optimised HS-SPME-GC-MS method for the detection of volatile nitrosamines in meat samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(3), 396–404. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1571287>
- [101] Wang, X., Gao, Y., Xu, X. et al. Derivatization Method for Determination of Nitrosamines by GC–MS. *Chromatographia* 73, 321–327 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10337-010-1871-8>
- [102] Wenwen Chen, Xiaoshui Li, Huanfang Huang, Xuetao Zhu, Xiaoyu Jiang, Yuan Zhang, Kuang Cen, Lunshan Zhao, Xiuli Liu, Shihua Qi, Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry with electron ionization for determination of N-nitrosamines in environmental water, *Chemosphere*, Volume 168, **2017**, Pages 1400-1410, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.109>.

- [103] Agilent Cross Lab, Nitrosamines Analysis in Pharmaceuticals Using Single Quadrupole GC-MS or Triple Quadrupole GC-MS Consumables workflow ordering guide, Published in the USA, November 4, **2021** 5994-2979EN, <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/brochure-nitrosamine-in-pharma-gc-ms-5994-2979en-agilent.pdf>
- [104] Liu, Jie & Xie, Bin & Mai, Binliang & Cai, Qiang & He, Rujian & Guo, Dong & Zhang, Zhifeng & Fan, Jun & Zhang, Weiguang. (**2021**). Development of a sensitive and stable GC-MS/MS method for simultaneous determination of four N-nitrosamine genotoxic impurities in sartan substances. Journal of Analytical Science and Technology. 12. 3. 10.1186/s40543-020-00254-2
- [105] Canada Health, Government of Canada, Nitrosamine impurities in medications: Established acceptable intake limits (version: **2024-26-07**), <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/information-health-product/drugs/nitrosamine-impurities/established-acceptable-intake-limits.html>, Erişim tarihi: 01.08.2024.
- [106] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs, Guidance for Industry, February **2021**, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>