



**İDRARDA FİTALAT ESTER METABOLİTLERİNİN TAYİNİ
İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ
KATI FAZ EKSTRAKSİYON METODUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Melike KÜÇÜK



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDRARDA FİTALAT ESTER METABOLİTLERİNİN TAYİNİ İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ KATI FAZ
EKSTRAKSİYON METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

Melike KÜÇÜK
0009-0003-3550-5682

Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İDRARDA FİTALAT ESTER METABOLİTLERİNİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TEMELLİ KATI FAZ EKSTRAKSİYON METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Melike KÜÇÜK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER

Bu çalışmada, idrardaki monoetil fitalat (MEP), mono-n-bütül fitalat (MnBP) ve mono-(2-etilheksil) (MEHP) fitalat monoesterlerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayini için moleküler baskılanmış polimer temelli bir katı faz ekstraksiyon metodu geliştirildi. Fonksiyonel monomerin metakriloil-amido-L-triptofan metil esteri (MATrp), çapraz bağlayıcının etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcının 2,2'-azobis(izobutironitril) (AIBN) ve dietil fitalatın (DEP) taklit (dummy) kalıp molekül olarak kullanıldığı poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlendi. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) teknikleri ile karakterize edildi. Sentezlenen mikroküreler kullanılarak katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşları hazırlandı. Hazırlanan mikrokürelerin katı faz ekstraksiyon malzemesi olarak kullanılmasıyla geliştirilen metot optimize edildi. Geliştirilen yeni tayin metoduna ilişkin gözlenebilme sınırı (GS), tayin sınırı (TS), doğrusal çalışma aralığı, günler içi ve günler arası tekrarlanabilirlik gibi analitik parametreler belirlendi. İlgili fitalat monoesterler için GS ve TS değerleri sırasıyla 0,04-1,20 µg/L ve 0,15-4,01 µg/L aralığında bulundu. Korelasyon katsayısı kareleri değerleri 0,9778-0,9993 aralığında, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) verileri gün içi çalışmalar için 1,10-2,29 ve günler arası çalışmalar için 4,49-9,34 aralığında bulundu. Optimize edilen SPE koşullarında, yeni hazırlanan SPE kartuşu ticari OASIS HLB kartuşuyla karşılaştırıldı. Son olarak, insan idrar örnekleriyle çalışılarak metodun gerçek örneklerle uygulanabilirliği belirlendi. Sonuç olarak fitalat monoesterlerin (MEP, MnBP ve MEHP) tayin için yeni bir SPE metodu geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: Fitalat monoesteri, moleküler baskılama, katı faz ekstraksiyon, gaz kromatografisi

2023, xv + 113 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DEVELOPMENT OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER-BASED SOLID PHASE EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHTHALATE ESTER METABOLITES IN URINE

Melike KÜÇÜK

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER

In this study, a molecularly imprinted polymer-based solid phase extraction method was developed for the determination of monoethyl phthalate (MEP), mono-n-butyl phthalate (MnBP) and mono-(2-ethylhexyl) (MEHP) phthalate monoesters in urine by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Methacryloyl-amido-L-tryptophan methyl ester of functional monomer (MATrp), crosslinker ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), initiator 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) and diethyl phthalate (DEP) as dummy template molecule poly[(EGDMA-MATrp)] microspheres were synthesized by suspension polymerization technique. DEP-imprinted poly[(EGDMA-MATrp)] microspheres were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), Brunauer-Emmett-Teller (BET) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) techniques. Solid phase extraction (SPE) cartridges were prepared using synthesized microspheres. The developed method was optimized by using the prepared microspheres as solid phase extraction material. Analytical parameters such as limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linear range, intra-day and inter-day repeatability were determined for the new detection method developed. LOD and LOQ values were found in the range of 0,04-1,20 µg/L and 0,15-4,01 µg/L for respective phthalate monoesters, respectively. The squares of the correlation coefficient were in the range of 0.9778-0.9993, the relative standard deviation (%RSD) values were found in the range of 1.10-2.29 for intra-day and 4.49-9.34 for inter-day studies. Under optimized SPE conditions, the novel prepared SPE cartridge was compared to the commercial OASIS HLB cartridge. Finally, the applicability of the method to real samples was determined by working with human urine samples. As a result, a new SPE method was developed for determination of phthalate monoesters.

Key words: Phthalate monoester, molecular imprinting, solid phase extraction, gas chromatography

2023, xv + 113 pages.

TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, her sorun yaşadığımda her zaman yanımda olup çözümler bulmaya çalışan, anne hassasiyetiyle bana yaklaşan, güler yüzünü ve samimiyetini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER'e teşekkür ederim.

Laboratuvarının imkanlarını sonuna kadar kullanmamı sağlayan, değerli bilgilerini benden esirgemeyen, her konuda yardımını gördüğüm ve birlikte aynı araştırma grubunun üyesi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Bilgen OSMAN'a teşekkür ederim.

Gelişi ile birlikte laboratuvar ortamımızı daha neşeli hale getiren, bir abla gibi her konuda dertlerimi dinleyen ve çözümler bulmaya çalışan saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi. Munireh YÜCEL'e teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte gülüp eğlendiğimiz, birlikte ağladığımız desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim birlikte çalışmaktan keyif aldığım canım arkadaşlarım Azize ÇERÇİ 'ye, Nawal ALJAYYOUSI'ye ve Merve İlkay ALTUNTUĞ CESUR'a teşekkür ederim.

Okumanın ne kadar değerli olduğunu bana benimseten, beni ben olmamı sağlayan ve eğitim hayatım boyunca desteğini üzerimde hissettiğim melek annem Emel KÜÇÜK'e, her koşulda bana inanan ve güvenen, maddi ve manevi her anlamda yanımda olan canım kardeşim Ecem KÜÇÜK'e ve babam Meriç KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

FGA-2021-635 nolu proje ile tez çalışmamı destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine de teşekkür ederim.

Melike KÜÇÜK
09/05/2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Endokrin Bozucular.....	6
2.2. Fitalatlar.....	7
2.2.1. Fitalatlara maruz kalma yolları.....	9
2.2.2. Fitalatların insan sağlığı üzerindeki etkileri.....	12
2.2.3. Fitalatların metabolizması.....	13
2.2.4. Biyolojik matrikslerde fitalatlar.....	17
2.3.1. Fitalat monoester metabolitlerinin tayin metotları.....	19
2.3.2. İdrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları.....	20
2.3.2.1. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE).....	25
2.3.2.2. Katı faz ekstraksiyon (SPE).....	29
2.4. Moleküler Baskılama.....	38
2.5. Gaz Kromatografisi (GC).....	45
2.5.1. GC'nin temel bileşenleri.....	46
2.6. Kütle Spektrometresi (MS).....	51
2.7. Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi (GC-MS).....	52
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	54
3.1. Materyal.....	54
3.1.1. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS).....	54
3.1.2. UV-GB spektrofotometresi.....	55
3.1.3. Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrometresi.....	55
3.1.4. Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	55
3.1.5 BET analizi.....	55
3.1.6. X ışını fotoelektron spektrometresi (XPS).....	55
3.1.7. Karıştırıcı ve ısıtıcılar.....	56
3.1.8. Ultrasonik banyo.....	56
3.1.9. pH metre.....	56
3.1.10. Terazî.....	56
3.1.11. Saf su cihazı.....	56
3.1.12. Vakum manifold ve pompası.....	56
3.1.13. Etüv.....	56
3.1.14. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	57
3.2.Yöntem.....	59
3.2.1. N-metakriloil-amido L-triptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi ve karakterizasyonu.....	59

3.2.2. Dietil fitalat (DEP) baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin sentezi.....	59
3.2.3. Dietil fitalat (DEP) baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin karakterizasyonu	60
3.2.3.1. FTIR analizleri	60
3.2.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri	60
3.2.3.3. BET analizi.....	60
3.2.3.4. XPS analizi.....	61
3.2.4. Fitalat monoester türevlendirme basamağının optimizasyonu.....	61
3.2.5. Sentezlenen adsorbentler ile SPE optimizasyonu	61
3.2.6. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması	64
3.2.7. Sentetik idrarın hazırlanması	64
3.2.8. Sentetik idrar matriksi için SPE şartlarının optimizasyonu	65
3.2.8.1. Sentetik idrar çalışmalarında kartuş yıkama prosedürünün optimizasyonu.....	65
3.2.8.2. Sentetik idrar çalışmalarında seyreltme oranı optimizasyonu	65
3.2.9. DEP baskılanmış ve baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler ile baskılama seçiciliğinin karşılaştırılması	66
3.2.10. Optimize edilen metodun validasyonu.....	66
3.2.11. Metodun gerçek örneklerle uygulanması	67
4. BULGULAR.....	69
4.1. N-Metakriloil-Amido L-Triptofan Metil Ester (MATrp) Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	69
4.2. Dietil Fitalat (DEP) Baskılanmış Poli[(EGDMA-MATrp)] Mikrokürelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	71
4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	73
4.4. BET Analizi	73
4.5. XPS Analizi.....	74
4.6. Fitalat Monoesterleri için Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu.....	75
4.7. Sentezlenen Adsorbentler ile SPE Optimizasyonu	77
4.8. DEP Baskılanmış Poli[(EGDMA-Matrp)] SPE Kartuşu ile Ticari OASIS HLB Kartuşunun Karşılaştırılması.....	84
4.9. Sentetik İdrar Matriksi için SPE Şartlarının Optimizasyonu	87
4.9.1. Sentetik idrar çalışmalarında kartuş yıkama prosedürünün optimizasyonu.....	87
4.9.2. Sentetik idrar çalışmalarında seyreltme oranı optimizasyonu	88
4.10. DEP Baskılanmış Poli[(EGDMA-Matrp)] ve Baskılanmamış Poli[(EGDMA-Matrp)] Mikrokürelerinin Baskılama Seçiciliğinin Karşılaştırılması	89
4.11. Optimize Edilen Metodun Validasyonu.....	90
4.12. Metodun Gerçek Örneklerle Uygulanması	92
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	94
KAYNAKLAR	98
EKLER.....	112
ÖZGEÇMİŞ	113

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
5-OH-MEHTP	Mono(2-etil-5-hidroksiheksil) tereftalat
AIBN	N,N'-azobisisobütironitril
BBP	Bütil benzil fitalat
BBz	Benzil benzoat
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)-trifloro asetamid
BzBP	Benzilbütil fitalat
Car	Karboksen
CE	Kapiler elektroforez
D	Dummy
DAD	Diyot array dedektörü
DBP	Dibütil fitalat
DCM	Diklorometan
DEHP	Di(2-etilheksil) fitalat
DEP	Dietil fitalat
DiBP	Di-izobütil fitalat
DiDP	Di-izodesil fitalat
DiNP	Di-isononil fitalat
DiOP	Diizooktil fitalat
DMA	Düşük molekül ağırlıklı
DMP	Dimetil fitalat
DnBP	Di-n-bütil fitalat
DnHP	Di-n-heksil fitalat
DnOP	Di-n-oktil fitalat
DnPP	Di-n-pentil fitalat
DPHP	Di-(2-propilheptil) fitalat
DPP	Di-n-propil fitalat
DSPME	Dağıtıcı katı faz mikro ekstraksiyon
DVB	Divinilbenzen
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
EI	Elektron iyonizasyon
FID	Alev iyonizasyon dedektörü
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi
GS/LOD	Gözlenebilme sınırı
GC	Gaz kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
IL-DLLME	İyonik sıvı dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
İS	İç standart
KCl	Potasyum klorür
LC	Sıvı kromatografisi
LLE	Sıvı-sıvı ekstraksiyon

LLME	Sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon
m/z	Kütle/yük
MATrp	N-metakriloil-amido L-triptofan metil esteri
MAX	Karışık modlu güçlü bir anyon değiştirici
MBzP	Mono-benzil fitalat
MCMHP	Mono-[2-(karboksimetil)heksil] fitalat
MCNT	Manyetik karbon nanotüp
MCP	Mono(3-karboksipropil) fitalat
MCyHP	Monosikloheksil fitalat
MD	Manyetik dummy
MECPP	Mono-(5-karboksi-2-etilpentil) fitalat
MEHHP	Mono-(2-etil-5-hidroksiheksil) fitalat
MEHP	Mono-(2-etilheksil) fitalat
MEHTP	Mono(2-etilheksil) terefitalat
MEOHP	Mono-(2-etil-5-oksoheksil) fitalat
MEP	Monoetil fitalat
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
MiBP	Mono-izobütil fitalat
MiDP	Mono-izodosil fitalat
MiNP	Mono-izononil fitalat
MiPP	Monoizopropil fitalat
MMCHP	Mono-(4-metil-7-karboksi heptil) fitalat
MMHOP	Mono-(4-metil 7-hidroksil oktil) fitalat
MMiP	Monometil izofitalat
MMOOP	Mono-(4-metil7-okso-oktil) fitalat
MnBP	Mono-n-bütil fitalat
MnMP	Mono-n-metil fitalat
MnOP	Mono-n-oktil fitalat
MnPP	Mono-n-pentil fitalat
MPCHP	Mono-2-(propil-6 karboksi-heksil) fitalat
MPHHP	Mono-2-(propil-6-hidroksi-heptil) fitalat
MPOHP	Mono-2-(propil-6-oksoheptil) fitalat
MS	Kütle spektrometresi
MS/MS	Tandem kütle spektrometresi
MSPE	Manyetik katı faz ekstraksiyon
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifloraasetamit
N ₂	Azot
NIP	Baskılanmamış polimer
PDMS	Polidimetilsiloksan
PDVB	Poli(divinilbenzen)
PEI	Polietilenimin
PET	Polietilen terefitalat
PVC	Polivinilklorür
RSD/BBS	Bağıl standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SPE	Katı faz ekstraksiyon
SPME	Katı faz mikro ekstraksiyon
TS/LOQ	Tayin sınırı

UHPLC	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole spektrometresi
UV-GB	Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi
XPS	X ışını fotoelektron spektrometresi
YMA	Yüksek molekül ağırlıklı



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fitalatların genel kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2. Fitalatlara maruz kalma yolları.....	9
Şekil 2.3. Fitalatların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri.....	12
Şekil 2.4. Fitalatların metabolitlerine dönüşüm mekanizması.....	13
Şekil 2.5. Fitalatların biyotransformasyonu.....	14
Şekil 2.6. DEP, DnBP ve DEHP'in ilgili metabolitlerine dönüşümü.....	16
Şekil 2.7. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE).....	25
Şekil 2.8. SPE mekanizması.....	30
Şekil 2.9. Sorbent formatları.....	31
Şekil 2.10. Moleküler baskılama prosesi.....	42
Şekil 2.11. SPE temelli yeni baskılama stratejileri.....	44
Şekil 2.12. GC'nin temel bileşenleri	46
Şekil 2.13. Enjeksiyon bölmesi.....	47
Şekil 2.14. GC'de kullanılan kolon türleri	48
Şekil 2.15. Kütle spektrometresi (MS).....	51
Şekil 2.16. Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi (GC-MS).....	53
Şekil 3.1. Metodun gerçek örneklerle uygulanması.....	68
Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentezi.....	69
Şekil 4.2. MATrp monomerinin FTIR spektrumu.....	70
Şekil 4.3. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin FTIR spektrumu.....	72
Şekil 4.4. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin SEM görüntüsü.....	73
Şekil 4.5. BET analizi sonuçları.....	74
Şekil 4.6. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin XPS spektrumu.....	75
Şekil 4.7. Farklı türevlendirici reaktiflerin, fitalat monoesterlerin pik alanına etkisi.....	76
Şekil 4.8. Fitalat monoesterlerinin MSTFA ile türevlendirme reaksiyonu...	76
Şekil 4.9. Fitalat monoester pik alanlarına pH etkisi.....	78
Şekil 4.10. Fitalat monoester pik alanlarına elüsyon çözücüsünün etkisi.....	79
Şekil 4.11. Fitalat monoester pik alanlarına ticari kartuş hacminin etkisi.....	80
Şekil 4.12. Fitalat monoester pik alanlarına adsorbent miktarının etkisi.....	81
Şekil 4.13. Fitalat monoester pik alanlarına örnek hacminin etkisi.....	82
Şekil 4.14. Fitalat monoester pik alanlarına tuz miktarı etkisi.....	84
Şekil 4.15. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması (1.Tekrar).....	85
Şekil 4.16. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması (1-15.Tekrar).....	86
Şekil 4.17. Analitlerin bulunduğu alıkonma zamanlarında girişim yapan türler	87
Şekil 4.18. Sentetik idrar idrar çalışmalarında seyreltme oranı optimizasyonu	88
Şekil 4.19. MIP ve NIP seçicilik karşılaştırılması.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan fitalatlar.....	8
Çizelge 2.2. Bazı fitalatlar ve ilgili fitalat metabolitleri.....	15
Çizelge 2.3. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları.....	22
Çizelge 2.4. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan çalışmalar.....	37
Çizelge 2.5. Çeşitli dedektörler için tercih edilen taşıyıcı gazlar.....	47
Çizelge 2.6. Dolgulu ve kapiler kolonun karşılaştırılması.....	49
Çizelge 2.7. GC ile kullanılan en yaygın dedektörler.....	50
Çizelge 3.1. Analitlere ait alıkonma zamanları ve selektif iyon modundaki m/z değerleri.....	54
Çizelge 4.1. Fitalat monoesterlerinin kaynama noktaları.....	75
Çizelge 4.2. Kullanılan organik çözücüler ve polarite indeksleri.....	79
Çizelge 4.3. Metot parametreleri.....	91
Çizelge 4.4. İdrarda fitalat monoesterlerinin tayinine yönelik moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak literatürde yapılan çalışma ile tez çalışmasının karşılaştırılması.....	92

1. GİRİŞ

İlk olarak 1990'da başlayan ve 2003 yılında biten insan genom projesinin gerçekleşmesiyle ekspozom adı verilen bir kavram ortaya konmuştur. Bu projede araştırmacılar genetik haritanın %99,9'nun çözüldüğünü bildirseler de günümüzde birçok kronik hastalığın oluşumuna neden olan etmenlerin %70-90'ının çevresel etmenlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Çevresel maruziyetler; vücuda alınan kimyasallara ek olarak vücudun kendisi tarafından üretilen kimyasallara ait metabolitlerin de bu konu altında değerlendirilmesini gerekmektedir. Ekspozom kavramı ilk olarak 2005 yılında Chris Wild tarafından ortaya konulmuştur ve o zamandan beri çeşitli beslenme, yaşam tarzı, çevresel kimyasallar ve biyolojik toksinlere maruz kalmanın bütünsel ve kapsamlı karakterizasyonu için yeni bir yaklaşım olarak büyük ilgi görmüştür (Wild, 2005). Wild ekspozomu; doğum öncesi dönemden itibaren yaşam boyu maruz kalınan etmenlerin (yaşam biçimlerinden kaynaklı etmenler dâhil) tamamı olarak tanımlamıştır. Bir bireyin maruziyeti doğumdan önce başlamaktadır. Çevremiz, beslenme ve yaşam tarzımız gibi etmenlerle kendi benzersiz genetik, fizyolojik ve epigenetik özelliklerimizin bir araya gelmesiyle kişiler ya da popülasyonlara özgü sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu da güçlü biyo-izleme (biomonitoring) çalışmalarının gereksinimi ortaya koymuştur.

İnsan biyo-izleme, çevresel kimyasalların ve metabolitlerinin, insan örneklerindeki dönüşüm ürünlerinin ve maruziyet seviyelerinin doğrudan ölçümü için son teknoloji ürünü bir şemadır. Ayrıca biyo-izleme çalışmaları, herhangi bir potansiyel sağlık tehlikesi için çevresel kimyasalların mevcut maruziyet seviyelerini, kümülatif günlük alımlarını ve eşik değerlerini belirlemek için oldukça faydalıdır (Arnold vd., 2013; Asimakopoulou vd., 2014; Karthikraj ve Kannan, 2018). Biyo-izleme çalışmaları, sosyal stres faktörlerini hesaba katarak, belirli bir kişide çevresel faktörlere kümülatif maruz kalmanın olumsuz sağlık etkilerini yorumlamak için epidemiyolojik ve klinik verilerle birleştiren "Ekspozom" araştırmalarının hayati bileşenlerinden biridir (Kim ve Karthikraj, 2021).

Ekspozom bileşiklerin bir grubu olan endokrin bozucular; endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler,

hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler. Endokrin bozucular birçok alanda sıkça kullanılan kimyasal maddelerdir. Endokrin bozucu kimyasallardan bazıları; perflorokimyasallar, pestisitler, bisfenol A ve ftalatlardır.

Genellikle ftalatlar olarak bilinen ftalat diesterler, 1,2-benzendikarboksilik asidin dialkil esterinden oluşmaktadır. Bu bileşikler; kozmetikde, parfümler ve losyonlar gibi birçok kişisel bakım ürünlerinde, farmasötik ürünlerde, inşaat malzemelerinde, boyalarda, yer döşemelerinde ve duvar kaplamalarında, elektronik ve tıbbi cihazlarda, gıda ambalaj malzemeleri gibi birçok tüketici ürününde kullanılmaktadırlar. Bu maddelerin yaygın kullanımı nedeniyle maruziyet riski yaşamın her alanında bulunmaktadır. Ftalatlar, bulundukları matriks ortamına kimyasal olarak bağlanmadıkları için çevreye migrasyonu kolaylıkla gerçekleşmektedir. Bu nedenle, ürünlerin yüzeyine ve ayrıca bu yüzeylerle temas halinde olan yiyecek ve içeceklerle serbestçe geçebilmektedirler. Sonuç olarak, bu onların çevreye yaygın bir şekilde dağılmasına yol açmaktadır. Solunum, sindirim, dermal absorpsiyon ve hatta intravenöz yolla insan maruziyetinin kolay bir kaynağını oluştururlar (Högberg vd., 2008; Orecchio vd., 2014; Bao vd., 2015; Giovanoulis vd., 2018; Li ve Suh, 2019).

İnsanların ftalat diesterlerine maruz kalması ile bir serbest reaktif fonksiyonel karboksilik asit ve bir ester grubundan oluşan monoester formlarına hızla hidrolize olurlar. Diester ftalatların birçok dokuda bulunan enzimler tarafından monoesterlere metabolize edildiği bilinmektedir. Ağızdan alınan diester ftalatlar, ince bağırsak duvarındaki esterazlar ve pankreas lipazları tarafından kantitatif olarak hidrolize edildiği genel olarak kabul edilmektedir (Lake vd., 1977; Rowland vd., 1977; Niino vd., 2002). Düşük moleküler ağırlıklı diester ftalatların (örneğin dietil ftalat) metabolizması hidrolitik monoester formu ile sona erer. Bununla birlikte, daha yüksek moleküler ağırlıklı ftalatların (örneğin, di- (2-etilheksil) ftalat gibi) metabolizması daha hidrofilik olan oksidatif ürünlere (alkil zincirinin oksidasyonu) dönüşümle devam etmektedir. Monoesterler ve oksidatif metabolitleri, doğrudan idrarla veya glukuronik asit ile konjuge formda (faz II biyotransformasyon reaksiyonları) atılabilir. Bu reaksiyonlar sudaki çözünürlüklerini ve dolayısıyla idrardan atılımını arttırmaktadırlar (Nutti vd., 2005; Calafat ve McKee, 2006; Mose vd., 2007; Högberg vd., 2008; Kondo vd., 2010).

Fitalatlar biyolojik olarak kalıcı değildirler. Hidroliz ve oksidasyon metabolitleri, maruziyetten sonraki 6-24 saat içinde idrar yoluyla vücuttan atılırlar. Genel olarak, polar ve kısa zincirli fitalatlar, sudaki çözünürlükleri nispeten yüksek olduğu için hidrofilik grup olarak glukuronid konjugasyonuna uğramadan, direkt monoester formunda atılabilir. Bunun aksine, uzun zincirli fitalatlar genel olarak konjuge metabolitler olarak atılırlar. Bu nedenle, konjuge ve serbest metabolitler farklı popülasyon gruplarında maruz kalma modellerinin izlenmesine yardımcı uygun biyobelirteçler olduklarından, bu bileşiklerin idrarda ölçümü Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri tarafından maruziyetin değerlendirilmesini sağlamak için önerilmiştir (Elliani vd., 2020). İnsanlarda fitalat maruziyetinin izlenmesi için en sıklıkla tercih edilen matriks idrardır, çünkü non-invaziv örnekleme sayesinde toplanması nispeten kolay ve metabolit konsantrasyonları diğer örneklerle göre daha yüksektir (Calafat vd., 2013).

İnsanlarda fitalat maruziyeti ve risk değerlendirmesi üzerine yapılan çalışmalarda, öncelikle test edilen numunelerdeki fitalat metabolit derişimlerinin tayin edilmesi gerekmektedir. Bunun için hassas ve güvenilir analitik prosedürlere ihtiyaç vardır. Numune hazırlama, insan biyobelirteç çalışmaları dâhil olmak üzere analitik kimyadaki en önemli adımlardan biridir. Biyobelirteç olarak diester bileşikleri yerine, monoester metabolitlerinin belirlenmesi, epidemiyolojik çalışmalarda çeşitli fitalatlara göreceli maruziyetleri karşılaştırmayı amaçlamaktadır (Mose vd., 2007; Frederiksen vd., 2007; Tranfo vd., 2012).

Literatürde, biyolojik ve çevresel örnekler (serum, idrar, tükürük, seminal plazma, anne sütü, sperm vb.) gibi çeşitli matrislerde fitalat monoesterlerinin tayini için birçok analitik metodoloji bulunmaktadır (Mose vd., 2007; Guo vd., 2010; Bamai vd., 2015; Nassan vd., 2017; Del Bubba vd., 2018). Bu metabolitlerin tayini genellikle gaz ve sıvı kromatografisi gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Gaz kromatografisi ya da sıvı kromatografisi tekniklerinin duyarlılığı, farkı detektörler kullanılarak arttırılsa da biyolojik matrislerde en yüksek monoester metabolit değerleri genel olarak ppb seviyesinde olduğu için enstrümental analiz öncesi bazı örnek hazırlama ve deriştirme (zenginleştirme) tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Örnek hazırlama metotlarının temel hedefleri; (1) analitin matriks ortamından ayrılması ve (2) düşük derişimlerdeki analitin

zenginleştirilmesidir. Fitalat metabolitlerinin tayininde kullanılan örnek hazırlama metotları matriks ve analite göre farklılıklar gösterebilir; genel olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (LLME), katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve katı faz mikroekstraksiyonu (SPME)'dur.

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), fitalat metabolitlerinin idrardaki tayini için en yaygın olarak kullanılan örnek hazırlama metodudur. SPE, iki farklı faz için hedef analitlerin farklı afinitesine dayanmaktadır. SPE'de öncelikle sorbentin, analitlerin çözündüğü bir çözücü veya çözücü karışımı ile şartlandırılması yapılır. Ardından, sıvı numune veya bir sıvı numune ekstraktı kartuşa yüklenmektedir. Genellikle, hedef analitler örnek matriksin diğer bileşenleri ile birlikte tutulmaktadır. Matriks bileşenleri bir yıkama çözücüsü uygulanarak uzaklaştırılabilir. Son olarak, analitler uygun bir çözücünün küçük bir hacmi ile elüe edilmektedir. En yaygın kullanılan katı fazlar, ticari olarak temin edilebilen oktadesil (C18) silika, devesil (C30) silika, polistiren-divinilbenzen kopolimerleri, HLB (hidrofilik(N-vinilprolidon) /lipofilik (divinil benzen) karışımı) kartuşlar ve grafitlenmiş karbon siyahıdır (Holm vd.; 2004; Kondo vd., 2010; Ros vd., 2015; Yao vd., 2018a). Basit kullanımını nedeniyle SPE çeşitli örneklerdeki metabolitlerin analizinde yaygın olarak kullanılan bir teknik haline getirmiştir.

Son dönemde, ticari adsorbenlerin yerine daha üstün özelliklere sahip (seçicilik, afinite ve artmış yüzey alanı, manyetik alan uygulanarak adsorbanın uzaklaştırılması vb.) mikro ya da nanoboyutta adsorbanların sentezi ve SPE materyali olarak kullanılmasına ilişkin çalışmalar da rapor edilmektedir. Bu çalışmaların ortak amacı fitalat metabolitlerinin tayininde daha iyi bir tekrarlanabilirlik ve seçicilik sağlanması, daha düşük tayin limitlerine ulaşabilmesi ve adsorbanın etkinliğini kaybetmeden tekrar kullanımı ile maliyetin düşürülmesidir. Doğada gerçekleşen bağışıklık yanıt, ligand-reseptör etkileşimi ve enzim katalizi gibi birçok biyolojik olaydaki moleküler tanıma olayını temel alan araştırmacılar; daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmalar yapabilmek için doğada gerçekleşen seçici tanıma olaylarını, sentetik reseptörler hazırlamak için kullanarak "moleküler baskılama" olarak bilinen yeni bir alanın doğmasına neden olmuşlardır. Moleküler baskılama tekniği, bir kalıp molekülü etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle düzenlenmesi ve sonrasında uygun bir işlem süreci ile kimyasal fonksiyona sahip katı malzemelerin oluşturulmasını

amaçlamaktadır. İşlem sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılması ile yapıda kalıp moleküle özgü boşluk bölgeleri oluşmakta ve ayırma, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için ideal bir malzeme elde edilmektedir (Wulff, 1995; Mosbach ve Ramström, 1996). Moleküler baskılama tekniği, kalıp moleküller yoluyla sentetik polimerlerde spesifik tanıma bölgeleri oluşturmaktadır. Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları, daha iyi, daha seçici ve duyarlı analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar, hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vaat etmektedirler.

Bu tez çalışmasında, günlük yaşamımızda farklı yollarla maruz kaldığımız diester fitalatların biyobelirteçleri olan üç fitalat monoesterinin (monoetil fitalat (MEP), mono-n-bütıl fitalat (MBP) ve monoetilheksil fitalatın (MEHP)) idrarda GC-MS ile tayini öncesinde zenginleştirilmesi için moleküler baskılanmış polimer temelli bir katı faz ekstraksiyon metodu geliştirildi. Katı faz ekstraksiyon (SPE) materyali olarak dietil fitalatın (DEP) taklit (dummy) kalıp molekül olarak kullanıldığı moleküler baskılanmış poli(etilen glikol dimetakrilat-metakriloil-amido-triptofan metil ester) poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler süspansiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlendi. Poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreleri FTIR, SEM, BET ve XPS teknikleri ile karakterize edildi. Sentezlenen mikroküreler kullanılarak hazırlanan SPE kartuşunun belirlenen üç fitalat monoesterinin (MEP, MBP ve MEHP) GC-MS analizi öncesinde zenginleştirilmesindeki etkinliği, hazırlanan SPE kartuşunun ayırma şartlarının optimizasyonu, metodun kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması, gözlenebilme ve tayin sınırlarının belirlenmesi, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları ile metod validasyonunun yapılması ile belirlendi. Ayrıca sentezlenen moleküler baskılanmış mikrokürelerin üç fitalat metabolitinin tayinindeki tekrar kullanılabilirliği ile gerçek idrar örneklerinde söz konusu üç metabolitin tayininde uygulanabilirliği belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışma ile üç fitalat monoester metabolitinin (MEP, MBP ve MEHP) analizi için yeni bir SPE metodu geliştirildi.

2. KURAMSAL TEMELLER

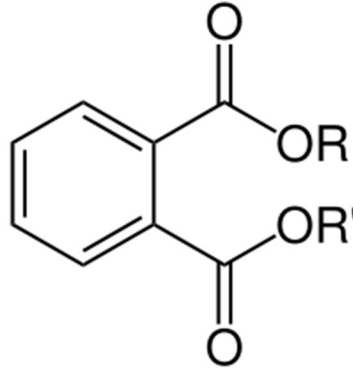
2.1. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular, hormonal eyleme müdahale eden veya engelleyebilen eksojen kimyasallardır (Zoeller vd., 2012). Bunlar, doğal hormonların üretimini, salınımını, metabolizmasını engelleyebilir veya doğal hormonları taklit edebilirler (Tabb ve Blumberg, 2006). Endokrin bozucular, doğal olarak oluşan (örn. fitoöstrojen) ve sentezlenenler (örn. Bisfenol A, pestisit ve fitalat vb.) olmak üzere iki kategoriye ayrılabilirler (Diamanti-Kandarakis vd., 2009). Bu kimyasallar; yiyeceklerde, kişisel bakım ürünlerinde, ilaçlarda, endüstriyel kimyasallarda ve plastik sektörü gibi birçok alanda sıkça kullanılırlar. Bu bileşiklerin geniş uygulama alanına sahip olması, daha yüksek maruziyet ve potansiyel biyobirikim riskine yol açmaktadır (Jones ve Regan, 2018). Endokrin bozucu kimyasallara olan maruziyet; sindirim, deri teması, solunum, intravenöz, plasenta ve anne sütü gibi çeşitli biyolojik yollarla olabilmektedir (Kabir vd., 2015). Maruziyetin etkisini değerlendirmek oldukça güçtür. Çünkü bir bireyin maruziyeti doğumdan önce başlamaktadır. Çevremiz, beslenme ve yaşam tarzımız gibi etmenlerle kendi benzersiz genetik, fizyolojik ve epigenetik özelliklerimizin bir araya gelmesiyle, kişiler ya da popülasyonlara özgü farklı maruziyet etkileri gözlenebilmektedir (Yılmaz vd., 2019).

Maruz kalınan endokrin bozucu kimyasalların vücuttan atılımı, büyük ölçüde kimyasal yapılarına bağlı olarak değişmektedir. Endokrin bozucular kalıcı ve kalıcı olmayan maddeler olarak iki sınıfa ayrılabilir. Kalıcı olmayan endokrin bozucu maddeler, genellikle karaciğer tarafından metabolize edilerek, idrar veya dışkı yoluyla vücuttan atılmaktadır. Kalıcı endokrin bozucular ise insan vücudunun farklı yerlerinde özellikle de yağ dokusunda birikir ve buradan yavaş yavaş atılımı gerçekleşmektedir (Kabir vd., 2015). Endokrin bozuculara maruziyet süresi ve miktarı oldukça önemlidir, çünkü düşük seviyelerde maruz kalmada bile doku ve organ hasarı gerçekleşebilir (You ve Song, 2021). Bu bileşiklerin bir çok sağlık sorununa neden olduğu bildirilmiştir. Endokrin bozucu bileşikler; obeziteye, tip 2 diyabete, kardiyovasküler hastalıklara, tiroide, metabolizma bozukluğuna, kadın ve erkeklerde gelişim ve doğurganlık sorunlarına, hormona duyarlı olan meme, endometriyal ve testis kanserlerine neden olabilmektedirler (Yılmaz vd., 2019).

2.2. Fitalatlar

Fitalatlar, 1,2-benzendikarboksilik asidin dialkil veya alkil aril esterleridir ve fitalik anhidritin bir alkol ile esterleştirilmesiyle üretilirler (Autian, 1973; Liang vd., 2008). Oda sıcaklığında, hafif kokulu, yağlı ve renksiz sıvılardır. Düşük uçuculuğa sahip, suda az çözünen, organik çözücülerde ve yağlarda çözünen bileşiklerdir. Kaynama noktası 230 °C ile 486 °C aralığında ve erime noktası 5,5 °C ile –58 °C değişen kimyasallardır. Fitalatların fizikokimyasal özellikleri, alkil zincir uzunluğu ile önemli ölçüde değişim gösterir. Alkil zincir uzunlukları (R ve R' grupları) arttıkça yağda çözünürlükleri (lipofiliklik) artar, plastikleştirme verimi ve sudaki çözünürlüğü azalır (Autian, 1973; Staples vd., 1997). Fitalatların genel kimyasal yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Fitalatların genel kimyasal yapısı

Fitalatlar yaygın olarak kullanılan endüstriyel kimyasallardır ve genellikle polivinilklorüre (PVC) esneklik, yumuşaklık ve dayanıklılık kazandırmak için plastikleştirici olarak eklenirler (Autian, 1973; Staples vd., 1997). İlk olarak 1920'lerde bir plastikleştirici olarak tanıtılan fitalatlar, uçucu ve kokulu kâfurun yerini almışlardır. 1931'de PVC'nin ticari olarak temin edilebilir hale gelmesiyle di-2-etilheksil fitalatın kullanımı artmış, bu da 1950'lerden başlayarak plastikleştirici PVC endüstrisinin hızla büyümesine yol açmıştır. 1970 ve 2006 yılları arasında dünya çapında üretim 1,8 milyon tondan 4,3 milyon tona çıkmıştır. 2006 yılında di-isononil fitalat (DiNP) en yüksek üretim hacmine sahip olduğu rapor edilmiş, bunu sırasıyla di-izodesil fitalat (DiDP) ve di(2-etilheksil) fitalat (DEHP), ardından da bütül benzil fitalat (BBP), dibütül

fitalat (DBP), di-n-oktil fitalat (DnOP) ve di-izobütil fitalat (DiBP) izlemektedir (Lyche, 2017). Yaygın olarak kullanılan fitalatlar Çizelge 2.1’de verilmiştir

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan fitalatlar

Fitalatlar	Kısaltma	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Dimetil fitalat	DMP	194,18
Dietil fitalat	DEP	222,24
Di-n-propil fitalat	DPP	250,29
Di-n-bütil fitalat	DBP	278,34
Diizobütil fitalat	DiBP	278,34
Di-n-pentil fitalat	DnPP	306,40
Butil benzil fitalat	BBP	312,36
Di-n-heksil fitalat	DnHP	334,45
Di(2-etilheksil) fitalat	DEHP	390,56
Di(n-oktil) fitalat	DnOP	390,56
Diizooktil fitalat	DiOP	390,56
Diizononil fitalat	DiNP	418,61
Diizodesil fitalat	DiDP	446,66

Fitalatlar karbon zincir uzunluklarına göre yüksek moleküler ağırlıklı (YMA) ve düşük molekül ağırlıklı (DMA) fitalatlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. DMA fitalatlar alkil zincirlerinde bir ila dört karbon atomu içerirken, YMA fitalatlar ise alkil zincirlerinde beş ve beşten fazla karbon atomu içerirler. En yaygın YMA fitalatlar DEHP, DiNP, DiDP ve DiOP’dır (Wang vd., 2019). YMA fitalatlar; yapı malzemelerinde, tıbbi cihazlarda, oyuncaklarda, polietilen tereftalat (PET) şişelerinde ve gıda paketlerinde kullanılmaktadırlar. En yaygın DMA fitalatlar ise DMP, DEP, BBP, DiBP ve DBP’dır. DMA fitalatlar esas olarak fayanslar, vernikler, dolgu macunları, kaynak ve kaplama malzemelerinde kullanılmaktadırlar (Zhang vd., 2021). Ayrıca fitalatlar, ev eşyalarında, giyimde, kozmetikte, ilaçta, besin takviyelerinde, dış malzemelerinde, tıbbi tüplerde, kan torbalarında, otomobillerde, yağlayıcılarda, çözücülerde, mumlarda, temizlik malzemelerinde ve böcek ilaçları da dahil olmak üzere bir çok üründe kullanılmaktadırlar (Heudorf vd., 2007).

Fitalatlar, bulundukları matriks ortamına kimyasal olarak bağlanmadıkları için (hidrojen bağı veya Van der Waals kuvvetiyle bağlı), çevreye migrasyonu (göçü) kolaylıkla gerçekleşmektedir (Heudorf vd., 2007; Song vd., 2019). Fitalatlar içme suyunda, yiyeceklerde, ev tozunda ve iç mekan havasında tespit edilmiştir (Rudel vd., 2003; Wormuthet vd., 2006). Bu nedenle, bu maddelere maruziyet riski yaşamın her alanında bulunmaktadır. Bu maruziyetin sonucunda ise canlılar üzerinde olumsuz sağlık etkilerine neden olduğu bildirilmiştir.

2.2.1. Fitalatlara maruz kalma yolları

İnsanlar fitalatlara tüm yaşamları boyunca yutma, soluma, deri teması ve parenteral uygulama olmak üzere farklı yollarla maruz kalmaktadırlar (Latini, 2005) (Şekil 2.2). Maruz kalma yolları fitalatların türlerine göre değişim göstermektedir (Wang vd., 2020).



Şekil 2.2. Fitalatlara maruz kalma yolları

Fitalatlara maruz kalmanın ana kaynağını gıda alımı oluşturmakta ve özellikle DEHP önemli bileşenlerden biri olarak belirtilmektedir (Latini, 2005; Serrano vd., 2014). Fitalatlar, gıdalara genellikle ambalajlarından kaynaklanan migrasyon sonucunda bulaşmakta (Heudorf vd., 2007) ve gıda maddelerinde fitalat seviyeleri oldukça değişkenlik göstermektedir (Page ve Lacroix, 1995; Petersen ve Breindahl, 2000; Cirillo vd., 2011). Tsumura ve diğerleri tarafından (2001) 1999 yılında Japonya'da gerçekleştirilen çalışmada, gıda örneklerinden besin alımı yoluyla maruziyet incelenmiştir. DBP, BBP, DEHP ve di-n-bütil fitalat (DiNP) ölçülen plastikleştiricilerdir. Bu çalışma sonucunda diğer fitalat seviyelerine kıyasla yüksek derişimde DEHP tespit edilmiştir.

Fierens ve diğerleri (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, Belçika'da satılan 400 gıda ürününde DEHP, DiBP, DnBP ve BBP gibi fitalatların varlığı ortaya konulmuştur. Türkiye'de gerçekleştirilen bir başka çalışmada da gıda ambalajlarından migrasyon sonucunda gıdalarda birden fazla fitalatın (DEHP, DnBP, BBP, DiNP, DiDP ve DnOP gibi) varlığı tespit edilmiştir (Alp ve Yerlikaya, 2020). Gıdalardaki fitalat kontaminasyonun tek kaynağı plastik ambalaj ürünleri olmayabilmektedir. Fu ve Du'nun (2011) gerçekleştirdiği bir çalışmada seralarda yetiştirilen birçok sebze (kereviz, ıspanak, lahana...) DEHP'in varlığı tespit edilmiştir. Bu kontaminasyonun serada kullanılan fitalat içerikli plastik filmlerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Ayrıca sebze ve ekinlerindeki fitalat içeriğinin, fitalat ile kontamine olmuş topraklardan da kaynaklanabileceği de bildirilmiştir (Ma vd., 2015). Polimer ve fitalatlar arasındaki zayıf fiziksel ve kimyasal bağlar nedeniyle, fitalatlar toprak ve su gibi matrikslere kolayca salınıp birikebilmektedirler (Przybylińska ve Wyszowski, 2016). Ek olarak, fitalatların anne sütünden bebeklere geçebildiği de bildirilmiştir (Kim vd., 2015).

Fitalatlara dermal maruziyet; saç bakım ürünleri, deodorantlar, losyonlar, kremler, tırnak cilaları, kokular olmak üzere birçok kişisel bakım ürünlerinin kullanımıyla meydana gelmektedir (Hubinger ve Havery, 2006). Gong ve diğerleri (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, giysiyle temas eden cildin temas etmeyen bölgeye kıyasla daha yüksek seviyelerde fitalat içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, iç mekânlarda fitalatlara maruz kalmanın dermal absorpsiyon yoluyla olduğu da ileri sürülmektedir (örn. DiBP ve DnBP) (Wang vd., 2020).

Diğer bir maruziyet yolu olan solunum ise, iç ortam havası ve havadaki partiküle maddelerin (PM <2,5 µm) solunmasıyla gerçekleşmektedir (Adibi vd., 2008). Maruziyet PVC, oje, saç spreyi ve diğer fitalat içeren ürünlerin uçucu hale gelmesiyle gerçekleşmektedir (FDA, 2001). Fitalatlar, polimerik matrikslere kovalent olarak bağlı olmayan yarı uçucu bileşiklerdir; bu nedenle ortamdaki yüksek sıcaklık, fitalat içerikli plastik ürünlerden fitalat salım oranını artırabilmektedir (Bergh vd., 2010). Wang ve diğerleri (2020) tarafından Pekin’ de gerçekleştirilen bir çalışmada; anaokulunda iç ve dış ortam havasındaki fitalat seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışma sonucunda iç ortamdaki fitalat seviyeleri, dış ortama göre daha fazla olduğu bulunmuştur. İç ortamda DEHP, DiBP ve DnBP en yüksek derişimde bulunan fitalatlar olurken, dış ortamda ise DEHP en yüksek derişimde bulunan fitalat olmuştur. Son zamanlarda Promtes ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir maruziyet değerlendirmesinde ise, Tayland'daki bir anaokulunda iç ortam havasında yüksek düzeyde DEHP içeriğine rastlanmıştır. Bulunan değer, Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından belirlenen referans değerinin (20 µg/g) üzerindedir.

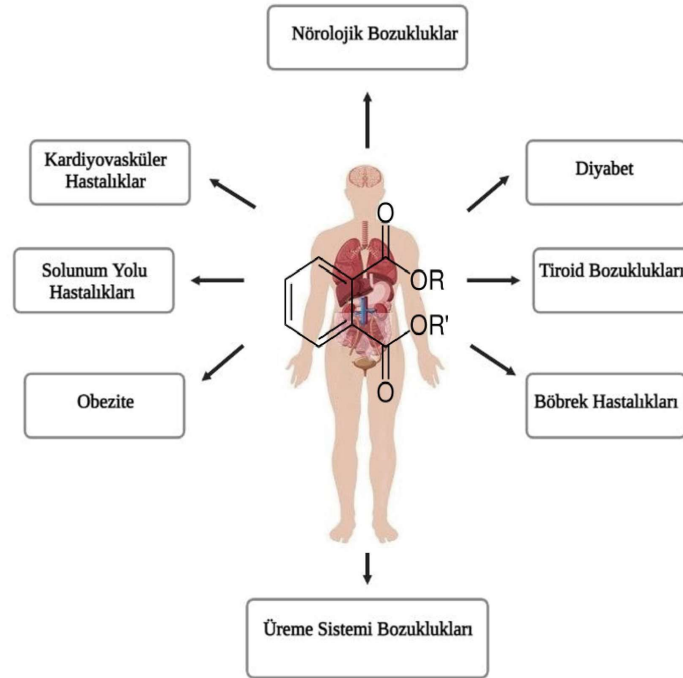
Fitalat içeren PVC türü plastik; intravenöz infüzyon, kan torbaları, infüzyon tüpleri, enteral ve parenteral beslenme torbaları, nazogastrik tüpler, periton diyaliz torbaları ve bypass için kullanılan tüpler gibi birçok tıbbi cihazın üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (FDA, 2001). Bu yaygın kullanım nedeniyle insanların fitalatlara maruziyeti sıklıkla parenteral yollarla meydana gelmektedir.

Fitalatlara gıda dışı bir başka maruziyet ise, bebek ve küçük çocukların fitalatlarla yumuşatılmış plastik oyuncakları veya nesneleri emmesiyle gerçekleşmektedir (Sathyanarayana, 2008). Fitalatların varsayılan toksisitesi ve oyuncaklardan salım hızı göz önüne alındığında, 1999 yılında Avrupa’da 3 yaşından küçük tüketicilere yönelik oyuncaklarda DBP, BBP, DEHP, DiNP ve DiDP kullanımı yasaklanmıştır (Heudorf vd., 2007).

2.2.2. Fitalatların insan sağlığı üzerindeki etkileri

Fitalatların yaygın olarak kullanılması ve yüksek dozda maruz kalınması sonucunda, fitalat ve fitalat metabolitleri insan sağlığı üzerine olumsuz etkilere yol açmaktadırlar (Tsochatzis vd., 2017; Chang vd., 2021) (Şekil 2.3). Endokrin bozucu kimyasallar sınıfında yer alan fitalatlar; hem erkeklerde hem de kadınlarda büyüme, cinsel gelişim ve diğer birçok temel fizyolojik işlevden sorumlu olan endokrin sistemine müdahale ettiği bilinmektedir (Latini, 2005). Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda erkeklerde sperm kalitesi ve üretiminde, testosteron seviyelerinde azalmaya, kısırlığa ve testis kanserine neden olabileceği görülmüştür (Frederiksen vd., 2007; Chang vd., 2021). Kadınlarda ise endometriozis, erken doğum, gebelik kaybı, düşük doğum ağırlığı, meme kanserine ve rahim kanserine neden olabileceği görülmüştür (Kay vd., 2013; Eales vd., 2022).

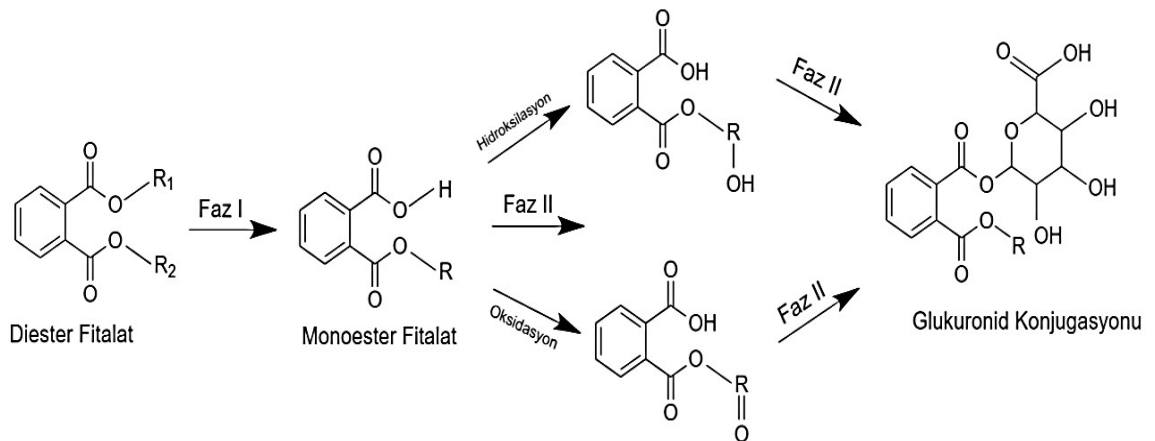
Ayrıca üreme sistemi sorunlarının dışında fitalatlar; astım, dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu, düşük IQ, nörogelişim sorunları, davranış sorunları, otizm, obezite, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon ve ateroskleroz), tiroid hastalıkları ve böbrek hastalıklarıyla da ilişkilendirilmişlerdir (Legler, 2015; Chang vd., 2021).



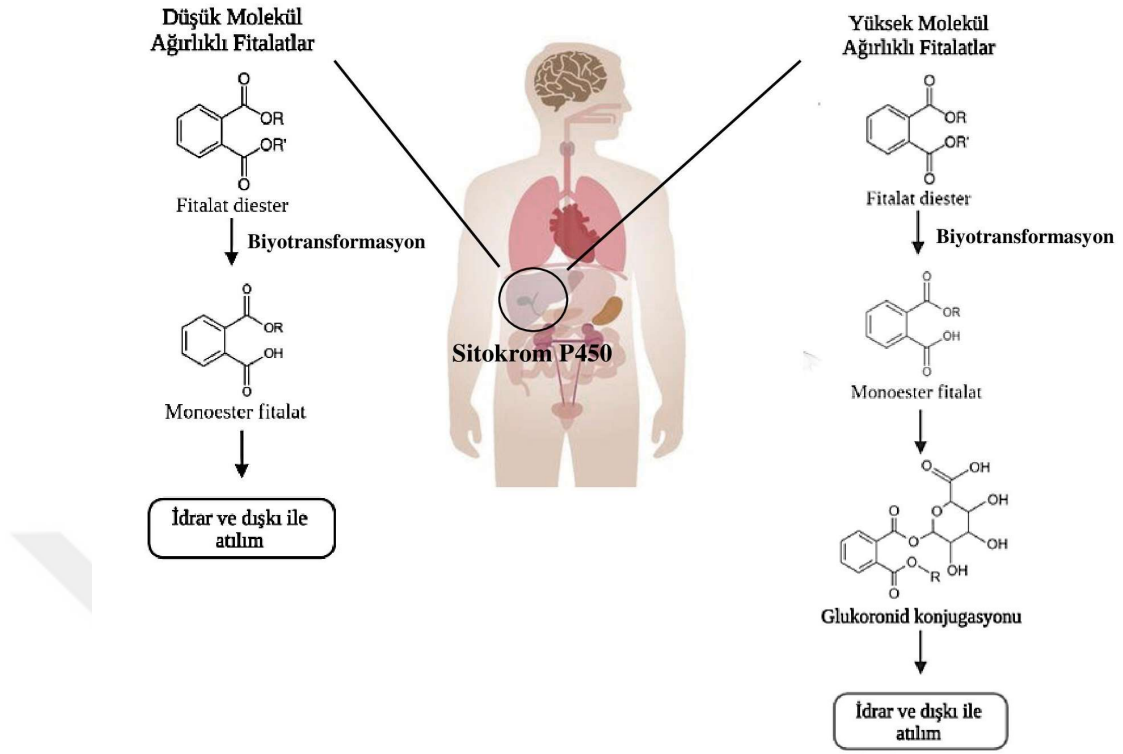
Şekil 2.3. Fitalatların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri

2.2.3. Fitalatların metabolizması

Çeşitli yollarla maruz kalınan fitalatlar, insan vücudunda hızla metabolize olur ve maruziyet sonrasında genel olarak idrar ve dışkı yoluyla dışarıya atılmaktadırlar (Hauser ve Calafat, 2005). Diester formunda bulunan fitalatların monoester yapısına dönüşümü, faz I ve faz II konjugasyonu metabolik yolları ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.4). Faz I dönüşümünde, diester fitalatlar bağırsak ve parankimde bulunan lipazlar ve esterazlar tarafından ilgili birincil metabolitleri olan monoester fitalatlara hidrolize edilmektedirler. Monoester metabolitleri daha sonra hidroksilasyon ve oksidasyon gibi birçok faz II biyotransformasyonuna uğrayarak ikincil metabolitlerine dönüşmektedirler (Frederiksen vd., 2007) (Şekil 2.5). Hidroksilasyon ve oksidasyon sitokrom P450 enzimiyle meydana gelebilmektedir (Dodson vd., 2012). Genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip olan fitalatlar (örn. DEP) vücuttan direk olarak atılabilirken, yüksek molekül ağırlığına sahip olan fitalatlar (örn. DEHP) hidroksilasyon ve oksidasyona ek olarak glukuronid konjugatları şeklinde vücuttan atılabilmektedirler. Faz II konjugasyonu, hidrofilik glukuronid konjugatını oluşturmak için sıklıkla üridin 5'-difosfoglukuronil transferaz enzimi tarafından katalizlenmektedir (Frederiksen vd., 2007). Glukuronidasyon sadece fitalat metabolitlerinin idrarla atılımını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda varsayılan biyolojik olarak aktif türlerin serbest metabolit olması durumundaki biyolojik aktivite potansiyellerini de azaltabilmektedir (Hauser ve Calafat, 2005).



Şekil 2.4. Fitalatların metabolitlerine dönüşüm mekanizması (Frederiksen vd., 2007)

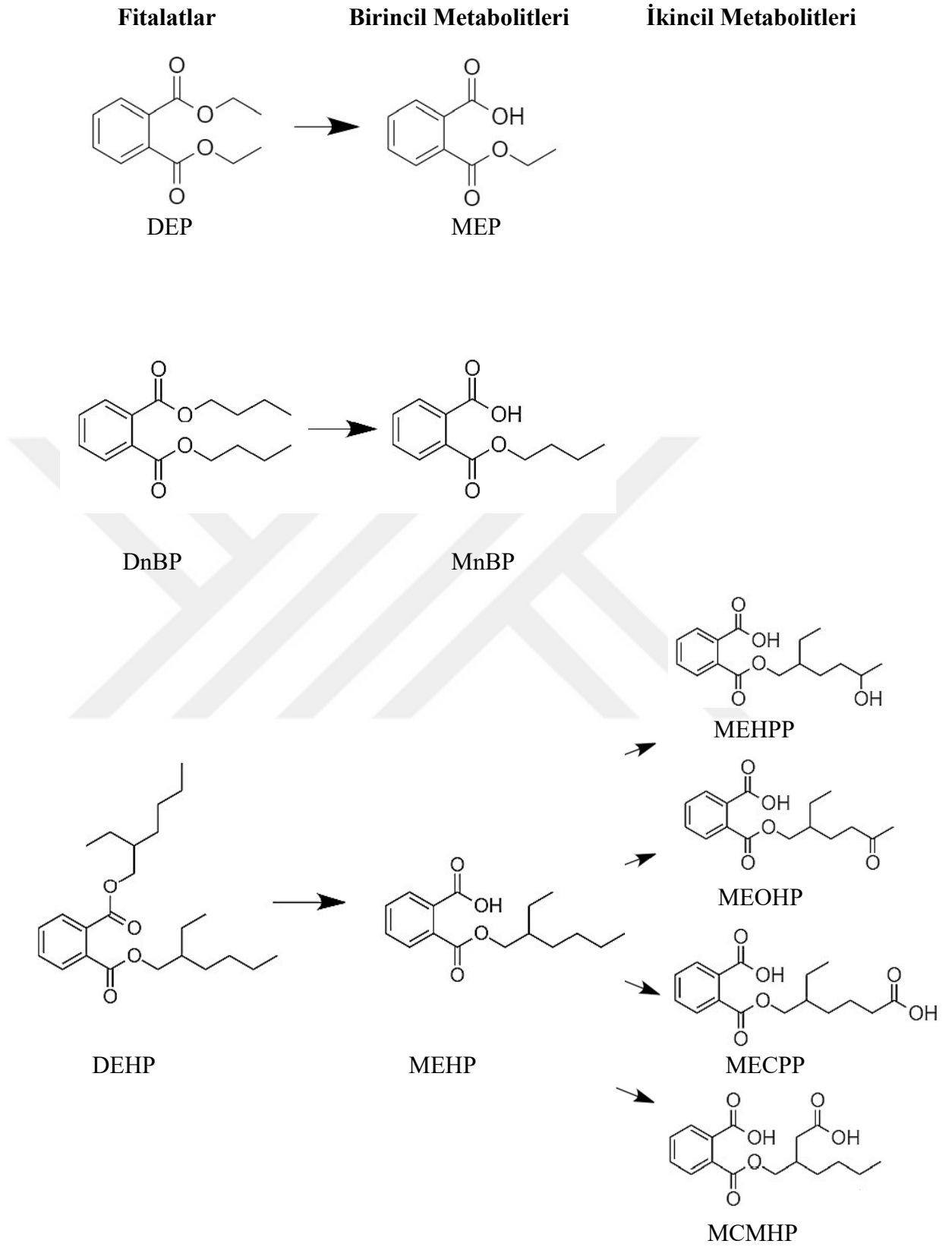


Şekil 2.5. Fitalatların biyotransformasyonu

Fitalat diesterlerin molekül ağırlıklarına göre bir veya birden fazla monoester metabolitleri oluşabilmektedir. Çizelge 2.2’de bazı fitalatlar ve ilgili metabolitleri verilmiştir. YMA fitalat olan DEHP; mono-(2-etilheksil) fitalat (MEHP), mono-(2-etil-5-hidroksiheksil) fitalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oksoheksil) fitalat (MEOHP), mono-(5-karboksi-2-etilpentil) fitalat (MECPP) ve mono-[2-(karboksimetil)heksil] fitalat (MCMHP) olmak üzere 5 tane monoester metaboliti bulunmaktadır. DMA fitalatlar olan DEP ve DBP’ın sırasıyla monoetil fitalat (MEP) ve mono-n-bütül fitalat (MnBP) olmak üzere tek bir metaboliti bulunmaktadır (Wallner vd., 2016). Şekil 2.6’da DEP, DBP ve DEHP’in ilgili metabolitlerine dönüşüm şeması verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı fitalatlar ve ilgili fitalat metabolitleri

FİTALATLAR	FİTALAT METABOLİTLERİ
Dimetil fitalat (DMP)	Mono-n-metil fitalat (MnMP)
Dietil fitalat (DEP)	Mono-etil fitalat (MEP)
Di-izobütil fitalat (DiBP)	Mono-izobütil fitalat (MiBP)
Di-n-bütil fitalat (DnBP)	Mono-n-bütil fitalat (MnBP)
Di-n-oktil fitalat (DnOP)	Mono-n-oktil fitalat (MnOP)
Di-izononil fitalat (DiNP)	Mono-izononil fitalat (MiNP)
Di-izodosil fitalat (DiDP)	Mono-izodosil fitalat (MiDP)
Benzilbütil fitalat (BzBP)	Mono-benzil fitalat (MBzP)
Di-2-etilhekzil fitalat (DEHP)	Mono-(2-etilhekzil) fitalat (MEHP)
	Mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) fitalat (MEHHP)
	Mono-(2-etil-5-oksohekzil) fitalat (MEOHP)
	Mono-(2-etil-5-karboksipentil) fitalat (MECPP)
	Mon-[2-(karboksimetil)heksil] fitalat (MCMHP)



Şekil 2.6. DEP, DnBP ve DEHP'in ilgili metabolitlerine dönüşümü

Fitalatlar biyolojik olarak kalıcı değildirler. Hidroliz ve oksidasyon metabolitleri, maruziyetten sonraki 6-24 saat içinde ağırlıklı olarak idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır (Kumar ve Sivaperumal, 2016). İnsanlarda serbest monoester atılım yüzdesi, fitalat metabolitlerinin sudaki çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir. DEHP'nin iki oksidatif metaboliti olan MEOHP ve MEHHP, çoğunlukla insanlarda glukuronidasyon yoluyla atılmaktadır. DEHP'nin hidrolitik monoester metaboliti olan MEHP de glukuronidleşmiş formunda atılırken, DEP'nin ve BBzP'in hidrolitik monoesteri olan MEP ve MBzP yeterli hidrofiliteye sahip olduğu için çoğunlukla serbest formlarda atılmaktadırlar (Hauser ve Calafat, 2005; Chang vd., 2021). Bazı durumlarda ise diester formdaki fitalatlar metabolize edilmeden vücuttan atılabilmektedirler (Chang vd., 2021).

2.2.4. Biyolojik matrislerde fitalatlar

İnsanlarda idrar, kan/serum, tükürük, anne sütü, semen plazma ve amniyotik sıvı gibi çeşitli biyolojik matrislerde fitalat esterleri ve metabolitleri tespit edilmiştir (Mankidy vd., 2013). İnsanlarda fitalat maruziyetini ve vücutta dağılımını izlemek için biyolojik matrisin seçimi önem arz etmektedir. İnsanlarda fitalat maruziyetinin izlenmesi için sıklıkla tercih edilen matris idrardır, çünkü non-invaziv örnekleme sayesinde toplanması nispeten kolay ve metabolit derişimleri diğer örneklere göre daha yüksektir. İdrardaki hidrofilik fitalat metabolitlerine ait seviyelerin, kandakinden (30-100 kat) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Calafat vd., 2013). Ayrıca çevresel kaynaklı kirlenme sonucu matrikse geçebilecek fitalat esterlerinin, metabolitlerine dönüşmesini sağlayacak enzim aktivitesi (lipaz veya esterase gibi) idrarda olmadığından, matrisin kirlenme riski de düşüktür (Katsikantami vd., 2016). Bileşimi sıvı alımına bağlı olmasına rağmen idrar, toplanması kolay bir biyolojik matristir. Genel olarak insan fitalat maruziyeti ve risk değerlendirmesi üzerine yapılan araştırmalarda, idrar matrisinde fitalat metabolitlerinin tayini gerçekleştirilmiştir (Tsochatzis vd., 2017).

Bileşimi su alımına göre değişen idrara göre, insan kan/kan serumu toksikokinetik çalışmalar için daha iyi bir matris olarak kabul edilmektedir. Kan/kan serumundaki ölçümler, genellikle daha kolay yorumlanabilir veriler sağlamaktadır. Ancak analiz için kullanılabilecek mevcut kan miktarı sınırlıdır. Kan alımı invaziv, karmaşık ve tıbbi bir

personel gerektiren bir işlemdir (Tsochatzis vd., 2017). Daha da önemlisi fitalat monoesterlerinin kan/serum ölçümleri, serum enzimleri (esteraz) tarafından ilgili monoesterlerine hidrolize edilen diesterlerden ve hatta fitalik asitten kaynaklanan kontaminasyona karşı hassastır. Bu kontaminasyon yüksek analiz sonuçlarına sebebiyet verebilir (Kato vd., 2003). Serumun fitalat diesterleri ile kontaminasyonu esas olarak örnek toplama, depolama ve analitik metodun uygulanması aşamasında meydana gelmektedir (Tsochatzis vd., 2017). Bu nedenle, numune hazırlama basamağında (analizden önce) bu enzimlerin aktivitesinin ortadan kaldırılması gerekmektedir (Kato vd., 2003).

Serum ve tükürükteki benzer seviyeler, tükürüğün biyoizleme çalışmalarında fitalat monoester miktarlarını ölçmek için alternatif bir matriks olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tükürük, basit ve invaziv olmayan bir şekilde toplanması (örneğin bir sürüntü ile) nedeniyle kana göre avantaj sağlamaktadır. Ancak matriks olarak tükürüğün tercih edilmeme nedeni, hidrofilik fitalat monoesterlerinin (MnMP ve MEP) hidrofobik fitalat monoesterlerinden daha az sıklıkla tespit edilmesidir (Silva vd., 2005a).

Bebeklerde anne sütü alımı ana maruz kalma yolu varsayıldığı için anne sütü, ikincil metabolitlere maruziyet hakkında bilgi sağlayabilen ve bu yüzden de yüksek ilgi gören bir biyolojik matrikstir. Suda çözünürlüğü daha yüksek olan monoesterler (örneğin, MEP) idrarda daha yüksek derişimlerde bulunurken, yağ içeriği %2-4 olan sütte daha çok lipofilik monoesterler bulunmaktadır. Ayrıca, lipofilik monoesterler idrarda ve serumda çoğunlukla glukuronidlenmiş formlarda bulunurken, anne sütünde ağırlıklı olarak serbest formlarda bulunabilirler (birincil monoester metabolitleri gibi) (Mortensen vd., 2005). Esterazların aktivitesi ile kan ve serumda oluşan kontaminasyon sorunu anne sütünde de meydana gelebilmektedir (Calafat vd., 2004).

Erkeklerdeki doğurganlık sorunlarıyla ilişkili olarak maruz kalmanın etkisi hakkında daha fazla bilgi edinmek, serum ve idrardaki seviyelerle korelasyon kurmak için seminal plazmadaki fitalat monoesterlerin analizi de önem teşkil etmektedir (Tsochatzis vd., 2017).

Fitalat metabolitlerinin amniyotik sıvıda da tayini gerçekleştirilmiştir. Fitalat esterleri plasentadan amniyotik sıvıya geçerek, fetüste monoesterlere metabolize edilebilmektedirler (Silva vd., 2004). Bu biyolojik matriks yardımıyla hamilelik sırasında annenin fitalat maruziyeti, yenidoğanın erken doğumu, üreme ve solunum sistemlerinde oluşabilecek sağlık riskleri ile ilişkilendirilebilmektedir (Katsikantami vd., 2020).

Ayrıca fitalat metabolitleri yukarıda bahsedilen biyolojik matriksler dışında; saçta, tırnakta, göbek kordonu kanında ve plasenta dokusunda tespit edilebilmektedir (Chang vd., 2013; Alves vd., 2016; Mose vd., 2007).

2.3.1. Fitalat monoester metabolitlerinin tayin metotları

Biyolojik matrikslerde (serum, idrar, tükürük, vb) fitalat esterlerinin ilgili birincil ve ikincil metabolitlerinin ayrılması, tanımlanması ve belirlenmesi için birçok analitik metodoloji bulunmaktadır. Genel olarak kalitatif ve/veya kantitatif analiz için kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC) veya gaz kromatografisi (GC) kullanılmaktadır (Tsochatzis vd., 2017; Tankiewicz vd., 2020). Bunlar; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birleştirilmiş MS (HPLC-MS), HPLC ile birleştirilmiş tandem kütle spektrometresi (MS/MS) (HPLC-MS/MS), ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle (UHPLC) birleştirilmiş MS/MS (UHPLC-MS/MS), GC-MS ve GC-MS/MS'dir (Blount vd., 2000; Anderson vd., 2002; Herrero vd., 2015; Tsochatzis vd., 2017; Elliani vd., 2020). MS dışında diğer dedektörler de kullanılabilmektedir. Ancak, MS saptamasını içermeyen analitik yöntemler genellikle daha az seçici ve duyarlıdır (Tankiewicz vd., 2020). ELISA, kapiler elektroforez ile birleştirilmiş MS (CE-MS) ve LC ile birleştirilmiş diyot array dedektörü (LC-DAD) kullanımıyla da fitalat metabolitleri tespit edilebilmektedir (Feng ve Zhu, 2008; Mazzeo vd., 2007; Feng vd., 2013).

HPLC, GC'ye kıyasla en yaygın kullanılan tekniktir. Biyolojik numunelerde fitalat metabolitlerinin eser seviyelerini tespit etmek için izotop seyreltme metodu ile HPLC-MS/MS kullanan analitik prosedürlere sıklıkla rastlanmaktadır (Silva vd., 2005b; Chang-Liao vd., 2013; Tankiewicz vd., 2020). Günümüzde, gerçek numunelerdeki metabolit seviyelerine karşılık gelen çok düşük derişimlerde tayinler için izotop

seyreltmeli MS yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu tür analizler, döteryumlanmış standart çözelti gereksinimi ve ekipman bakımının çok yüksek maliyetler gerektirmektedir (Frederiksen vd., 2007; Yang vd., 2015). Tandem MS ile ilgili diğer bir problem ise; numune matriksinin, bileşikler ve çapraz kirlenmeden kaynaklanan girişimler ile ilgili iyon bastırma etkisidir. Bu girişim yapan türler, damlacık oluşumunu veya damlacık buharlaşmasının verimini etkileyebilir, bu da dedektöre ulaşan gaz fazındaki yüklü iyon miktarını etkiler. Sonuç olarak, analitik metot validasyon parametrelerinde (tespit sınırı, kesinlik ve doğruluk gibi) istenmeyen sonuçlar gözlemlenebilmektedir (Majumdar, 2005). Bunun aksine, en yaygın kullanılan gaz kromatografisi (GC-MS) kütle spektrometresinde kullanılan iyonizasyon tekniği; çok güçlü, tekrarlanabilir ve iyon bastırma etkisine sahip olmayan elektron iyonizasyon (EI) bu amaç için iyi bir alternatif olabilmektedir (Niino vd., 2002; Guo vd., 2010; Rastkari ve Ahmadkhaniha, 2013). Ancak, GC kullanıldığında, monoesterlerdeki karboksilik asit grubunun diazometan (Kondo vd., 2010; Alzaga vd., 2003) veya trimetilsilil diazometan (Herrero vd., 2015) ile metilasyon ($-\text{COOCH}_3$) veya çeşitli türevlendirme ajanları ile sililasyonu (Fernandez vd., 2017) ($-\text{COOSiR}_3$) işlemine dayanan, uçucu türevlere dönüştürmeyi hedefleyen bir türevlendirme basamağı gerekmektedir. Bu basamak, analiz süresini artırmasına ve hatalara sebebiyet verebilmektedir. Fakat GC-MS'de tanımlama için spektral kitaplıklarının bulunması, maliyetinin az olması ve bulunabilirlik açısından avantaj sağlayan bir kromatografik yöntem olmaktadır (Tsochatzis vd., 2017).

2.3.2. İdrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları

Biyolojik numunelerde; matriksin karmaşıklığı, numunenin analitik cihazlarla uyumsuzluğu ve ayrıca belirlenmesi gereken hedef analitlerin düşük derişimlerde bulunmasından dolayı analiz öncesinde örnek hazırlama basamağı oldukça önemlidir (Armenta vd., 2021). Bu sebeple idrardaki fitalat monoester metabolitleri enstrümental analiz öncesinde bir dizi örnek hazırlama (numune ön işleme, ekstraksiyon ve temizleme vb.) basamağına uğrayarak tayin edilmektedirler. İdrarda fitalat metabolitleri hem serbest hem de glukuronid konjuge formlarını içerir. Bununla birlikte, konjuge türlerin tanımlanması ve ölçülmesi zor olabilir. Konjuge standartlar her zaman kolayca temin edilemez ve bu türlerin derişimlerini eser seviyelerde ölçmek için hassas ve doğru

analitik yöntemler gereklidir. Blount ve diğerleri (2000), β -glukuronidaz (*Escherichia Coli*'den) kullanılarak bir enzimatik hidrolizden sonra fitalat metabolitlerinin (hem serbest hem konjuge türlerin) toplam derişimini ölçmek için alternatif bir yaklaşım önermiştir. *Escherichia Coli*'den elde edilen β -glukuronidaz, glukuronid konjugatlarına özgüllüğü dışında lipaz aktivitesi göstermediğinden, bu yaklaşım bugüne kadar geniş çapta kabul görmüştür. *Helix protima* bazlı β -glukuronidaz, lipaz ve arilsülfataz aktivitesi nedeniyle dışarıdan kontamine diesterlerin hidrolizine yol açabileceğinden önerilmemektedir. Kantitatif hidroliz, idrar numunesinin (optimum pH 6,5) β -glukuronidaz ile 37°C'de 90 dakika süreyle inkübasyonu ile sağlanır. Enzimatik aktiviteyi durdurmak ve β -glukuronidazda bulunan lipazlar (varsa) tarafından harici olarak kirlenmiş fitalatların hidrolizini önlemek için, organik asit (formik asit, asetik asit ve hidroklorik asit) veya fosfat tamponu (pH=2,0) eklenmesi gerekmektedir. Asitlendirme adımından sonra genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) ve çevrimdışı / çevrimiçi katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemleri kullanılır (Blount vd., 2000; Kumar ve Sivaperumal, 2016; Tsochatzis vd., 2017). Literatürde; iyonik sıvı dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (IL-DLLME), sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (LLME), manyetik katı faz ekstraksiyon (MSPE), katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) ve dağıtıcı katı faz mikro ekstraksiyon (DSPME) yöntemleri kullanılarak fitalat metabolitlerinin ön deriştirilmesi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları

Analitler	Metot	Örnek Hazırlama Metodu	Gözlenebilme Sınırı (GS) Tayin Sınırı (TS)	Referans
MEP, MnBP, Monosikloheksil fitalat (MCyHP), MBzP, MEHP, MnOP, MiNP ve MiDP	HPLC-MS/MS	Hidroliz β -Glukuronidaz, 37°C, 1,5 saat + SPE 60 mg/3 mL ve 60 mg/10 mL Ticari Oasis HLB kartuşu	GS: 0,5-2 ng/mL TS: -	Blount vd., 2000
MnBP ve MBzP	GC-MS	Hidroliz (β -Glukuronidaz, 37°C, 24 saat) + LLE n-Heksan ve Diklorometan + Türevlendirme Diazometan	GS: 60 µg/L TS: 120 µg/L	Martens, F., ve Martens, M., 2002

Çizelge 2.3. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları (Devamı)

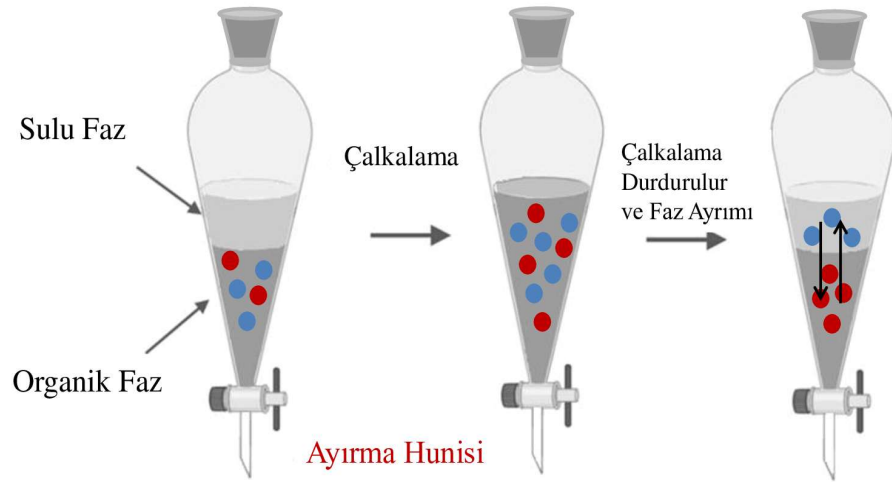
MEP, MnBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP ve MnOP	HPLC-MS/MS	Hidroliz β -Glukuronidaz, 37°C, 1 saat + Çevrimiçi SPE LiChrospher RP-8 ADS (25 μ m) 25 * 4 mm kolonu	GS: 0,25-1,0 μ g /L TS: 0,5-2,0 μ g /L	Koch vd., 2003
MnMP, MEP, MnBP, MEHP ve MBzP	GC-MS	Hidroliz β -Glukuronidaz, 37°C, 2 saat + Manyetik Katı Faz Ekstraksiyonu (MSPE) Manyetik karbon nanotüpler + Türevlendirme Klorotrimetilsilan, N,O- Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid	GS: 0,025-0,050 ng/mL TS: 0,125-0,250 ng/mL	Rastkari ve Ahmadkhanliha, 2013

Çizelge 2.3. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin analizinde kullanılan örnek hazırlama metotları (Devamı)

MiBP, MBzP ve MEHP	HPLC- DAD	İyonik Sıvı Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon (IL-DLLME) NH ₄ PF ₆ , [C ₈ MIM]PF ₆ ve [C ₄ MIM]BF ₄	GS: 0,3 µg/mL TS: -	Wu vd., 2016
MEHP	GC-FID (alev iyonizasyon dedektörü)	Sıvı-Sıvı Mikro Ekstraksiyon (LLME) n-Hegzan ve asetik asit (1:1, v/v)	GS: 1,1 µg/L TS: 3,6 µg/L	Sargazi vd., 2017
MEP, MBzP, MiBP, MnBP, MEHP, MnOP, MCyHP ve MiNP	GC-MS/MS	Hidroliz β-Glukuronidaz, 37°C, 2 saat + Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) Ticari divinilbenzen /karboksen/polidimetilsiloksan 50/30 µm (DVB/CAR/PDMS) fiber + Türevlendirme Piridin, metanol ve metil kloroformat	GS: 0,1-2,4 µg/L TS: 0,3-4,7 µg/L	Elliani vd., 2020
MnMP, MEP, MnBP, MBzP ve MEHP	HPLC-UV (Ultraviyole spektrometresi)	Dağıtıcı Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (DSPME) Moleküler baskılama	GS: 0,057–0.404 mg/L TS: 0,191–1,346 mg/L	Li vd., 2021

2.3.2.1. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) veya solvent ekstraksiyonu, kalitatif ve kantitatif analiz için numunelerin hazırlanmasında en eski ve en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. LLE tekniği genellikle kan, serum, idrar ve mide içeriği dahil olmak üzere çeşitli matriclere uygulanmaktadır. Herhangi bir numune hazırlama tekniğinde olduğu gibi, numune temizleme ve/veya analit bileşeni zenginleştirme, LLE'nin en yaygın hedeflerindendir. LLE, numune bileşenlerinin birbiriyle karışmayan iki sıvı faz arasında dağılımını içermektedir. En klasik haliyle, bir ayırma hunisinin içerisinde bir sıvının damlalarını diğesinde dağıtmak için karışım çalkalanır, damla birleşmesine izin vermek için çalkalama durdurulur. Daha sonra sıvı fazları birbirinden ayırarak LLE gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.7) (Cantwell ve Losier, 2002; Kyle, 2017).



Şekil 2.7. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE)

LLE; büyük numune hacim kapasitesi, organik ekstraktın kendisinin nicel analitik ölçüm adımına doğrudan tabi tutulabilmesi, organik çözücü seçimi (pH ve reaktiflerin türü ve derişimi) hakkında bilgi sağlayan geniş literatüre sahip olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Bunun aksine; uzun ekstraksiyon süreleri, çoklu ekstraksiyon, insan sağlığına ve çevre için potansiyel tehdit oluşturabilecek çok miktarda toksik çözücü kullanılması LLE'nin dezavantajları arasında yer almaktadır (Kyle, 2017; Urkude vd., 2019).

Literatürde LLE yöntemi kullanılarak idrardaki ftalat monoester metabolitlerinin tayinine yönelik çalışmalar mevcuttur. Dirven ve diğerleri (1993) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, plastikleştirici olan DEHP'ye maruz kalmanın biyolojik olarak izlenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde idrarda DEHP'in dört metaboliti; MEHP, MECPP, MEOHP ve MEHHP incelenmiştir. İlk olarak idrar örnekleri hidroklorik asit (HCl) kullanılarak pH 4,85-4,9'a ayarlanmıştır. Örnekler glukuronidaz/arilsülfataz enzimi ile 37° C'de 16 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Bu işlemin sonunda ftalat metabolitlerinin içerisine internal standart olarak monopentil ftalat eklenmiş ve pH'ı 1'e (HCl) ayarlanmıştır. İdrardaki ftalat metabolitleri dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Eter tabakası azot (N₂) ile kurutulmuştur ve ardından trietilamin, diklorometan ve trietiloksonyum tetrafloroborat eklenerek türevlendirilmiştir. Türevlendirme reaksiyonunu izlemek için hidrojen florür oluşumu kullanılmıştır. Aynı hacimde trietiloksonyum tetrafloroborat çözeltisi bir dizi içindeki tüm numunelere ilave edilmiştir. Fazla diklorometan, N₂ ile kurutulmuş ve kurutulmuş ekstrakta su ilave edildikten sonra n-heksan ile ekstrate edilmiştir. Ekstraktlar, N₂ altında kuruyana kadar buharlaştırılmıştır, daha sonra toluen içinde çözünmüş ve GC-MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda 4 metabolit için GS'ları 25 µg/L'den düşük bulunmuştur. Yöntem mesleki olarak DEHP'ye maruz kalan işçilerin idrar numunelerine uygulanmış ve varyasyon katsayısı, MEHP için %16 (ortalama derişim 0,157 mg/L) ve diğer üç metabolit için %6-9 (ortalama derişimler 0,130-0,175 mg/L) olarak bulunmuştur.

Kim ve diğerleri (2014) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, idrardaki 8 ftalat monoester metabolitinin (MEP, MiBP, MnBP, MBzP, MiNP, MEHP, MEOHP ve MEHHP) eşzamanlı analizi için bir GC-MS metodu geliştirilmiştir. Matriks etkisini minimize etmek ve kantitatif analizi gerçekleştirmek için izotop seyreltme ve LLE yöntemleri uygulanmıştır. İdrar örneklerinden ilk olarak glukuronik asidi ayırmak için β-glukuronidaz enzimiyle hidroliz gerçekleştirilmiştir. İdrar örneğine, iç standart karışımları eklenmiş ve daha sonra amonyum asetat ile enzimin aktif olduğu pH'ı 6,0-6,5'e ayarlanmıştır. Karışımın içerisine β-glukuronidaz eklenmiş ve 37°C'de 2 saat boyunca hidrolize edilmiştir. Enzimatik hidroliz tamamlandıktan sonra susuz sodyum sülfat eklenmiştir. Monofitalat esterlerin pH'ı 4,0'a ayarlanmış (asetik asit ile) ve LLE

işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, farklı oranlarda n-heksan ve etil eter karışımı denenmiş ve seçilmiştir. Ekstraksiyon için örneğe 8:2 oranında ekstraksiyon solventi eklenmiş ve mekanik olarak çalkalanmıştır. Organik faz, santrifüj edilerek ve idrar fazı dondurularak ayrılmıştır. Bu işlemler iki kez tekrarlanmıştır. Ekstrakte edilen çözücülerin N₂ altında uçurulmuş ve 30 dakika boyunca vakumlu desikatörlerde (P₂O₅/KOH/silika jel) kurutulmuştur. Trifluoroetanol kullanılarak alkoksilasyonun ve trimetilsilanol kullanılarak silillemenin etkinliği karşılaştırılarak bir türevlendirme reaktifi seçilmiştir. Sililleme işlemi için, LLE ve vakum desikatörlerinde dehidrasyondan sonra, numune tüpüne N,O-bis(trimetilsilil)-trifloro asetamit (BSTFA) (%1 trimetil kloro silan (TMCS) ile karıştırılmış) eklenmiş ve 65 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Türevlendirmeden sonra numune, GC-MS ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyon ve türevlendirmenin etkinliğini değerlendirmek için son adımda fenantren-d₁₀ iç standardı eklenmiştir. Tüm monoester metabolitleri için, GC-MS sonuçlarında yüksek tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Bu çalışma sonucunda, GS değerleri 0,05-0,2 ng/mL aralığında ve TS değerleri ise 0,1-0,5 ng/mL aralığında bulunmuştur. Su ve idrar kullanılarak gün içi kesinliğin bağıl standart sapması %2,1 ile %16,3 arasında değişmiştir. Gerçek numunelerin analizi, Kore Cumhuriyeti'nde ikamet eden yetişkinlerden toplanan idrar örnekleriyle yapılmıştır. Analiz edilen derişim sonuçları cinsiyete ve bölgeye göre karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, idrarda DEHP monoester metabolitleri (MEHP, MEOHP ve MEHHP) tespit edilen en yüksek derişimi oluştururken ve DiNP'nin bir metaboliti olan MiNP en düşük derişimde tespit edilmiştir. Ortalama olarak, kadın idrarının erkek idrarından daha yüksek Σ_8 fitalat metabolit derişimine sahip olduğu görülmüştür. Kırsal bölgelerden alınan numunelerde, kentsel bölgelerden alınan numunelerden daha yüksek metabolit seviyelerine rastlanmıştır.

Gries ve diğerleri (2012) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise; yüksek molekül ağırlıklı ve piyasada sıklıkla kullanılan di-(2-propilheptil) fitalatın (DPHP) metaboliti olan mono-2-(propil-6-hidroksi-heptil) fitalat (MPHHP), mono-2-(propil-6-oksoheptil) fitalat (MPOHP) ve mono-2-(propil-6 karboksi-heksil) fitalatın (MPCHP) insan idrarından tayini gerçekleştirilmiştir. Burada fitalat metabolitlerinin belirlenmesi için HPLC-MS/MS ile GC-HRMS (gaz kromatografisi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi) arasındaki kromatografik ayrımın bir karşılaştırması gerçekleştirilmiştir.

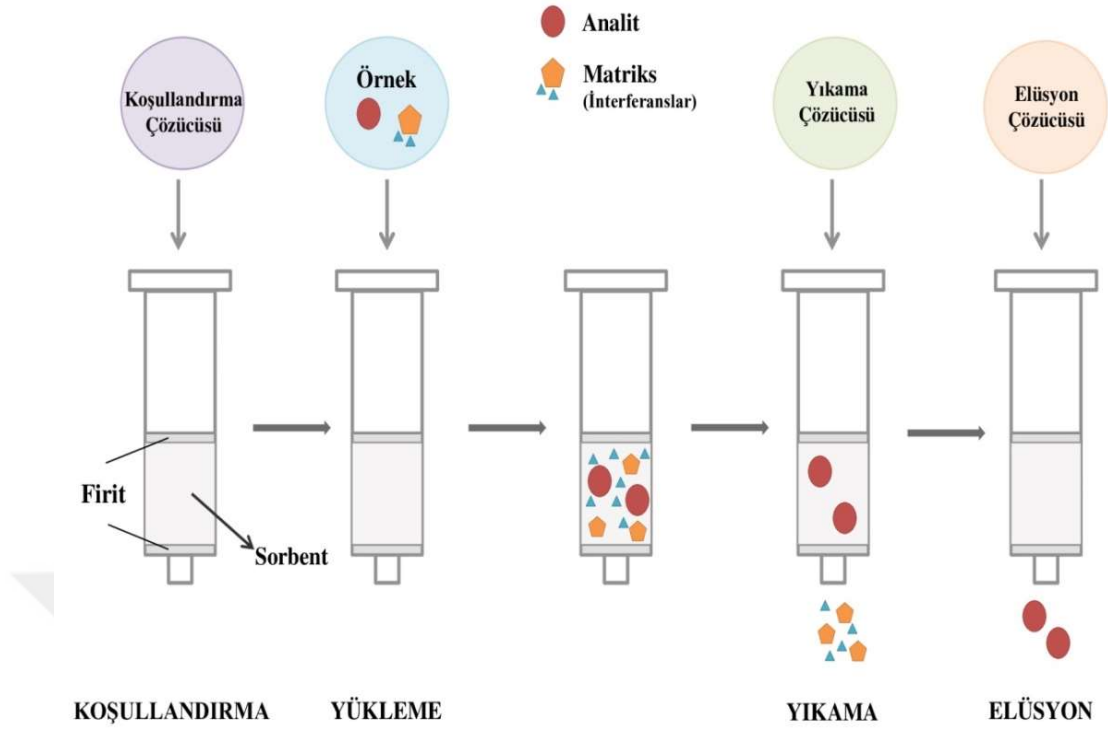
İlk olarak, idrar örneğinin içerisine iç standart (10 µg/L'lik döteryumlanmış iç standart karışımı MPOHP-d₄, MPOHP-d₄ ve MPCHP-d₄), amonyum asetat tamponu (pH 6,5) ve β-glukuronidaz ilave edilerek numune gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Numune hidroliz işleminden sonra oda sıcaklığına getirilmiş ve HCl (%37) ile pH 2'de asitlendirilmiştir. Numuneye tert-bütıl-metil-eter ilave edilerek LLE işlemi gerçekleştirilmiştir. Numune kuvvetlice çalkalanmıştır ve ardından numune santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant N₂ altında kurutulmuştur. LC-MS/MS tayini için numune kalıntısı metanol içinde çözülerek analiz edilmiştir. GC-HRMS tayini için ise numune kalıntısı asetonitril içinde çözülmüştür. GC-HRMS' de tayin öncesinde ise LLE adımına ek olarak türevlendirme basamağı uygulanmıştır. Bunun için 1,1,1,3,3,3-hekzafloroizopropanol ve N,N diizopropilkarbodiimid ilave edilmiş ve çözelti oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından sodyum hidrojen karbonat çözeltisi ve izo-oktan eklenerek kuvvetlice karıştırılmış ve daha sonra santrifüjlenmiştir. Son olarak süpernatant alınarak GC-MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda; GS'ları, GC-HRMS için 0,05-0,1 µg/L ve HPLC-MS/MS için 0,1-0,2 µg/L arasında bulunmuştur. TS'ları ise, GC-HRMS için 0,3-0,25 µg/L ve HPLC-MS/MS için 0,3-0,5 µg/L arasında bulunmuştur.

Wu ve diğerleri (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, zayıf ila orta polariteye sahip fitalat monoester metabolitlerinin (MiBP, MBzP ve MEHP) ön zenginleştirilmesi için "NH₄PF₆ ile güçlendirilmiş, organik olmayan çözücü, çift mikro ekstraksiyon" iyonik sıvı bazlı dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (IL-DLLME) yöntemi geliştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak alkilimidazolyum heksflorofosfat bazlı iyonik sıvı [C₈MIM]PF₆ ve dağıtıcı olarak [C₄MIM]BF₄ kullanılmıştır. IL-DLLME işleminden önce idrar numunelerinin üzerine ultra saf su ilave edilmiş (1:5) ve ardından HCl ile pH 2,0-4,0 aralığına ayarlanmıştır. İlk mikro ekstraksiyon için, [C₈MIM]PF₆ ve [C₄MIM]BF₄ karışımı hızlı bir şekilde tüpe enjekte edilmiş ve bir bulutlu çözelti oluşturulmuştur. Daha sonra tüp, ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş, bulutlu çözelti daha sonra santrifüjlenmiş ve bu işlem de ekstraksiyon çözücüsünün çökmesine neden olmuştur. Tortulu ekstraksiyon çözücüsü başka bir tüpe aktarılmıştır. İkinci mikro ekstraksiyon için ise, dispersif çözücü [C₄MIM]BF₄ içeren kalan sulu faza NH₄PF₆ ilave edilip karıştırılmıştır. Tüp buz banyosuna yerleştirilmiş ve daha sonra santrifüj edilerek

faz ayrımı sağlanmıştır. Son olarak, üstteki sulu faz atılmış ve çöken faz mikrolitre hacimli şırınga ile toplanmıştır. Toplanan faz, ilk mikro ekstraksiyondan elde edilen tortulu ekstraksiyon çözöcüsü ile karıştırılmıştır. Karışık çökelti fazı asetonitril ile seyreltilmiş, 0,22 µm'lik bir filtre ile süzölmüş ve daha sonra HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, üç fitalat monoester metaboliti için, yüksek ekstraksiyon geri kazanım (%93,8-99,1) ve düşük GS değerleri (0,29- 0,34 µg/L) bulunmuştur.

2.3.2.2. Katı faz ekstraksiyon (SPE)

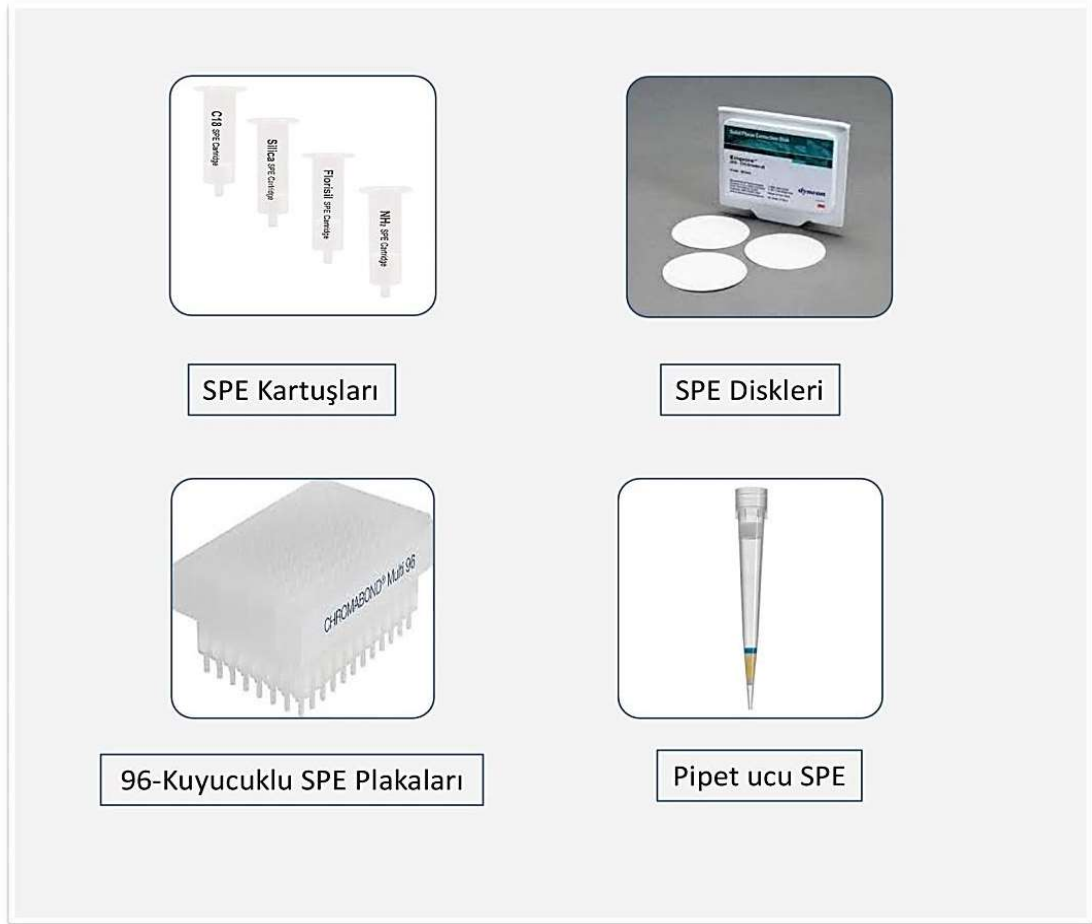
Katı faz ekstraksiyonu (SPE), bir veya bir tür analiti bir çözeltiden izole etmek için bir katı faz ve bir sıvı faz kullanan bir ekstraksiyon yöntemidir. Genellikle numunedeki analit(ler)in miktarını belirlemek için kromatografik veya başka bir analitik yöntem kullanmadan önce bir numuneyi temizlemek için kullanılır. Katı faz ekstraksiyon, hızlı ve seçici numune hazırlama için řu anda mevcut olan çok popüler bir tekniktir. SPE'nin çok yönlölüğü, bu tekniğin saflaştırma, eser miktar zenginleştirme, tuzdan arındırma, türevlendirme ve sınıf ayırma gibi birçok amaç için kullanılmasına izin verir. SPE'de genel mekanizma, SPE fazına bir çözelti yüklemek, istenmeyen bileşenleri yıkamak ve ardından istenen analitleri başka bir çözöcü ile bir toplama tüpüne almaktır (Şekil 2.8) (Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).



Şekil 2.8. SPE mekanizması

Seçici bir yöntem olarak SPE, geleneksel ters fazlı sorbentlerden (C_{18} ve C_8), normal faza (silika ve alümina) ve iyon değişimine, stiren-divinilbenzen polimerlerine dayanan karışık modlu (iyon değişimi+ters faz) ve işlevselleştirilmiş reçinelere kadar sayısız farklı sorbent seçeneği sunmaktadır. Silis ve bağlı silika sorbentler, grafitleştirilmiş veya gözenekli karbon, polimerik sorbentler, seçici sorbent sınıfında yer alan moleküler baskılanmış polimerler ve immünosorbentler sıklıkla kullanılan katı faz materyalleri arasında yer alır. SPE’de uygun bir SPE ekstraksiyon sorbentinin seçimi, sorbent ile ilgilenilen analit arasındaki etkileşim mekanizmasının anlaşılmasına bağlıdır. Hedef bileşikler ile katı faz arasındaki etkileşimler, van der Waals kuvvetleri gibi hidrofobik etkileşimleri ve dipol-dipol, indüklenmiş dipol-dipol, hidrojen bağı ve π - π etkileşimleri gibi hidrofilik etkileşimleri içerir. Ek olarak, ilgilenilen analit üzerindeki yüklü gruplar ile sorbent yüzeyindeki yüklü gruplar arasında, moleküler tanıma mekanizmalarının yanı sıra elektrostatik çekimler de gerçekleşir. Bu tür etkileşimler, ters faz, normal faz, iyon değişimi, immünoafinite ve moleküler olarak baskılanmış polimerler için karakterize edilir (Buszewski ve Szultka, 2012; Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).

SPE’de şırınga haznesindeki diskler/kartuşlar, diskler, 96-kuyucuklu SPE plakaları ve SPE pipet ucu olmak üzere genel olarak 4 tip sorbent formatı mevcuttur (Şekil 2.9). SPE kartuşları, bir plastik veya cam kolonların arasında sabit faz ve sabit fazın alt ve üst kısmında yer alan fritlerden oluşmaktadır. SPE kartuşlarının, 1 mL ila 50 mL arasında değişen hacimlerde ve çeşitli boyutlarda, birçok sorbent türü ve farklı sorbent miktarlarını içeren türleri mevcuttur. Belirli bir uygulama için optimum kartuş boyutu seçilirken, tüm analitleri tutma yeteneği, orijinal numunenin hacmi ve elüsyondan sonra saflaştırılmış numunenin son hacmi gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır (Buszewski ve Szultka, 2012; Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).



Şekil 2.9. Sorbent formatları

SPE diskleri ise, SPE kartuşunun bir çeşididir. Diskler, adsorbanın bir mikrofibril ağı içinde immobilize edildiği 0,5 mm kalınlığında bir zardan oluşur. Sorbent (polimer veya silika üzerinde), bir politetrafloroetilen veya cam elyaf ağı içine gömülür. Disklere gömülü sorbent partikülleri, kartuşlarda bulunanlardan daha küçüktür. Kısa numune yolu ve küçük parçacık boyutu, analitlerin verimli bir şekilde yakalanmasına olanak tanır. Fakat kartuşlar laboratuvarı kolayca hazırlanırken, diskler şimdiye kadar yalnızca imalat ortamında üretilmiştir. Ayrıca, büyük numuneleri işlemek ve numune temizliği gerçekleştirmek için kartuşları ölçeklendirmek, diskler göre daha kolaydır. Diskler, kartuşlardan önemli ölçüde daha pahalıdır ve nispeten basit, rutin uygulamalar için, ekonomik hususlar genellikle kartuş kullanımını zorunlu kılar (Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006; Poole, 2003).

Pipet ucu ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonunun basit ve hızlı bir yöntemini temsil eder. Katı faz sorbent, pipet ucunun içindeki iki frit arasına gevşek bir şekilde yerleştirilir; numune alınır ve sabit faz ile karıştırılır. Matris atığa gönderilir ve adsorbe edilen analitler az miktarda çözücü ile elüe edilerek kromatografik cihazlarla analizi gerçekleştirilir. Küçük çözücü hacmi nedeniyle zaman alıcı deriştirme aşaması gerekli değildir. Pipet ucu SPE’de tekniğinin daha hızlı ekstraksiyon süresi (1-2 dakika), tüm analitler için tek ekstraksiyon yöntemi, temiz ekstraktlar, tipik SPE’den daha az numune hacmi (200 µL), daha az solvent hacmi (200 – 400 µL) ve daha az solvent atığı olmak üzere bazı avantajları bulunmaktadır (Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).

SPE’nin yeni formatı 96 kuyucuklu SPE plakalarıdır. Paralel numune işleme, 96 numunenin yaklaşık bir saat veya daha kısa sürede ekstrakte edilmesini sağlar. 96 örneğin aynı anda uygulanması, uygulama hatalarını ve iş yükünü azaltır. 96 oyuğun her biri, 3-10 mg paketleme malzemesi içeren 1 veya 2 mL’lik küçük bir SPE kartuşuna sahiptir. Bir SPE kartuşundaki paketleme malzemesi, alt frit veya membran ile üst frit arasına yerleştirilir. Tipik SPE kartuşlarıyla karşılaştırıldığında, bu küçük dolgulu yatak kuyuları farklı akış özelliklerine, kütlelerine ve hacimlerine sahiptir. Fakat bu plakalar oldukça maliyet gerektirmektedir (Żwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).

Literatürde SPE yöntemi kullanılarak idrardaki fitalat monoester metabolitlerinin tayinine yönelik birçok çalışma mevcuttur. Blount ve diğerleri (2000) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada insan idrarındaki 8 fitalat metabolitinin (MEP, MnBP, MCyHP, MBzP, MEHP, MnOP, MiNP ve MiDP) HPLC-MS/MS ile eser düzeylerinin eş zamanlı ölçümü için bir yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak, idrar örneği amonyum asetat ile pH 6,5'e tamponlanmıştır. Üzerine izotopik olarak etiketlenmiş ve dekonjuge edilmiş iç standartlar eklenmiştir. β -glukuronidaz (*Escherichia Coli*'den) enzimi eklenmiş ve 37 °C'de 90 dakika inkübe edilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik dekonjugasyondan sonra SPE ile ön zenginleştirme basamağı uygulanmıştır. SPE işlemi 2 kez uygulanmış ve bunun için 60 mg/3 mL ve 60 mg/10 mL olmak üzere 2 adet farklı ticari Oasis HLB kartuşu kullanılmıştır. İlk olarak 1.SPE kartuşu (60 mg/3 mL) asetonitril ve bazik tamponla koşullandırılmış ve daha sonrasında örnek kartuştan geçirilip analitler bazik tamponla kartuştan elüe edilmiştir. Kartuştan elüe edilmiş bazik eluatlar asidik tamponla asitlendirilmiştir. 2.SPE kartuşu (60 mg/10 mL) asetonitril, su ve asidik tampon ile koşullandırılmıştır. Asitlendirilmiş numune 2.SPE kartuşundan geçirilmiş ve kartuş asidik tamponla yıkanarak daha da saflaştırılmıştır. Daha sonra kartuş suyla yıkanarak fazla tuzlar uzaklaştırılmıştır. Ardından analitler etil asetat ve asetonitril elüe edilmiştir. Elüent N₂ altında uçurulmuş ve kalıntı üzerine su eklenerek ters fazlı HPLC-MS/MS ile tespit edilmiştir. Fitalat metabolitlerinin izotop seyreltme ile miktarları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda; MEP, MnBP, MCyHP, MBzP, MEHP, MnOP, MiNP ve MiDP için GS'ları sırasıyla 1,0; 0,6; 0,7; 0,8; 1,2; 0,9; 0,8; 1,5 ng/mL olarak bulunmuştur.

Kato ve diğerleri (2004) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada insan idrarındaki üç fitalat monoester metabolitlerinin (MnBP, MBzP ve MEHP) tayini için çevrimiçi SPE–HPLC–MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. İlk olarak idrar numunelerine döteryumlu iç standartlar (d₄-MnBP, d₄-MBzP ve d₄-MEHP) eklenmiş ve daha sonra dekonjugasyon için numuneye β -glukuronidaz eklenerek 37 °C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. Çevrimiçi SPE için HySphere-C18 HD kartuşu kullanılmıştır. İlk olarak HPLC sistemine entegre olan kartuş metanol, su ve asidik tamponla (Na₂HPO₄/H₃PO₄) koşullandırılmıştır. Dekonjuge idrar numunesi asidik tampon kullanılarak kartuşa yüklenmiş ve ardından kartuş su ile yıkanmıştır. Numune asetik asit–asetonitril (75:25

v/v) mobil fazı ile elüe edilerek HPLC'de ayrımı gerçekleştirilmiştir. Analitler, seçici reaksiyon izleme ile negatif iyon modunda tespit edilmiştir ve yöntemin doğruluğu, izotop seyreltme kullanılarak geliştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda geri kazanımlar %84,3'ün üzerinde ve bağıl standart sapmalar ise %0,8 ila %4,8 arasında değişim gösterdiği bulunmuştur. GS'ı değerleri 0,7-1,7 ng/mL ve TS değerleri 2,3-5,7 ng/mL aralığında bulunmuştur.

Rastkari ve Ahmadkhaniha (2013) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, manyetik çok duvarlı nanotüp temelli manyetik katı faz ekstraksiyon kullanılarak idrardaki 5 (MnMP, MEP, MnBP, MEHP ve MBzP) fitalat monoesterlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Manyetik karbon nanotüpler (MCNT'ler), manyetik nanopartiküllerin asitle muamele edilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine monte edilmesiyle hazırlanmıştır. Mükemmel adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle manyetik karbon nanotüpler, insan idrarından fitalat maruziyetinin ana biyobelirteçleri olan fitalat monoesterlerini ayırmak için manyetik katı faz ekstraksiyonunun (MSPE) adsorbanı olarak kullanılmıştır. Manyetik nanopartiküllerin miktarı, numune çözeltisinin pH'ı, ekstraksiyon ve desorpsiyon süresi, tuz miktarı, desorpsiyon çözücünün türü ve hacmi gibi ekstraksiyonu etkileyebilecek faktörler ayrıntılı olarak araştırılmış ve ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. pH=2,5-1,5, sorbent miktarı=0,5 mg/mL, 100 mg/2 mL NaCl, 3 dk adsorpsiyon süresi, desorpsiyon çözücüsü olarak izopropanol ve çözücü hacmi ise 5 mL, desorpsiyon süresi ise 2 dk olarak optimize edilmiştir. İlk olarak idrar numunesine iç standart (3-bromobenzoik asit) eklenmiş ve numune amonyum asetat çözeltisi ile pH 6,8'e tamponlanmıştır. Daha sonra üzerine β -glukuronidaz ilave edilerek hafifçe karıştırılmış ve 37 °C'de 120 dakika inkübe edilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Karışım daha sonra fosfat tamponu ile asitlendirilmiştir. Daha sonra karışıma MCNT ve NaCl ilave edilerek karışım kuvvetlice karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından manyetik adsorbanı şişenin yan tarafına toplamak için bir mıknatıs kullanılmış ve süpernatant atılmıştır. Ardından fitalat metabolitlerini adsorbandan ayırmak için izopropanol ilave edilerek karıştırılmıştır. Desorpsiyon çözücüsü toplanarak N₂ altında kurutulmuştur. Kalıntıya piridin içinde klorotrimetil-silan ve BSTFA eklenerek 65 °C 30 dk türevlendirme işlemi gerçekleştirilerek GC-MS ile analiz edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında, fitalat monoesterleri için elde edilen en düşük GS'ı 0,025-0,050

ng/mL aralığında bulunurken, en düşük TS'ı ise 0,125-0,250 ng/mL aralığında bulunmuştur. Ek olarak, gün içi ve günler arası kesinliklerin sırasıyla %11,2 ve %11,4'ten daha az bağıl standart sapmalarla (BSS) değerlendirilmesiyle tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Beş fitalat monoesterin geri kazanımları, BSS'lar %10,7'den az olmak üzere %92,6 ile %98,8 arasında değişim göstermiştir.

Elliani ve diğerleri (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise idrardaki 8 fitalat monoesterinin (MEP, MiBP, MBzP, MnBP, MCyHP, MEHP, MiNP ve MnOP) katı faz mikroeğstraksiyon (SPME) yöntemi kullanılarak GC-MS/MS ile tayinleri gerçekleştirilmiştir. SPME' de en yüksek eğstraksiyon verimini elde etmek için bazı koşulların optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar; farklı ticari SPME fiberi, eğstraksiyon süresi, iyonik kuvvet ve eğstraksiyon sıcaklığıdır. Fiber optimizasyonunda 5 tane SPME ticari fiber arasından (Poliakrilat 85 µm, karboksen/polidimetilsiloksan 85 µm (Car/PDMS), polidimetilsiloksan/divinilbenzene 65 µm (PDMS/DVB), polidimetilsiloksan 100 µm (PDMS), divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan 50/30 µm (DVB/Car/PDMS)) en iyi eğstraksiyon sonucunu veren DVB/Car/PDMS fiberi seçilmiştir. Diğer optimizasyon koşullarında ise en iyi eğstraksiyon verimi %10 NaCl (w/w) kullanılarak ve analitlerin 80 °C'de 40 dakika boyunca eğstraksiyonuyla elde edilmiştir. İlk olarak, insan idrarına uygun miktarda döteryumlanmış iç standart (MnBP-d₄) eklenmiş ve amonyum asetat ile tamponlanmıştır. Daha sonra karışıma β-glukuronidaz eklenerek 37°C'de 2 saat boyunca hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz, %10 sülfürik asit ile pH 2'ye asitlendirilerek durdurulmuş ve bu işlemin ardından analitlerin türevlenmesi için pH 7'ye ayarlanmıştır. Türevlendirme adımı; piridin, metanol ve metil kloroformatın eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ardından karışıma NaCl ilave edilmiş ve DVB/Car/PDMS fiberi doğrudan daldırılarak, 80°C'de 40 dakika boyunca SPME'nu gerçekleştirilmiştir. Fibere adsorbe olan analitler termal desorpsiyonla elüe edilmiş ve GC-MS/MS ile analiz edilmişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda en düşük GS'ı 0,1-2,4 µg/L aralığında bulunurken, en düşük TS'ı ise 0,3-4,7 µg/L aralığında bulunmuştur.

Huang ve diğerkleri (2022) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, polietilenimin (PEI) ile fonksiyonelleştirilmiş amin işlevli poli(divinilbenzen) (PDVB) ve ardından glisidil fenil eter (PDVB-QPEI olarak adlandırılır) ile kuaternizasyona dayalı olarak sentezlenen, karışık modlu bir anyon değiştirici (MAX) adsorbent geliştirilmiştir. Adsorbent Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi ve azot adsorpsiyon desorpsiyon deneyleri ile karakterize edilmiştir. PDVB-QPEI'nin 118,5 m²/g'lik bir BET spesifik yüzey alanı, 0,37 cm³/g'lik gözenek hacmi ve 16,41 nm'lik gözenek boyutu ile başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir. 0,57 mmol/g'lik yüksek iyon değişim kapasitesi elde edilmiştir. PDVB-QPEI MAX adsorbenti kullanılarak, idrar örneklerindeki bisfenol analoglarının (Bisfenol A bisfenol B, bisfenol E, bisfenol F, bisfenol S, bisfenol Z, bisfenol AF ve tetrabromobisfenol A) ve fitalat monoesterlerinin (MMP, MEP, MnBP, MBzP ve MEHP) tayini için bir SPE yöntemi geliştirilmiştir. SPE verimliliğini etkileyen önemli parametreler olan; adsorbent miktarı, örneğin pH'ı, yıkama çözücüsü ve elüent türü ve elüent hacmi optimize edilmiştir. İlk olarak, 200 mg PDVB-QPEI adsorbent 3 mL'lik bir cam SPE kartuşuna doldurulmuştur. Kartuş, 5 mL metanol ve 5 mL su ile koşullandırılmıştır. Daha sonra 3 mL idrar rneği fosfat tamponu (pH=7) ile 10 mL'ye seyreltildikten sonra örnek 0,5 mL/dk akış hızında kartuştan geçirilmiştir. Daha sonra kartuş önce 2 mL amonyaklı su (pH 12) ve ardından 3 mL saf su ile yıkanmıştır. Tam vakum altında 30 dakika kurutulduktan sonra, nötr veya bazik etkileşimleri ortadan kaldırmak için kartuş 5 mL asetonitril ile yıkanmıştır. Analitler iki ayrı kısma ayrıştırılmıştır. İlk olarak, bisfenol analogları 3 mL metanol (Elat I) ile elüe edilmiş ve ikinci olarak, fitalat monoesterler ve tetrabromobisfenol A metanol içinde 3 mL %1 formik asitle elüe edilmiştir (Elate II). Elate I ve Elate II, N₂ altında 30 C'de kurutulmuş ve ardından 500 L su/asetonitril (3/1, v/v) içinde çözülerek HPLC-DAD ile analiz gerçekleştirilmiştir. Bu alışma sonucunda geri kazanım değerleri %80,1 ila %102,4 (%6'dan az, n=3) ve en düşük GS'ı 3-9 ng/mL aralığında bulunmuştur. PDVB-QPEI adsorbenti, ticari kartuşlarla (Oasis HLB, C18 ve Oasis MAX) karşılaştırılmış ve bulunan değerler sonucunda üstün olduğu grlmştir.

Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan diğer çalışmalar izelge 2.4.'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan çalışmalar

Analitiler	Matriks	Metot	Örnek Hazırlama Metodu	Elüent	Gözlenebilme Sınırı (GS)	Referans
					Tespit Sınırı (TS)	
MnMP, MEOHP, MEHHP, MEHP, MEP, MnBP, MBzP, MCyHP, MnOP, MiNP ve MiDP	İdrar	HPLC-MS/MS Kolon: Betasil phenyl (2 x 50 mm, 5 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C, 1,5 saat + SPE 60 mg ve 200 mg Ticari Nexus kartuşlar	Asetonitril ve etil asetat	GS: 0,47-1,6 ng/mL TS: -	Silva vd., 2003
MEP, MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MnOP, MiNP, MECPP, Mono-(4-metil 7-hidroksil oktil) fitalat (MMHOP), Mono-(4-metil7-okso-oktil) fitalat (MMOOP), ve Mono-(4-metil-7-karboksi heptil) fitalat (MMCHP)	İdrar	LC-MS/MS Kolon: Synergi 4U fusion-RP 80A (2 × 75 mm, 4 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C, 1,5 saat + SPE 200mg/ 3mL Ticari StrataXL kartuşu	Asetonitril ve etil asetat	GS: 0,11-1,43 ng/mL TS: -	Frederiksen vd., 2010

Çizelge 2.4. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan çalışmalar (Devamı)

MEP, MnBP, MBzP, MEHP ve MnMP	İdrar	HPLC–MS/MS 2 Kolon: Thermo Betasil phenyl (50 mm × 2,1 mm, 3 µm)	Hidroliz β-Glukuronidaz, 37°C 3 saat + SPE 200 mg/ 3 mL Ticari C18 SampliQ kartuşu	Asetonitril	GS: 0,11-1,1 ng/mL TS: 0,3-1 ng/mL	Chen vd., 012
MBzP, MEP, MnBP, MEHP, MEHHP, MEOHP ve MiBP	İdrar	UPLCMS/MS Kolon: Kinetex Phenyl-Hexyl (2,1 × 100 mm, 1,7 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C 24 saat + SPE 130 mg/10 mL Ticari Bond Elut Certify LRC kartuşu	Asetonitril	GS: 0,13-0,37 ng/mL TS: 0,43-1,23 ng/mL	Dewalque vd., 2014
Mono(3-karboksipropil) fitalat (MCP), MMP, MEP, Monoizopropil fitalat (MiPP), MiBP, MnBP, MEHHP, MECPP, MEOHP, MCMHP, MBzP, MCyHP, Mono-n-pentil fitalat (MnPP), MEHP, MnOP, MiNP ve MiDP	İdrar	HPLC-MS/MS Kolon: Kinetex Phenyl-Hexyl (2,1 x 150 mm, 2,6 µm)	Hidroliz β-Glukuronidaz, 37°C 2 saat + SPE 60 mg/3 mL Ticari Oasis HLB kartuşu	Asetonitril ve etil asetat	GS: 0,03-1,4 ng/mL TS: -	Feng vd., 2015

Çizelge 2.4. Literatürde idrarda fitalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan çalışmalar (Devamı)

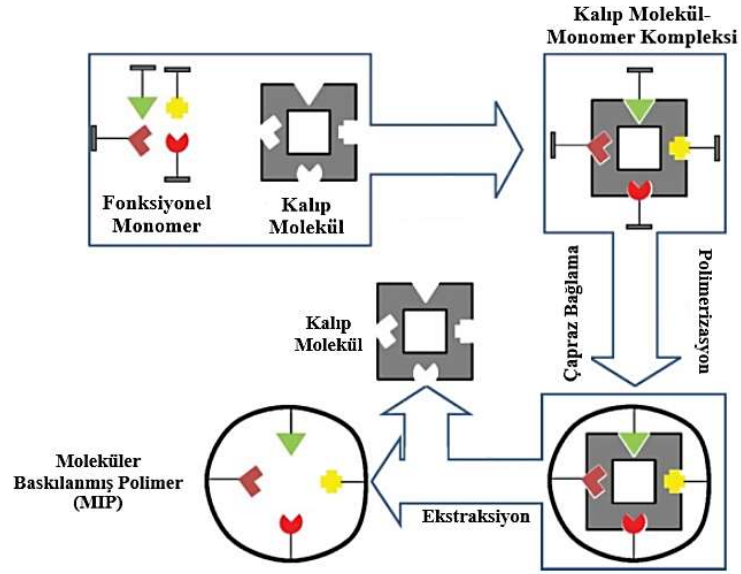
MnBP, MiBP, MBzP ve MEHP	İdrar	UPLC-MS/MS Kolon: Waters Acquity UPLC BEH Phenyl (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C, 2 saat + SPE 60 mg/ 3 mL Ticari ABS ELUT-Nexus kartuşu	Asetonitril ve metanol	GS: 0,3 ng/mL TS: 1 ng/mL	Peng vd., 2016
MnMP, MEP, MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEOHP, MECPP, MEHHP ve MCMHP	İdrar	LC/MS/MS Kolon: AQUASIL C18 (4,6 × 150 mm)	Hidroliz β-Glukuronidaz, 37°C, 2 saat + SPE 60 mg/3 mL Ticari PLS kartuşu	Metanol	GS: 0,02-0,60 µg/L TS: -	Dong vd., 2017
MCCP, MnMP, MEP, MiPP, MiBP, MnBP, MEHHP, MECPP, MEOHP, MCMHP, MCyHP, MPP, MEHP, MnOP, MiNP, MiDP ve Monometil izofitalat (MMiP)	İdrar	HPLC-MS/MS Kolon: Kinetex Phenyl-Hexyl (2,1 x 150 mm, 2,6 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C, 2 saat + SPE 60 mg/3 mL Ticari Oasis HLB kartuşu	Asetonitril ve etil asetat	GS: 0,02-0,15 µg/mL TS: -	Yao vd., 2018a

Çizelge 2.4. Literatürde idrarda ftalat monoester metabolitlerinin tayininde kullanılan SPE yöntemine yönelik yapılan çalışmalar (Devamı)

MEP, MEHP, MECPP, MCMHP, MEOHP ve MEHHP	İdrar	UHPLC- MS/MS Kolon: Kinetex Phenyl-Hexyl (2,1 x 150 mm, 2,6 µm)	Hidroliz β-Glukuronidaz, 37°C 24 saat + SPE 150mg/6 mL Ticari OasisMAX kartuşu	Metanol (%1 formik asit)	GS: 0,01-0,14 ng/mL TS: 0,04-0,48 ng/mL	Yao vd., 2018b
Mono(2-etilheksil) terefitalat (MEHTP), Mono(2-etil-5- hidroksiheksil) tereftalat (5-OH-MEHTP), MPHHP, MPCHP ve MPOHP	İdrar	LC-MS/MS Kolon: Phenomenex Kinetex Biphenyl (2,1 × 100 mm, 2,6 µm)	Hidroliz β-glukuronidaz, 37°C, 1,5 saat + SPE 60 mg/3 mL Ticari Oasis HLB kartuşu	Metanol	GS: 0,02-0,3 ng/mL TS: 0,05-0,9 ng/mL	Been vd., 2019
MEP, MnBP, MBzP, MEHP, MEOHP ve MEHHP	İdrar	UHPLC- MS/MS Kolon: C18 Zorbax Eclipse Plus (2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm)	Hidroliz β-Glukuronidaz, 55°C 1 saat + SPE 60 mg/3 mL Ticari Oasis HLB kartuşu	Metanol	GS: - TS: 0,3-1,25 ng/mL	Dima vd., 2020

2.4. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama, sentetik polimerlerde bir şablon için (atom, iyon, molekül, kompleks ve mikroorganizmalar) seçici tanıma bölgelerinin inşası olarak tanımlanır (Chen vd., 2016). Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) ‘‘*Molecular Imprinting Polymer*’’, doğal antijenlerden ve antikorlardan ilham alan ve ilk kez 1931'de Polyakov tarafından önerilen özel yapım reseptörlerdir (Arabi vd., 2020). Moleküler baskılanmış polimerler, bir analit (şablon) ile fonksiyonel bir monomer arasında bir kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Bir monomerin polimerizasyonu, polimer matrisine dâhil olan hedef molekülün (şablon) varlığında gerçekleşir. Proses (Şekil 2.10), şablonun, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcı ve başlatıcının porojenik bir çözücü içinde çözülmesiyle başlar. Kararlı bir şablon-monomer kompleksinin oluşumu, moleküler tanımanın başarısı için temel olduğundan, fonksiyonel monomerler şablon molekül ile etkileşime girecek şekilde seçilir. Monomerler, şablonun etrafında uzamsal olarak konumlandırılır ve konum, çapraz bağlanan monomerlerle kopolimerizasyon yoluyla sabitlenir. Elde edilen polimer, şablonunkini tamamlayan üç boyutlu bir yapıya sahip mikro boşluklara sahip makro gözenekli bir matristir. Böylece şablon moleküller ekstraksiyon veya kimyasal reaksiyonlar yoluyla yıkanarak polimerden uzaklaştırılmasıyla, şablona şekil, boyut ve kimyasal işlevsellik açısından tamamlayıcı olan bağlanma bölgeleri meydana getirilir. Sonuç olarak, ortaya çıkan polimer, kalıp molekülleri seçici bir şekilde tanır ve bağlar. Bağlanma yerleri, polimerizasyon sırasında kurulan etkileşimlere bağlı olarak farklı özellikler gösterir. Bunlar, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler ve π - π etkileşimleri olabilmektedir (Vasapollo vd., 2011; Hu vd., 2021).



Şekil 2.10. Moleküler baskılama prosesi (Płotka-Wasyłka vd., 2017)

MIP'ler, hedef moleküller için özel tanıma bölgelerine sahip özel yapım yapay antikolar ve reseptörler sınıfıdır. MIP'ler, "kovalent", "kovalent olmayan" ve "yarı kovalent" yaklaşımlar olmak üzere üç farklı baskılama yöntemi kullanılarak sentezlenebilir (Ansari ve Karimi, 2017; Maciel vd., 2019).

1. *Kovalent baskılamada*, polimerizasyon işleminden önce şablon ve fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlar oluşturulur. Sentezden sonra şablonun polimer matriksinden çıkarılması adımı kovalent bağların bölünmesini/kırılması meydana gelir. Bu sentez yolunun avantajlarından biri, bağlanma yerlerinin homojen bir şekilde dağılmasıdır ve bir dezavantajı ise bu tür sentezlerde kullanılabilecek çok sayıda fonksiyonel monomer türü olmamasıdır (Ansari ve Karimi, 2017; Maciel vd., 2019).

2. *Kovalent olmayan baskılamada*, şablon, uygun bir fonksiyonel monomer(ler) ile uygun bir porojen çözücü içinde karıştırılır. Şablon moleküller, sentezlenen polimer matriksinden bir yıkama çözücüsü veya bir çözücü karışımı ile ayrılır. Ardından, şablonun yeniden bağlanma işlemi kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleştirilir. Sentez sırasındaki nispeten basit uygulaması ve kompleksleştirme adımı nedeniyle en yaygın kullanılan baskılama yöntemidir (Ansari ve Karimi, 2017; Maciel vd., 2019).

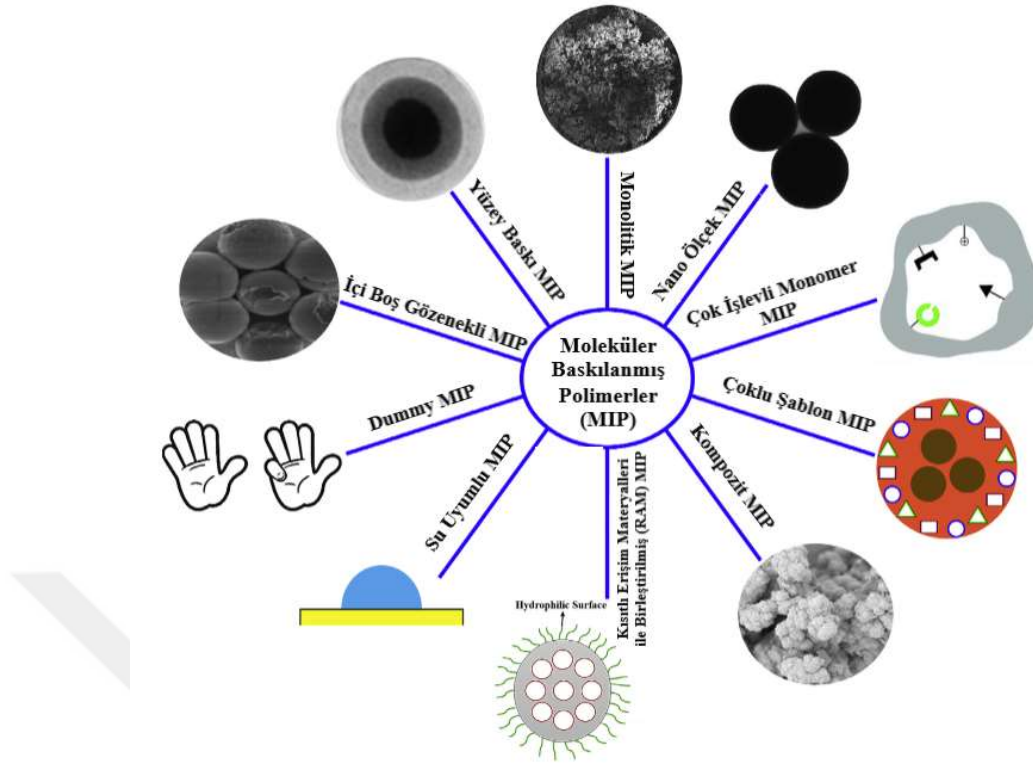
3. *Yarı kovalent baskılama*, önceki iki yöntemin bir karışımıdır. Bu nedenle, polimerizasyondan önce, şablon ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler

kovalent bağlarla kurulur ve şablonun polimer matriksinden çıkarılması adımından sonra, analitin MIP'ye yeniden bağlanması için kovalent olmayan etkileşimlerden yararlanır (Ansari ve Karimi, 2017; Maciel vd., 2019).

MIP'ler çeşitli polimerizasyon teknikleri kullanılarak hazırlanabilmektedirler. Bunlar; yığın polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu, iki aşamalı veya çok aşamalı şişme polimerizasyonu, çökeltme polimerizasyonu, yüzey polimerizasyonu ve yerinde polimerizasyondur (Yan ve Row, 2006).

MIP'lerin ana avantajı; baskılama prosedüründe kullanılan hedef molekül için yüksek afinite sağlamasıdır. Moleküler baskılanmış polimerler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik sistemlere kıyasla daha yüksek fiziksel sağlamlığa, kuvvete, yüksek sıcaklık ve basınca karşı dirence ve asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı inertliğe sahiptirler. Ek olarak, önemli ölçüde tekrar kullanılabilirlik, hazırlama kolaylığı, düşük maliyet ve polimerlerin uzun depolama ömürleri diğer avantajlar arasında yer almaktadır (Vasapollo vd., 2011; Arabi vd., 2020).

MIP'ler; numune ön işleme, ayırma (örn. SPE), saflaştırma, sensörler veya biyosensörler, kemo/biyoalgılama, kataliz, yapay antikorlar ve ilaç salımı gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar (Vasapollo vd., 2011; Chen vd., 2016). Özellikle MIP'ler SPE prosedürleri için yeni seçici sorbentler olarak tercih edilmektedir ve MISPE olarak adlandırılmaktadırlar. MIP'nin SPE için seçici sorbent olarak uygulanması ilk olarak 1994 yılında Sellergren tarafından önerilmiştir (Sellergren, 1994). MIP'ler, sadece numunelerin zenginleştirilmesine ve temizlenmesine değil, aynı zamanda karmaşık matrikslerden hedef analitlerin seçici ekstraksiyonuna da izin verirler (Vasapollo vd., 2011). MISPE sorbentlerin, kartuşlar, diskler, pipet ucu SPE, 96 oyuklu SPE plakaları ve çevrimiçi ön kartuşlar gibi çeşitli biçimleri mevcuttur. Ayrıca SPE temelli olan monolitik, nano ölçek, kompozit, yüzey baskı, içi boş gözenekli, yapısal analog (Dummy), çok işlevli monomer, çoklu şablon, su uyumlu ve kısıtlı erişim materyalleri ile birleştirilmiş (RAM) MIP'ler olmak üzere yeni baskılama stratejileri bulunmaktadır (Şekil 2.11) (Arabi vd., 2020).



Şekil 2.11. SPE temelli yeni baskılama stratejileri (Arabi vd., 2020)

Literatürde moleküler baskılama yöntemi kullanılarak idrardaki fitalat monoester metabolitlerinin tayinine yönelik çalışmalar kısıtlıdır. Li ve diğerleri (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, insan idrar örneklerinden beş fitalat monoesterinin (MMP, monohegzil fitalat (MHP), MEP, MnBP, MBzP ve MEHP) ekstraksiyonu için manyetik dummy (MD) moleküler baskılanmış polimer nanopartiküllere (MD-MIP'ler) dayalı basit ve etkili bir dağıtıcı katı faz mikro ekstraksiyon (DSPME) yöntemi geliştirilmiştir. Moleküler baskılama işleminde şablon molekül olarak MHP kullanılmıştır. Manyetik moleküler baskılanmış polimerler sol-jel reaksiyonu ve yüzey moleküler baskılama yöntemi ile sentezlenmiş ve transmisyon elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, X-ışını kırınımı, termogravimetrik analiz ve titreşimli numune manyetometrisi ile karakterize edilmiştir. İnsan idrar örnekleri üç sağlıklı gönüllü tarafından sağlanmış ve önce santrifüjlenmiştir. Daha sonra örnekler pH'ı 1'e ayarlanmış ve 20 mL idrar örneğine 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MD-MIP}$ ilave edilerek 1 saat çalkalanmıştır. Daha sonra, polimerler numunelerden mıknatıs kullanılarak ayrılmış ve adsorbe edilmiş fitalat monoesterlerinin elüsyonu için 2 mL metanol-asetik asit ($v/v = 9:1$) çözeltisi ile ultrasonik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

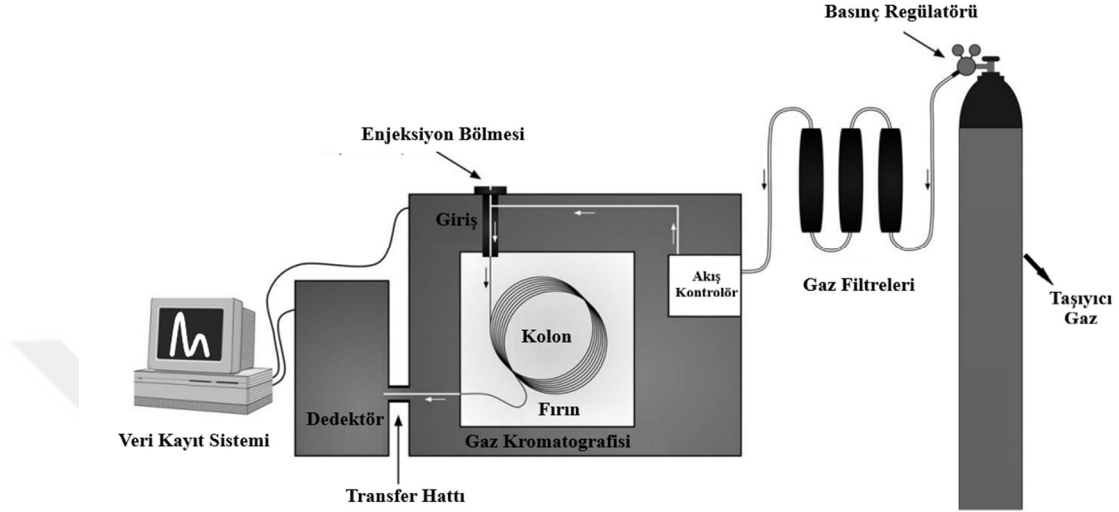
Elüsyon çözeltisi daha sonra N₂ atmosferi altında 50 °C'de kurutulmuş, ardından 0,2 mL metanol eklenerek HPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, burada hazırlanan Manyetik moleküler baskılanmış polimerler yüksek seçicilik, iyi adsorpsiyon kapasitesi (124,5 mg/g), mükemmel yeniden kullanılabilirlik (beş sorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda) ve hızlı adsorpsiyon süresi (yaklaşık 30 dakika) gösterdiği bulunmuştur. Monoester fitalatların ekstraksiyon etkinliği, idrar numunelere bilinen üç farklı derişimde monofitalat standardı (2, 10 ve 50 mg/L) eklenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu yöntem MMP, MEP ve MnBP için 1-100 mg/L aralığında, MBzP için 1-80 mg/L aralığında ve MEHP için 1-50 mg/L aralığında iyi bir doğrusallık göstermiştir. Ayrıca, beş fitalat monoesterinin tümünde iyi bir geri kazanım (%80,0-%101,0) ve bağıl standart sapma (%0,6-6,6) sağladığı görülmüştür.

2.5. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi (GC) tekniğı, 1952'de James ve Martin tarafından tanıtıldı (James ve Martin, 1952). GC, karmaşık örneklerdeki uçucu bileşenleri, kaynama noktası/buhar basıncı ve polarite farklılıklarına dayalı olarak ayırabilen bir ayırma tekniğidir. Gaz kromatografisi, hareketli faz olarak inert bir gaz ve sabit faz olarak katı destek üzerine emdirilmiş sıvı veya katı bir adsorbanın kullanıldığı özel bir kromatografi türüdür (Stauffer vd., 2008). GC, hızlı, hassas, güvenilir, verimliliğı yüksek, düşük örnek miktarı gerektiren, nispeten basit ve düşük maliyetli olma gibi birçok avantaja sahip bir yöntemdir (McNair vd., 2019).

Gaz kromatografisinin temel bileşenleri Şekil 2.12'de verilmektedir (Stauffer vd., 2008). Bu bileşenler: taşıyıcı gaz, numune girişi (enjeksiyon bölmesi), kolon, fırın, dedektör ve veri kayıt sistemidir. GC'nin temel çalışma prensibi, bir numune ısıtılmış bir giriş (inlet) olan enjeksiyon portunda buharlaştırılarak sisteme verilir. Hareketli faz olan taşıyıcı gaz girişten geçerek numuneyi sabit fazın bulunduğu kolona sürükler. Kolon, sıcaklık kontrollünün olduğu bir fırın içinde yer alır. Kromatografik ayırma, numune karışımı kolondan sürüklenirken gerçekleşir. Ayrılan bileşenler kolondan çıktıktan sonra analit miktarıyla orantılı bir elektronik sinyal sağlayan dedektöre ulaşırlar ve böylece ayırma tamamlanmış olur (Stauffer vd., 2008). Sadece bozulmadan buharlaşabilen bileşikler GC analizi için uygunlardır. Çözücüler, pestisitler, uçucu yağlar, hidrokarbon yakıtlar ve birçok ilaç GC'de analiz edilebilirler. Fakat, asitler,

amino asitler, aminler, amidler, uçucu olmayan ilaçlar, sakkaritler ve steroidlerin, GC’de tayini için uçuculukları yetersizdir ve bu tür birleşikler uçuculuklarını artırmak için türevlendirilerek analiz edilmesi gerekmektedir (Sparkman vd., 2011).



Şekil 2.12. GC’nin temel bileşenleri (Stauffer vd., 2008)

2.5.1. GC’nin temel bileşenleri

Taşıyıcı gaz

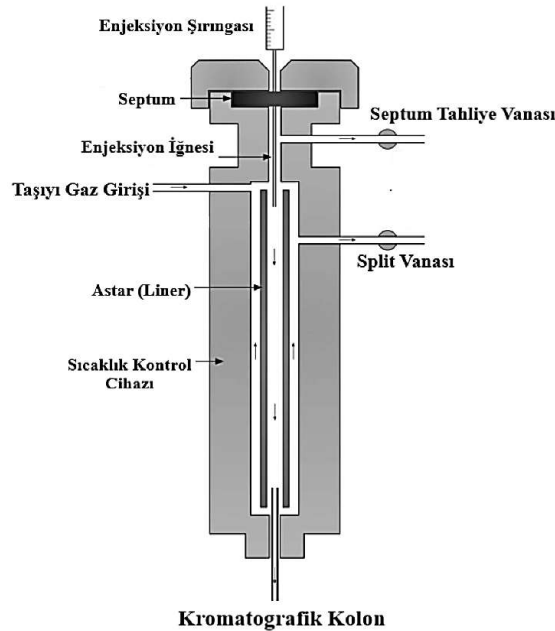
Bir GC sistemindeki hareketli faz, taşıyıcı gaz olarak adlandırılır. Taşıyıcı gaz inerttir ve analitlerle etkileşime girmez. Taşıyıcı gazın temel amacı, numuneyi kolon boyunca taşımaktır. Gaz kromatografisi için en yaygın kullanılan taşıyıcı gazlar helyum (He), hidrojen (H₂) ve azottur (N₂). Bir taşıyıcı gaz, saflık derecesine ve kullanılan dedektörün türüne bağlı olarak seçilmektedir. Çeşitli dedektörler için tercih edilen taşıyıcı gazlar Çizelge 2.5’te verilmektedir. Taşıyıcı gazda, su ve oksijen en yaygın ve en zararlı kirleticilerden bazılarıdır. Bir taşıyıcı gazdaki mevcudiyetleri, yüksek zemin çizgisine, sahte piklere ve pahalı kromatografik kolonların bozulmasına neden olabilmektedir. Gaz temizleyiciler veya filtreler kullanılarak kirletici maddeler giderilebilir ve gazın saflığı artırılabilir. Genellikle kullanılan temizleyiciler; nem tutucu, hidrokarbon tutucu ve oksijen tutucudan oluşmaktadır (Stauffer vd., 2008; McNair vd., 2019).

Çizelge 2.5. Çeşitli dedektörler için tercih edilen taşıyıcı gazlar (McNair vd., 2019)

Dedektör	Taşıyıcı Gaz
Termal İletkenlik	Helyum
Alev İyonlaşma	Helyum veya Azot
Elektron Yakalama	Kuru Azot (Oksijensiz)

Enjektör (İnlet)

Enjeksiyon bölgesi (Şekil 2.13), numuneyi veya numune çözeltisinin kolona verilmesini sağlar. Gaz fazındaki numuneler gaz sızdırmaz şırıngalar ve gaz örnekleme valfleri kullanılarak, sıvı fazdaki numuneler ise mikrolitre hacimli şırıngalar yardımıyla, katı haldeki numuneler de uygun çözücülerle çözülerek mikroişırıngalar ile GC sistemine enjekte edilirler. Kullanılan şırınga boyutları 1, 5 ve 10 μL arasında değişmektedir. Numuneler manuel ve oto örnekleyciler ile sisteme enjekte edilmektedirler. Farklı kolon türleri için, split (Bölmeli), splitless (Bölmesiz) ve on-column olmak üzere farklı numune giriş sistemleri mevcuttur (McNair vd., 2019).



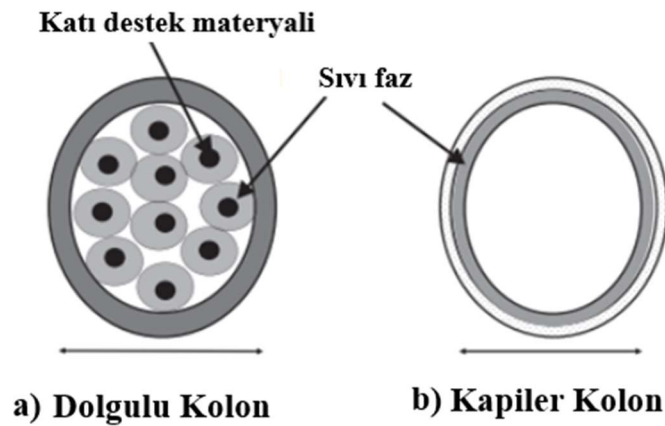
Şekil 2.13. Enjeksiyon bölgesi (Stauffer vd., 2008)

Split Enjeksiyon: Enjeksiyon bölmesinde buharlaştırılan numunenin yalnızca bir kısmı (genellikle %1-2'si) kolona gönderilir ve geri kalan kısmı taşıyıcı gazla bir tahliye valfinden sistemden atılır (McNair vd., 2019). Genel olarak split oranları 10:1 ile 400:1 arasındadır. Bu yöntem, kolonun aşırı yüklenmesini önleyerek, hızlı enjeksiyon ve nispeten yüksek derişimdeki numunelerin seyreltilmeden analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Sparkman vd., 2011; Karasek ve Clement, 2012).

Splitless Enjeksiyon: Split enjeksiyon ile aynı enstrümantasyon kullanılır. Splitless enjeksiyonda enjeksiyon tahliye valfi kapalıdır, buharlaştırılmış numunenin tümü kolona verilir. Splitless enjeksiyon, tespit limitlerini iyileştirmenin en yaygın yoludur ve eser miktar analizi için en yaygın kullanılan tekniktir (Grob ve Barry, 2004).

Kolon

Kolon, GC'nin kalbi olarak görölmektedir. Enjekte edilen numunene taşıyıcı gaz (hareketli faz) tarafından kolona taşınır. Sabit faz tarafından analitlerin seçici olarak alıkonulmasıyla kolonda ayırma gerçekleşir (Sparkman vd., 2011). GC'de dolgulu ve kapiler olmak üzere iki tür kolon kullanılmaktadır (Şekil 2.14). Dalgulu kolonlar; katı destek üzerine kaplanmış sıvı fazla veya katı adsorbanla doldurulmuş paslanmaz çelikten yapılmış tüplerdir. Kapiler kolonlar ise, erimiş silika borunun iç duvarının ince bir sıvı faz ile kaplanmasıyla elde edilen tüplerdir (McNair vd., 2019). Dalgulu ve kapiler kolonun karşılaştırılması Çizelge 2.6' da verilmektedir.



Şekil 2.14. GC'de kullanılan kolon türleri (McNair vd., 2019)

Çizelge 2.6. Dolgulu ve kapiler kolonun karşılaştırılması (McNair vd., 2019)

	Dolgulu Kolon	Kapiler Kolon
Dış çap	3,2 mm	0,40 mm
İç çap	2,2 mm	0,25 mm
Kolon uzunluğu	1 – 2 m	15 – 60 m
Akış	20 mL/dk	1 mL/dk
Film kalınlığı	5 µm	0,25 µm
Faz hacim oranı	15-30	250
Plaka sayısı	4000	180,000
Plaka yüksekliği	0,5 mm	0,3 mm
Avantajlar	Daha düşük maliyet Yapması daha kolay Kullanımı daha kolay Büyük örnek miktarı	Daha yüksek verimlilik Daha hızlı Daha kararlı Daha az kolon gerekli Karmaşık karışımlar için daha iyi

Kolon Fırını

GC kolonu, sıcaklık programlama yeteneğine sahip bir fırın içinde yer almaktadır. Fırının sıcaklığı, analiz boyunca sabit (izotermal analiz) tutulabilir ya da bir sıcaklık programı aracılığıyla tam veya kademeli olarak artırılabilir. Fırının sıcaklığı değiştirilerek, karmaşık numunelerin kolay bir şekilde ayrılması sağlanır (Stauffer vd., 2008).

Dedektör

Bir GC dedektörünün rolü, kolondan çıkan türlere yanıt olarak, ölçülebilir bir elektronik sinyal üretmektir. GC uygulamaları için çeşitli dedektörler mevcuttur. Bazı dedektörler yalnızca belirli kimyasal bileşik türlerine duyarlıdır, diğerleri ise hemen hemen her şeyi algılayabildikleri için “evrensel” olarak kabul edilir. Dedektörler ayrıca algılama limitlerinde de değişiklik gösterir. Dedektör ne kadar seçici olursa hassasiyeti de o

kadar yüksek olur (Stauffer vd., 2008). Çizelge 2.7’de GC ile kullanılan en yaygın dedektörlerin listesi verilmektedir.

Çizelge 2.7. GC ile kullanılan en yaygın dedektörler (Stauffer vd., 2008)

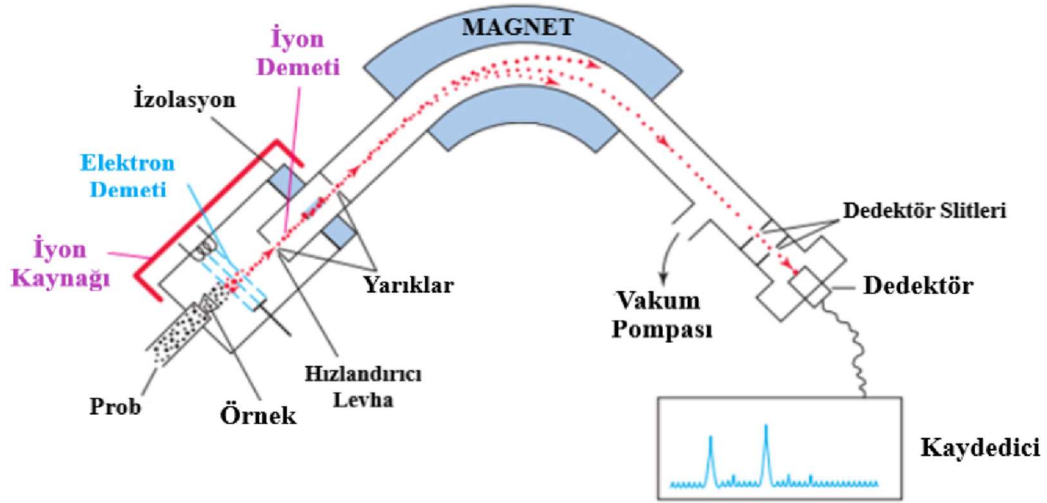
Dedektör	Seçicilik	Duyarlılık	Lineer aralık	Derişim veya kütle duyarlılığı
Alev İyonizasyon	Çoğu organik bileşik	10-100 pg	10^7	Kütle
Elektron-yakalama	Halojenürler, nitratlar, nitriller, peroksitler, anhidritler, organometalikler	50 fg	10^5	Derişim
Termal iletkenlik	Evrensel	1 ng	10^7	Derişim
Alev fotometrik	S, P, Sn, B, As, Ge, Se, Cr	100 pg	10^3	Kütle
Azot-fosfor	N, P	10 pg	10^6	Kütle
Foto-iyonizasyon	Aromatik, ketonlar, esterler, aldehitler, aminler, heterosiklller, organosülfür, bazı organometalikler	2 pg	10^7	Derişim
Kütle spektrometre	Evrensel Seçici	1 ng (SCAN) 1 pg (SIM)	10^3 10^3	Kütle

Veri kayıt sistemi

Veri kayıt sistemi; analiz sonucu üretilmiş olan verilerin kaydedilmesi, verilerin analiz edilmesi ve depolanması için kullanılmaktadır.

2.6. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi (MS), gaz fazındaki örneklerin yüksek vakum altında iyonlaştırılması ve iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.15). Ayrılan iyonların m/z değerlerine karşı bağıl bolluklarını gösteren grafiğe kütle spektrumu denir (Karasek ve Clement, 2012). Kütle spektroskopisi, hem bilinmeyen bileşiklerin (yapı, elemental bileşim ve moleküler ağırlık) nitel tanımlanması ve hem de bunların nicel tayini için veri sağlayan güçlü bir tekniktir (McNair vd., 2019).



Şekil 2.15. Kütle spektrometresi (MS) (Wade Jr, 2013)

Analit molekülleri, uygun manyetik veya elektrik alan tarafından çekilmesi (veya püskürtülmesi) için önce iyonlaştırılmalıdır. Elektron iyonizasyon (EI), kimyasal iyonizasyon, negatif kimyasal iyonizasyon, matriks yardımcı lazer desorpsiyonu/iyonlaştırma, elektrosprey iyonlaştırma ve hızlı atom bombardımanı olmak üzere çok sayıda iyonizasyon tekniği vardır. Ancak EI en eski, en basit ve en yaygın olarak kullanılan tekniktir. EI, genellikle yüksek enerjili bir elektron demetinin etkisiyle gerçekleşmektedir (McNair vd., 2019).

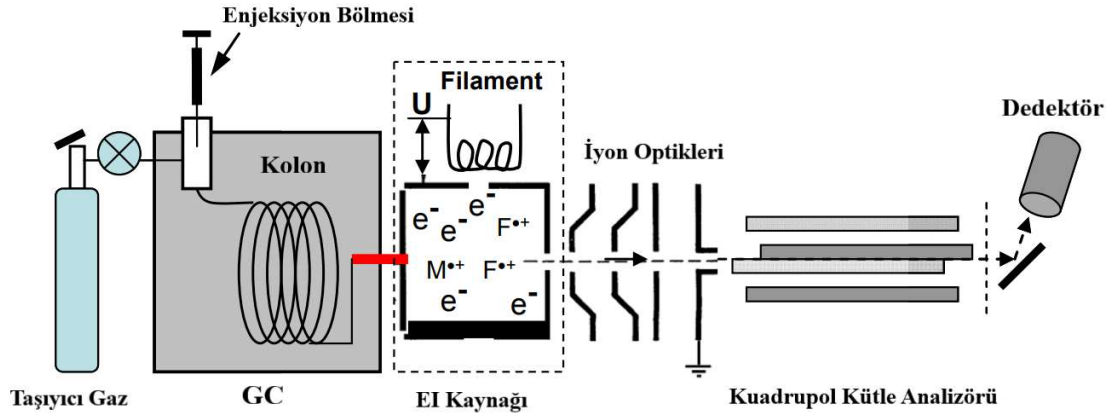
İyonizasyondan sonra, yüklü parçacıklar (iyonlar), yüklü lensler tarafından kütle analizörüne geçerler. Burada iyonik türler, manyetik veya elektriksel alan ile m/z oranlarına göre ayrılırlar. Kullanılan kütle analizörleri; kuadropol, iyon tuzağı, uçuş

zamanlı, tek/çift odaklama ve manyetik sektörlü olmak üzere farklı türlerdedir. Kuadropol analizörü, basitliği, boyutu, maliyeti ve hızlı tarama gücü gibi birçok avantajından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (McNair vd., 2019).

Analizörlerde ayrılan iyonlar, sayılması ve bir kütle spektrumunun oluşturulması için dedektöre gönderilir. Tüm MS sistemleri yüksek vakum altında çalışmaktadır, çünkü iyonların, moleküllerin veya yüzeylerle çarpışma yoluyla yük kaybının önlenmesi için temel bir gerekliliktir (McNair vd., 2019).

2.7. Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi (GC-MS)

Gaz kromatografisi ve bir kütle spektrometresinin birleştirilmesiyle (GC-MS) oluşan bir sistemdir (Şekil 2.16). GC kullanılarak kimyasal karışımlar bileşenlerine ayrılır ve MS dedektörü kullanarak ayrılan bileşenler moleküler seviyede tanımlanır ve ölçülür. Ayırma, GC kapiler kolonunda buharlaştırılmış analitlerin inert ısıtılmış helyum tarafından taşınmasıyla gerçekleşir. Karışımda bulunan farklı türdeki moleküllerin kolon boyunca hareketi süresince, kaynama noktaları ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklar sayesinde ayrılmaları sağlanır. Ayrılan maddeler kolondan çıktıkça, bir ara yüzey yoluyla MS'e aktarılırlar. Bu işlemi elektron iyonizasyon (EI) takip eder. GC-MS'de çeşitli iyonizasyon teknikleri kullanılmaktadır, ancak EI hem moleküler hem de fragman iyonların üretilmesini sağlar. İyonlarına ayrılan bileşenler, kuadropol kütle analizörü ile her bir analitten üretilen iyonların kütle-yük oranları saptanır. Bir analitten gelen tüm iyonlar (moleküler iyonlar veya fragman iyonları), bu analit için benzersiz olan bir parmak izi kütle spektrumunu oluşturur. Standart bir koşul altında elde edilen ve birkaç yüz bin bileşiği kapsayan, bilinen kütle spektrumlarının bir "kütüphanesi" bir bilgisayarda depolanır. Çoğunlukla bir veritabanı araması, bilinmeyen bir bileşeni GC-MS'de hızlı bir şekilde tanımlayabilir. Kütle spektrometresi, enstrümantal analitik kimyada güçlü bir araçtır, çünkü bir maddenin bileşimi ve yapısı hakkında diğer tüm analitik tekniklerden daha fazla bilgi sağlar ve mevcut tüm GC tespit teknikleri arasında tek kesin analitik dedektör olarak kabul edilmektedir (Mohd, 2012).



Şekil 2.16. Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi (GC-MS) (Mohd, 2012)

GC-MS, günümüzde çevresel numunelerdeki uçucu organik kirleticilerin analizi için en yaygın olarak kullanılan tekniktir. GC-MS; hava, atmosferik aerosoller, su, toprak, çamur, biyolojik numuneler ve diğerleri gibi farklı kaynaklı numunelerdeki önemli sayıda kirleticinin analizinde uygulanan bir tekniktir. En yaygın olarak analiz edilen bileşikler arasında alkanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, su dezenfeksiyon yan ürünleri, poliklorlu bifeniller, poliklorlu dibenzo-p-dioksinler, furanlar ve endokrin bozucu kimyasallar olan fitalatlar ve kısa etoksi alkilfenol etoksilatlar gibi bileşikler yer alır. Yukarıda belirtilen bileşiklere ek olarak, türevlendirmeden sonra polar ve termal olarak stabil olmayan bileşiklerin analizinde de GC-MS kullanılmaktadır. Türevlendirme ile analit, daha kararlı ve gelişmiş pik şekli gibi üstün kromatografik özelliklere sahip bir ürüne dönüştürülür. Ayrıca, MS'de türevlendirme, gelişmiş iyonizasyon verimliliği, gelişmiş yanıt ve eklenen organik grupla ilgili parçalanma modellerinin üretilmesiyle sonuçlanabilmekte, bu da bileşik ailelerinin tanımlanmasına yardımcı olabilmektedir (Santos ve Galceran, 2003).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS)

Fitalat monoesterlerinin belirlenmesinde Agilent 7890A model Gaz Kromatografisi ve 5975C model Kütle Spektrometresi kullanıldı. Cihaza Agilent 7693 model oto örnekleyici ile splitless modda otomatik enjeksiyon yapıldı. Ayırmada kullanılan kolon (30 m uzunluk, 0,25 mm çap) HP-5MS'dir. Cihazda kullanılan fırın programı; 100 °C, 1 dk boyunca, 30 °C/dk artış hızı ile 180 °C'ye ısınma, 180 °C'de 1 dk bekleme, 10 °C/dk artış hızı ile 280 °C'ye ısınma şeklindedir. Enjeksiyon hacmi 1 µL, enjektör sıcaklığı 280 °C ve dedektör sıcaklığı 230 °C'dir. Taşıyıcı gaz (helyum) akışı 1 mL/dk'dır. Selektif iyon modunda çalışıldı. Çizelge 3.1'de hedef analitlere ait alıkonma zamanları ve selektif iyon modundaki m/z değerleri verilmektedir.

Çizelge 3.1. Analitlere ait alıkonma zamanları ve selektif iyon modundaki m/z değerleri

İsim	Alıkonma Zamanı (tr)	m/z
Monoetil fitalat (MEP)	6,419	74,9; 75; 102,9; 103; 118,9; 119; 148,9; 162,9; 163; 176,9; 177; 222,9; 223; 251; 266; 266,1
Benzil benzoat (İS)	7,515	76,9; 77; 90,90; 91; 104,90; 193,90; 194; 211,90; 212
Mono-n-bütil fitalat (MnBP)	7,942	73; 74,9; 75; 103; 103,1; 118,9; 119; 148,9; 162,9; 220,9; 222,9; 239; 278,9; 279
Monoetil heksil fitalat (MEHP)	10,560	73; 148,90; 162,9; 178,9; 179; 220,9; 221; 222,90; 238,9; 239

3.1.2. UV-GB spektrofotometresi

Ultraviyole-görünür bölge (UV-GB) spektroskopisi ile moleküllerdeki elektronik geçişlerin oluşturduğu spektrumlar incelenmektedir. Kalıp molekül olan DEP'in mikrokürelerden tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığının takibi için Shimadzu UV-1700 UV-GB spektrofotometresi kullanıldı. DEP'in absorbans takibi 239 nm dalga boyunda kuartz (Hellma 100-QS, ışık yolu 10 mm) küvetler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.3. Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrometresi

FTIR, maddelerin kimyasal karakterizasyonunda, moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasını sağlayan spektrofotometrik bir yöntemdir. Sentezlenen mikrokürelerin kimyasal yapısının karakterizasyonu, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarları'nda bulunan Perkin Elmer, Spectrum 100 marka FTIR cihazı ile gerçekleştirildi.

3.1.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yapı morfolojisi için kullanılan çok yönlü bir görüntüleme tekniğidir. Elde edilen mikrokürelerin yüzey morfolojisi, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu (CARL ZEISS EVO 40 model) ile incelendi. Cihazın çözünürlüğü 3,0 nm 30 kV (SE), 4,5 nm 30 kV (BSD), voltajı 0,2-30 kV, büyütmesi 7-1000000 x, görüntü ise 3072 x 2304 piksel, TIFF, JPEG olarak verildi.

3.1.5 BET analizi

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin, Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvar bünyesinde bulunan ASAP2000 cihazı (Micromeritics) ile gerçekleştirildi.

3.1.6. X ışını fotoelektron spektrometresi (XPS)

Katı maddeleri uyaran bir x-ışın demeti kullanarak fotoelektronların saçılmasıyla maddelerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek için kullanılan gelişmiş bir yüzey analiz tekniğidir. XPS ile yüzey element dağılımının tayini ODTÜ Merkez Laboratuvar bünyesinde bulunan PHI 5000 VersaProbe marka cihaz ile yapıldı.

3.1.7. Karıştırıcı ve ısıtıcılar

Sentetik idrarın hazırlanma sürecindeki karıştırma ve ısıtma işlemleri Ika-Werke (RT-15 power) marka çoklu (15'li) manyetik ısıtıcı-karıştırıcı ile gerçekleştirildi.

3.1.8. Ultrasonik banyo

Sentetik idrarın homojenizasyon işlemleri Wise Clean Ultrasonic WUCA03H model ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirildi (Germany).

3.1.9. pH metre

pH ayarlamaları için kombine cam elektroda sahip olan Hanna Instruments pH 211 marka pH metre kullanıldı.

3.1.10. Terazi

Kütle ölçümleri için $0,0000 \text{ g} \pm 0,0001$ hassasiyetinde ölçüm yapabilen Radwag (AS/220/C/2 model) marka analitik terazi kullanıldı.

3.1.11. Saf su cihazı

Deneyisel işlemler sırasında kullanılan saf su temini, ELGA PURELAB flex marka ultra saf su cihazından sağlandı.

3.1.12. Vakum manifold ve pompası

SPE adımı basıncı kontrolü, akış hızı, kartuşa numune yükleme, koşullandırma, yıkama ve elüsyon adımlarının kolayca kontrolü için Agilent VacElut 20 Manifold ve vakum pompası kullanıldı.

3.1.13. Etüv

Deney sırasındaki kurutma ve inkübasyon işlemleri için Binder Redline 53 model etüv kullanıldı.

3.1.14. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
L-triptofan metilester hidroklorür (C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ .HCl)	Aldrich	364517
Metakriloil klorür (C ₄ H ₅ ClO)	Fluka	64120
Hidrokinon (C ₆ H ₄ (OH) ₂)	Merck	8.22333
Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	Merck	8.18847
N,N'-azobisisobütironitril (AIBN)	Merck	8.01595
Polivinil alkol (PVA)	Aldrich	341564
Trietilenamin (C ₆ H ₁₅ N)	AcrosOrganics	157910010
Dietil fitalat (C ₁₂ H ₁₄ O ₄)	Merck	8.22323
Monoetil fitalat (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)	AccuStandard	ALR-137S-CN
Mono-n-bütül fitalat (C ₁₂ H ₁₄ O ₄)	AccuStandard	ALR-135S-CN
Monohegzil fitalat (C ₁₄ H ₁₈ O ₄)	AccuStandard	ALR-138S-CN
Benzil benzoat (C ₁₄ H ₁₂ O ₂)	AccuStandard	M-8061-IS
Toluen (C ₇ H ₈)	Merck	8.01595
Diklorometan (CH ₂ Cl ₂)	Merck	1.06054
Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	Merck	1.00030
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Merck	1.11727
Etil asetat (C ₄ H ₈ O ₂)	Merck	1.10972
Metanol (CH ₄ O)	Merck	1.06007
Aseton (C ₃ H ₆ O)	Merck	1.00013
n-Hekzan (C ₆ H ₁₄)	Merck	1.04367
N-metil –N-(trimetilsilil) trifloraasetamit (MSTFA)	SIGMA-ALDRICH	24589-78-4
N, O- Bis(trimetilsilil)trifloraasetamit (BSTFA)	CovaChem	12102

3.1.14. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler (Devamı)

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Ürik asit (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃)	SIGMA-ALDRICH	69-93-2
β-Glukuronidaz (Escherichia Coli'den)	SIGMA	G7646-25KU
Kreatinin (C ₄ H ₇ N ₃ O)	Riedel-de Haën	15705
Sodyum fosfat dibazik dihidrat (Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O)	SIGMA-ALDRICH	04272
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O)	Merck	1.06345
Potasyum klorür (KCl)	AnalaR NORMAPUR	26764.298
tri-Sodyum sitrat dihidrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O)	ISOLAB	6132-04-3
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	1.05886
Sodyum klorür (NaCl)	AnalaR NORMAPUR	27810.295
Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)	Merck	1.06649
Üre (CH ₄ N ₂ O)	ISOLAB	57-13-6
Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	Merck	1.01145
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	SIGMA-ALDRICH	10035-04-8
Sodyum oksalat (Na ₂ C ₂ O ₄)	Merck	1.06557
Hidroklorik asit (%37) (HCl)	Merck	1.00317
Sodyum hidroksit (NaOH)	Carlo Erba	06203
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Merck	1.00056
Amonyum asetat (NH ₄ CH ₃ COO)	Merck	1.01116

MilliporeMillex HV Hidrofilik 0,45 µm'lik PVDF enjektör tipi filtre

OASIS HLB, 60 mg, 3mL, katı faz ekstraksiyon kartuşu

Ayset tek kullanımlık şırıngalar (5-10 mL'lik)

3.2.Yöntem

3.2.1. N-metakriloil-amido L-triptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi ve karakterizasyonu

Yaklaşık 5,000 g L-triptofan metil esteri ve 0,2000 g hidrokinon buz banyosunda tutulan bir reaksiyon balonunda 100 mL diklorometan çözücüsü içerisinde çözüldü. 0°C’de tutulan çözelti içerisine 17,7 mL trietilenamin yavaşça eklendi. Bu karışımın üzerine 5 mL metakriloil klorür eklendi ve buz banyosundan alınan çözelti karışımı oda sıcaklığında bir gece karıştırılması için manyetik karıştırıcıya yerleştirildi. Gerçekleştirilen kimyasal reaksiyon sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür %10’luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edildi. MATrp molekülünü içeren diklorometan fazı Na₂SO₄ içeren adi süzgeç kâğıdından süzüldü ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Kalan katı uygun miktar etanolde çözüldü. Sentezlenen MATrp monomerinin kimyasal karakterizasyonu için FTIR tekniği kullanıldı.

3.2.2. Dietil fitalat (DEP) baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin sentezi

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin sentezi için süspansiyon polimerizasyonu tekniği kullanıldı. İlk olarak tanıma bölgelerini oluşturmak için kalıp molekül (DEP) varlığında, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (çapraz bağlayıcı) ve MATrp (fonksiyonel monomer), N,N’-azobisisobütironitril (AIBN) ve polivinil alkolün sırasıyla başlatıcı ve stabilizör olduğu bir sistemde polimerleştirildi. MATrp ve DEP (kalıp molekül) oranları daha önceki çalışmada (Özer vd., 2017) optimize edilen ve fitalatlar için en seçici mikrokürelerin hazırlanması amacıyla 2:1 oranında kullanıldı. Fonksiyonel monomer (MATrp) ve kalıp molekül (DEP), 2 saat muamele edilerek ön organizasyon kompleksi hazırlandı. Sulu faz, 200 mg polivinil alkolün 50 mL saf su içerisinde çözünmesi ile hazırlandı. Ardından ön kompleks üzerine, 10 mL tolue (gözenek yapıcı), 10 mL EGDMA ve 100 mg AIBN eklenerek organik faz hazırlandı. Organik faz sulu fazda dağıtılarak 400 rpm karıştırma hızında polimerizasyon reaktöründe karıştırıldı. Reaktör polimerizasyon sıcaklığı olan 65°C’da 400 rpm karıştırma hızı ile 4 saat, 600 rpm karıştırma hızında ve 85°C’de ise 8 saat karıştırıldı. Elde edilen mikroküreler reaksiyona girmemiş MATrp ve tolueinin uzaklaştırılması için

fazla miktarda etil alkol ve su ile yıkandı ve 50°C’da etüvde kurutuldu. Yıkama işleminden sonra mikroküreler metanol:asetik asit (9:1) karışımı ile tekrar tekrar yıkanarak kalıp molekül olan DEP yapıdan tamamen uzaklaştırıldı ve böylece fitalat monoesterlerini spesifik olarak tanıyabilecek bağlanma bölgelerini içeren polimerik mikroküreler elde edildi. DEP molekülünün yapıdan tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığı 239 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümleri ile takip edildi. DEP baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler (NIP), kalıp molekül (DEP) kullanılmadan aynı yöntem ile sentezlendi.

3.2.3. Dietil fitalat (DEP) baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin karakterizasyonu

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin karakterizasyon çalışması için Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrometresi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), BET ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) analiz teknikleri kullanıldı.

3.2.3.1. FTIR analizleri

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin FTIR spekturumu ATR aparatı kullanılarak 4000-550 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedildi.

3.2.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenen DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin morfolojik karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirildi. Mikroküreler iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturuldu. Daha sonra mikrokürelerin yüzeyi vakum altında metalik altın ile kaplandı ve hazırlanan örneklerin fotoğrafları çekildi.

3.2.3.3. BET analizi

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin spesifik yüzey alanı, gözenek boyutu ve gözenek hacmi BET analizi ile belirlendi. Analiz sonuçlarıyla azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi çizildi.

3.2.3.4. XPS analizi

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküre yüzeylerinin kimyasal yapısı hakkında bilgi elde etmek için kullanıldı. XPS ile mikrokürelerin yüzeyindeki karbon, oksijen ve azot elementlerinin varlığı araştırıldı.

3.2.4. Fitalat monoester türevlendirme basamağının optimizasyonu

N-metil-N-(trimetilsilil) trifloraasetamit (MSTFA) ve N,O-Bis(trimetilsilil) trifloraasetamit (BSTFA) olmak üzere 2 farklı türevlendirici kullanıldı. Türevlendirme işlemi için, vial içerisine 20 µL 10 mg/L monoetil fitalat (MEP), mono-n-bütil fitalat (MnBP) ve mono-(2-etilheksil) fitalat (MEHP) standart karışımı ve üzerine 20 µL 10 mg/L benzil benzoat (BBz) (İç Standart (İS)) eklenerek azot atmosferinde uçuruldu. Kalıntı üzerine 50 µL türevlendirici ve 50 µL diklorometan (DCM) eklenerek, 65 °C’de 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda viallerin sıcaklıkları oda koşullarına getirildi ve GC-MS ile analiz edilerek pik alanları karşılaştırıldı.

3.2.5. Sentezlenen adsorbentler ile SPE optimizasyonu

pH etkisi

Ticari olarak satın alınan boş katı faz ekstraksiyon kartuşları (3 mL), yaklaşık 100 mg DEP baskılanmış mikroküreler ile dolduruldu. Adsorbent çıkışını önlemek için SPE kartuşlarının alt ve üst kısımları fritler ile kapatıldı. Hazırlanan katı faz kartuşlarında pH'ın adsorpsiyon üzerindeki etkisi incelendi. Hazırlanan katı faz ekstraksiyon kartuşları vakum manifold (20’li) düzeneğine yerleştirildi ve kartuşlar 3 mL aseton ve 10 mL ultra saf su ile şartlandırıldı. Farklı pH'lara ayarlanan (pH= 2, 3, 4, 5, 6 ve 7) saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve örnek vakum manifold sistemi yardımıyla kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Kartuşlar vakum altında azot (N₂) geçirilerek kurutuldu. Daha sonra 5 mL aseton, belirli bir hızda (1 mL/dk) kartuştan geçirilerek katı faza tutunan fitalat monoesterlerinin elüsyonu gerçekleştirildi. Elüe edilmiş analitlerin üzerine 20 µL 10 mg/L iç standart (BBz) eklendi ve azot atmosferinde uçuruldu. Kalıntı üzerine 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM eklenek 65 °C’de 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi ve ardından

örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için en yüksek pik alanı veren pH değeri seçildi.

Elüsyon çözücüsünün etkisi

3 mL hacimli ticari olarak satın alınan boş katı faz ekstraksiyon kartuşları yaklaşık 100 mg DEP baskılanmış mikroküreler ile dolduruldu. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü (3 mL aseton ve 10 mL ultra saf su) uygulandı. 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanan saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla örnek kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Kartuşlar vakum altında N₂ ile kurutuldu. Daha sonra farklı organik çözücüler kullanılarak katı faza tutunan fitalat monoesterlerinin elüsyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla elüent olarak hekzan, diklorometan, etil asetat, asetonitril ve aseton kullanıldı. 5 mL hacmindeki organik çözücüler belirli bir hızda (1 mL/dk) kartuştan geçirilerek elüsyon gerçekleştirildi. Elüe edilmiş analitlerin üzerine 20 µL 10 mg/L iç standart (BBz) eklendi ve azot atmosferinde uçuruldu. Türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi (50 µL MSTFA ve 50 µL DCM eklenek 65 °C'de 30 dakika) gerçekleştirildi ve ardından örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için en yüksek pik alanı veren organik çözücü seçildi.

Ticari kartuş hacminin etkisi

1 mL ve 3 mL hacimli ticari olarak satın alınan boş katı faz ekstraksiyon kartuşları yaklaşık 100 mg DEP baskılanmış mikroküreler ile dolduruldu. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma (3 mL aseton ve 10 mL ultra saf su) prosedürü uygulandı. 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanan saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla örnek kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Kartuşlar vakum altında N₂ ile kurutuldu. Daha sonra 5 mL aseton, belirli bir hızda (1 mL/dk) kartuştan geçirilerek katı faza tutunan fitalat monoesterlerinin elüsyonu gerçekleştirildi. Elüe edilmiş analitler iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme işlemleri yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için en yüksek pik alanı veren kartuş hacmi seçildi.

Adsorbent miktarının etkisi

3 mL hacimli ticari olarak satın alınan boş katı faz kartuşları, yaklaşık 10 mg, 60 mg ve 100 mg olacak şekilde farklı miktarlarda DEP baskılanmış mikroküreler ile dolduruldu. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanan saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla örnek kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Kartuşlar vakum altında N₂ ile kurutuldu. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için en yüksek pik alanı veren adsorbent miktarı seçildi.

Örnek hacminin etkisi

3 mL hacimli yaklaşık 60 mg adsorbentle doldurulmuş katı faz kartuşlarından geçirilecek örnek hacminin pik alanlarına etkisi incelendi. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. 2, 3, 5, 10 mL olmak üzere farklı hacimlerdeki pH'ı 2'ye ayarlanan saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi. Farklı hacimlerdeki örnekler vakum manifold sistemi yardımıyla kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Kartuşlar vakum altında N₂ ile kurutuldu. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için en yüksek pik alanı veren örnek hacmi miktarı seçildi.

Tuz derişiminin etkisi

3 mL hacimli yaklaşık 60 mg adsorbentle doldurulmuş katı faz kartuşlarında adsorpsiyona tuz etkisi incelendi. Bu amaçla farklı derişimlerdeki 0,01, 0,03, 0,06 ve 0,1 M potasyum klorür (KCl) çözeltileri pH'ı 2'ye ayarlanan saf su kullanılarak hazırlandı. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. Farklı derişimlerdeki 5 mL KCl çözeltilerinin içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla örnekler kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Elüsyon, iç standart ekleme, azot

atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Analiz sonucunda fitalat monoesterleri için pik alanları belirlendi ve tuz derişiminin fitalat monoester adsorpsiyonuna etkisi incelendi.

3.2.6. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması

OASIS HLB (60 mg, 3 mL) ticari kartuşu ile DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] (60 mg, 3 mL) ile doldurulmuş SPE kartuşlarının tekrar kullanılabilirliği incelendi. Kartuşlara yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü (3 mL aseton ve 10 mL ultra saf su) uygulandı. pH'ı 2'ye ayarlanmış 5 mL saf su içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla örnekler kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Bu işlem aynı kartuşla 15 kez tekrar edildi. Pik alanlarına göre ticari OASIS HLB ve DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşunun tekrar kullanılabilirliği karşılaştırıldı.

3.2.7. Sentetik idrarın hazırlanması

Sarigul ve diğerleri tarafından (2019) hazırlanan sentetik idrar modifiye edilerek hazırlandı. 0,1700 g Na_2SO_4 , 0,0250g $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$, 0,0720 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0881 g $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$, 1,500 g $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, 0,2308 g KCl, 0,1756 g NaCl, 0,0245 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1266 g NH_4Cl , 0,0028 g $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 0,1082 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2912 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,0831 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldı ve bir miktar ultra saf su ile ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü. Çözeltinin son hacmi 100 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanarak 37 °C'de bir gece boyunca manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Süre sonunda derişik HCl (%37) ile pH'ı 2'ye ayarlandı ve 0,45 µm'lik filtreler ile süzülerek saklandı.

3.2.8. Sentetik idrar matriksi için SPE şartlarının optimizasyonu

3.2.8.1. Sentetik idrar çalışmalarında kartuş yıkama prosedürünün optimizasyonu

Matriksden kaynaklanan girişimlerin kartuştan uzaklaştırılması için kartuş yıkama prosedürü optimize edildi. 3 mL hacimli yaklaşık 60 mg adsorbentle (DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)]) doldurulmuş katı faz kartuşlarına yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. 1:10 seyreltilmiş 5 mL sentetik idrar (pH=2) içerisine 20 µL 5 mg/L standart karışımı eklendi ve vakum manifold sistemi yardımıyla sentetik idrar örneği kartuştan sabit bir hızla (0,2 mL/dk) geçirildi. Daha sonra kartuşlar, 3, 5, 10 ve 20 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış suyla yıkandı. Kartuşlar vakum altında ve N₂ ile kurutuldu. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Aynı prosedür sentetik idrarın içerisine standart karışımı eklenmeden (blank) tekrar edildi. Blank ile standart karışımı eklenmiş örnek karşılaştırılarak matriks etkisinin en az olduğu yıkama prosedürü seçildi.

3.2.8.2. Sentetik idrar çalışmalarında seyreltme oranı optimizasyonu

3 mL hacimli yaklaşık 60 mg adsorbentle doldurulmuş katı faz kartuşlarına yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. Daha sonra 1:1, 1:3, 1:5 ve 1:10 olmak üzere farklı oranlarda seyreltilmiş 5 mL (pH=2) sentetik idrar içerisine 20 µL 5 mg/L standart karışımı eklendi ve örnekler vakum manifold sistemi yardımıyla kartuştan geçirildi. Bu işlemin ardından kartuşlar 20 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış suyla yıkandı. Kartuşlar vakum altında ve N₂ ile kurutuldu. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edildi. Aynı prosedür sentetik idrarın içerisine standart karışımı eklenmeden (blank) tekrar edildi. Blank ile standart karışımı eklenmiş örnek karşılaştırılarak matriks etkisinin en az olduğu seyreltme oranı seçildi.

3.2.9. DEP baskılanmış ve baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler ile baskılama seçiciliğinin karşılaştırılması

Yaklaşık 60 mg DEP baskılanmış ve DEP baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler, 3 mL hacimli katı faz kartuşlara dolduruldu. Yukarıda bahsedildiği gibi şartlandırma prosedürü uygulandı. Daha sonra 1:10 oranında seyreltilmiş 5 mL (pH=2) sentetik idrar içerisine 20 µL 10 mg/L standart karışımı eklendi ve örnekler vakum manifold sistemi yardımıyla kartuşlardan geçirildi. Bu işlemin ardından kartuşlar 20 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış suyla yıkandı. Kartuşlar vakum altında ve N₂ ile kurutuldu. Elüsyon, iç standart ekleme, azot atmosferinde uçurma ve türevlendirme prosedürü yukarıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Örnekler GC-MS ile analiz edilerek baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin baskılama seçiciliği karşılaştırıldı.

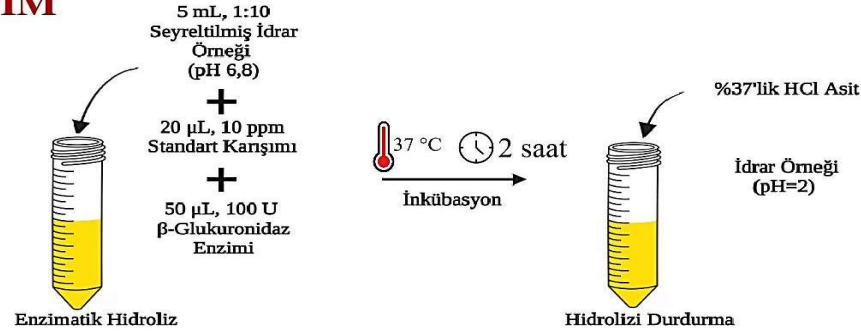
3.2.10. Optimize edilen metodun validasyonu

Optimum SPE şartları altında yapılan örnek hazırlama sonrası GC-MS ile tayin metodunun validasyonu için sentetik idrar ortamına standart ekleme ile yoluyla kalibrasyon seti hazırlandı. Sentetik idrarın (5 mL) içerisine 20 µL hacminde 1, 3, 5, 7, 10 ve 15 mg/L olmak üzere farklı derişimlerde 3 fitalat monoester standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklenerek 4-60 µg/L aralığında kalibrasyon seti oluşturuldu. Derişimine karşı 3 fitalat monoester pik alanı/iç standart (BBz) pik alanı oranları kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Oluşturulan kalibrasyon grafiklerden korelasyon katsayısının kareleri (R^2), metodun gözlenebilme ve tayin sınır değerleri belirlendi. Gözlenebilme sınırı, en düşük derişimdeki fitalat monoesterlerinin üç tekrarı ile elde edilen pik alanlarının standart sapma değerlerini doğru eğimine bölüp, üç ile çarpılmasıyla (3s/m) hesaplandı. Bununla birlikte 20 µg/L fitalat monoester karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) içeren sentetik idrarın (5 mL) gün için ve günler arası en az 5 kez katı faz ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilerek, hesaplanan derişim ve standart sapma değerlerinden tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri (% bağıl standart sapma (%BSS)) belirlendi.

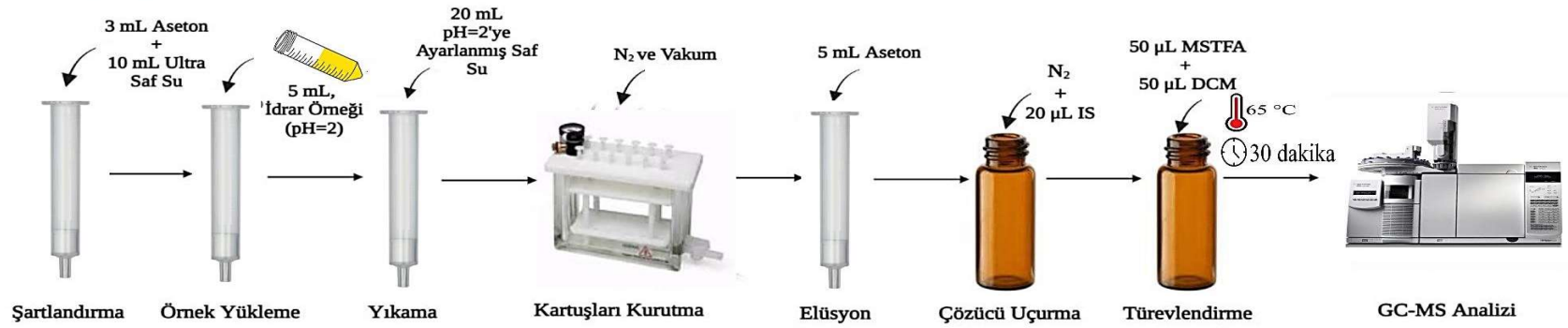
3.2.11. Metodun gerçek örneklerle uygulanması

Sağlıklı bir gönüllüden 24 saatlik idrar örnekleri toplandı ve 0,45 µm’lik filtreler ile süzölerek -20°C’de buzdolabında saklandı (Etik kurul izni, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Faköltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu kurumundan alındı (EK1)). Analiz öncesinde idrar örneği oda sıcaklığına getirildi ve 2 dk boyunca vortekslenerek homojenize edildi. İlk olarak 1:10 oranında seyreltilmiş 5 mL idrar numunesinin, pH değeri amonyum asetat tamponu ile 6,8’e ayarlandı. İdrar numunesinin (pH=6,8) üzerine 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ve 50 µL (100 unite) glukuronidaz enzimi eklenerek 37 °C’de 2 saat boyunca hidroliz edildi. Bu sürenin sonunda derişik HCl (%37) eklenerek, hidroliz durduruldu ve örneğin pH’ı 2’ye ayarlandı. Örnekler yukarıda bahsedilen optimum SPE şartlarında kartuştan geçirilerek GC-MS ile analiz edildi (Şekil 3.1).

1.KISIM



2.KISIM

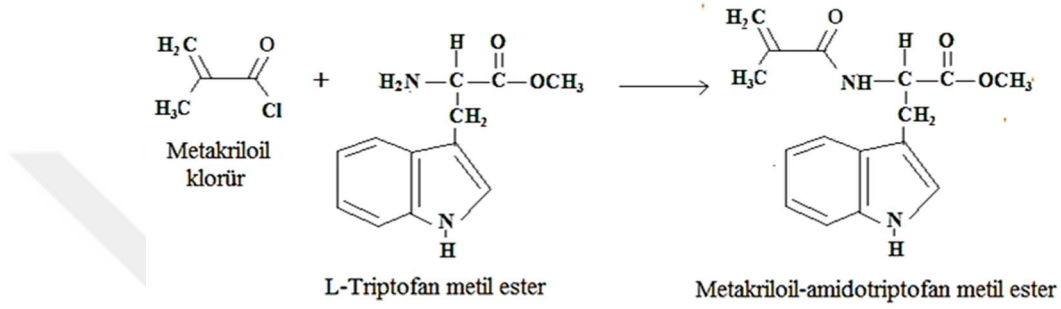


Şekil 3.1. Metodun gerçek örneklere uygulanması

4. BULGULAR

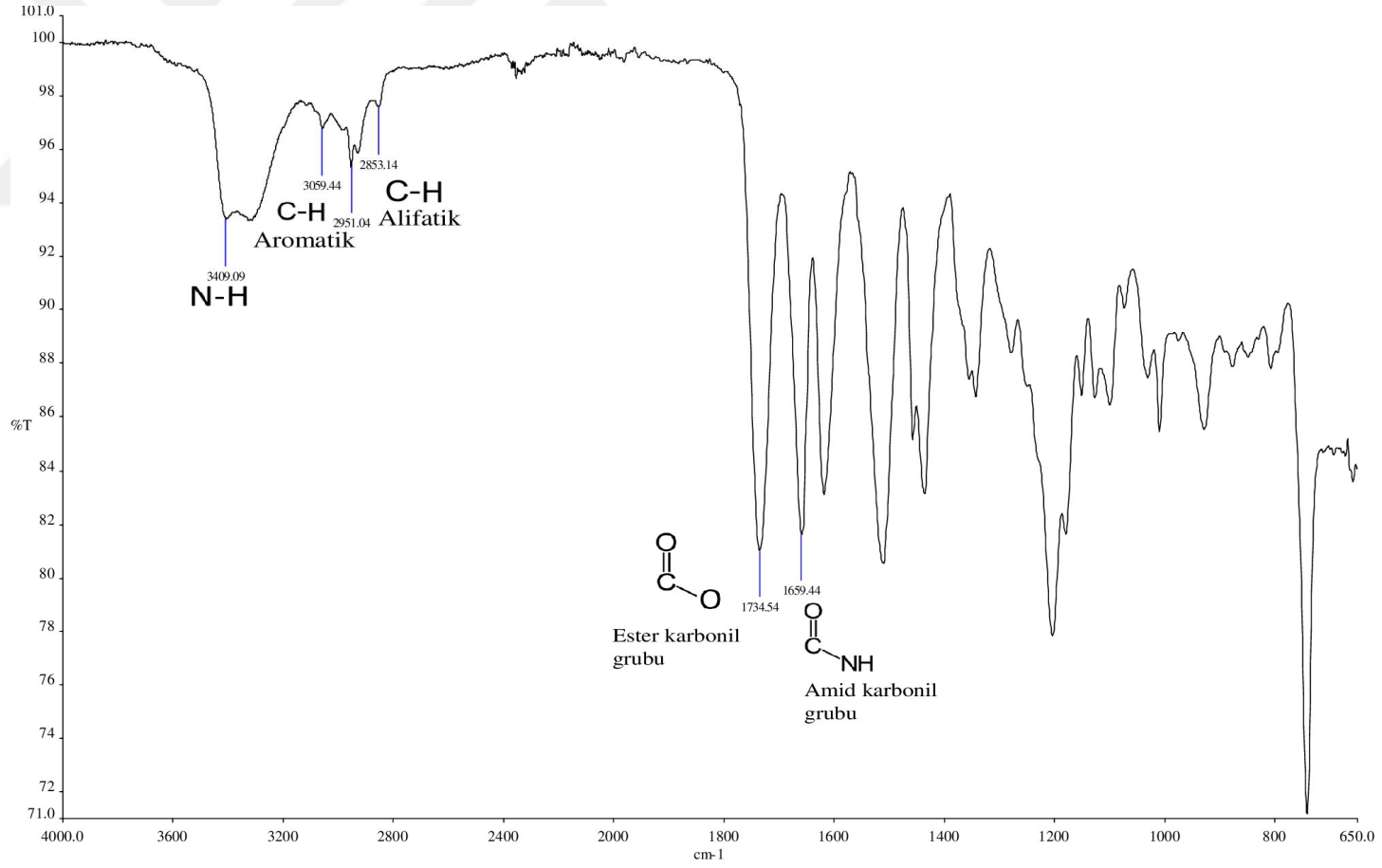
4.1. N-Metakriloil-Amido L-Triptofan Metil Ester (MATrp) Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

MATrp monomeri, metakriloil klorürün L-triptofan metil esteri ile reaksiyonu sonucu sentezlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentezi

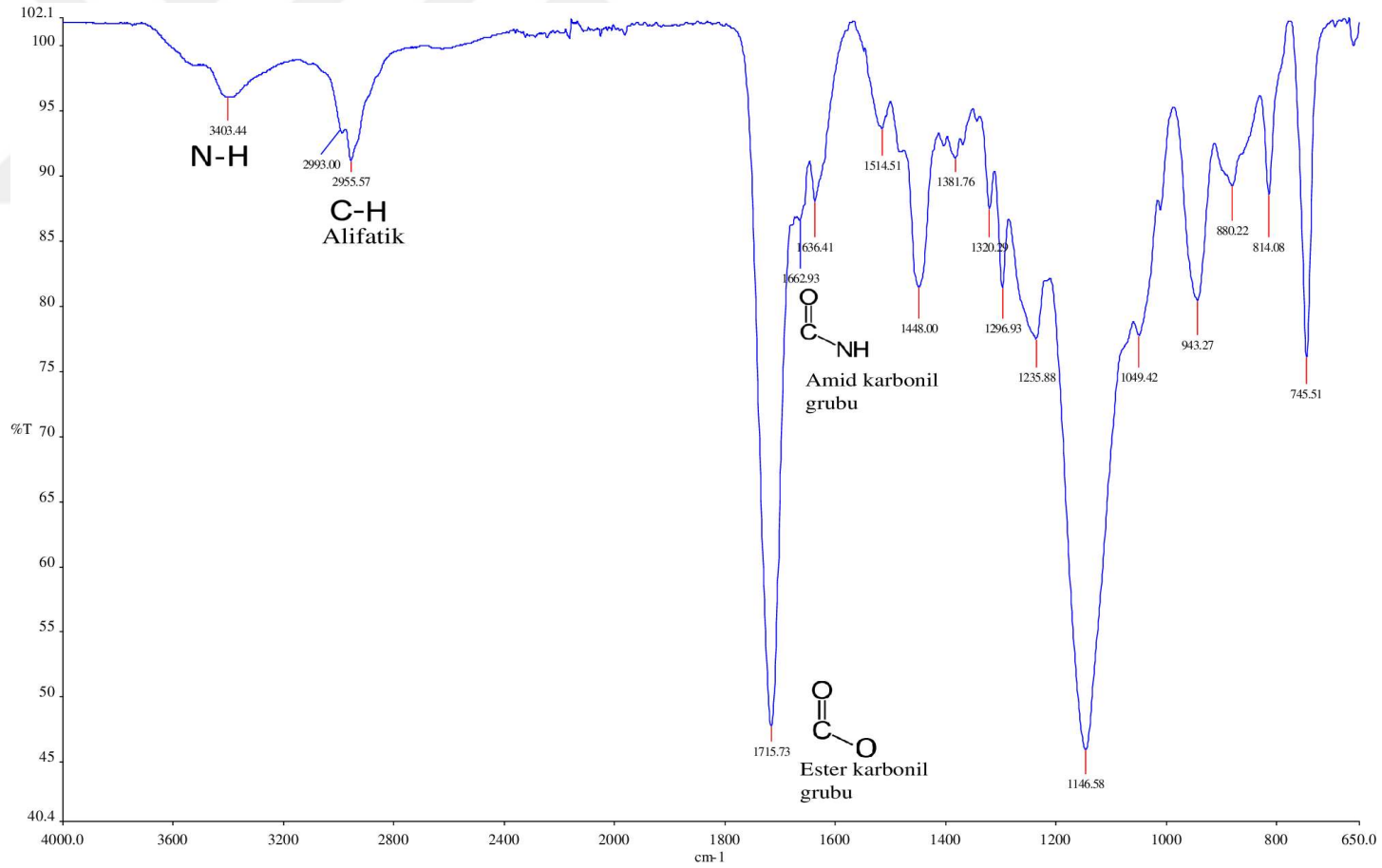
Sentezlenen MATrp monomerinin kimyasal karakterizasyonu için FTIR tekniği kullanıldı. FTIR spektrumunda (Şekil 4.2); 1659 cm⁻¹'de amid karbonil grubuna ait, 1734 cm⁻¹'de ise ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandı yer almaktadır. 2853 ve 2952 cm⁻¹'de alifatik C-H, 3000-3100cm⁻¹ aralığında aromatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlemlendi. N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandı da 3400 cm⁻¹ civarında ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.2. MATrp monomerinin FTIR spektrumu

4.2. Dietil Fitalat (DEP) Baskılanmış Poli[(EGDMA-MATrp)] Mikrokürelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

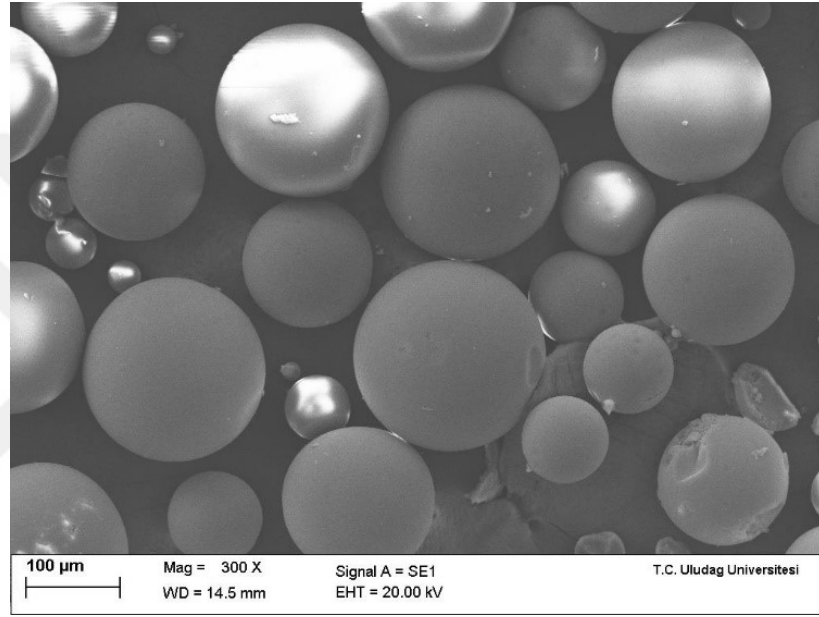
DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin yapısal karakterizasyonu için FTIR tekniğinden yararlanıldı. FTIR spektrumu Şekil 4.3'te verilmektedir. 1662 cm^{-1} 'de amid karbonil grubu (C=O) gerilmesine, 1715 cm^{-1} 'de ester karbonil grubu (C=O) gerilmesine ait absorpsiyon bandları görülmektedir. 2955 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı ise polimerik yapı içerisinde tekrar eden alifatik C-H bağlarına ait gerilmelerden kaynaklanmaktadır. 3403 cm^{-1} 'de, MATrp monomerinin yapısında yer alan N-H gerilmesinden kaynaklanan absorpsiyon bandı görülmektedir. Poli [(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin FTIR spektrumu, MATrp monomerinden kaynaklanan 3403 cm^{-1} 'de N-H gerilme titreşimine sahiptir. Bu sonuç fonksiyonel monomer MATrp'nin başarıyla polimerik yapıya dâhil edildiğini göstermektedir



Şekil 4.3. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin FTIR spektrumu

4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezlenen DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin morfolojik özellikleri SEM tekniği kullanılarak incelendi (Şekil 4.4). Sentezlenen DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)]'in SEM görüntüleri, polimerik yapının küresel formda olduğunu ortaya koymaktadır. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin çapları 150-300 μm aralığındadır.

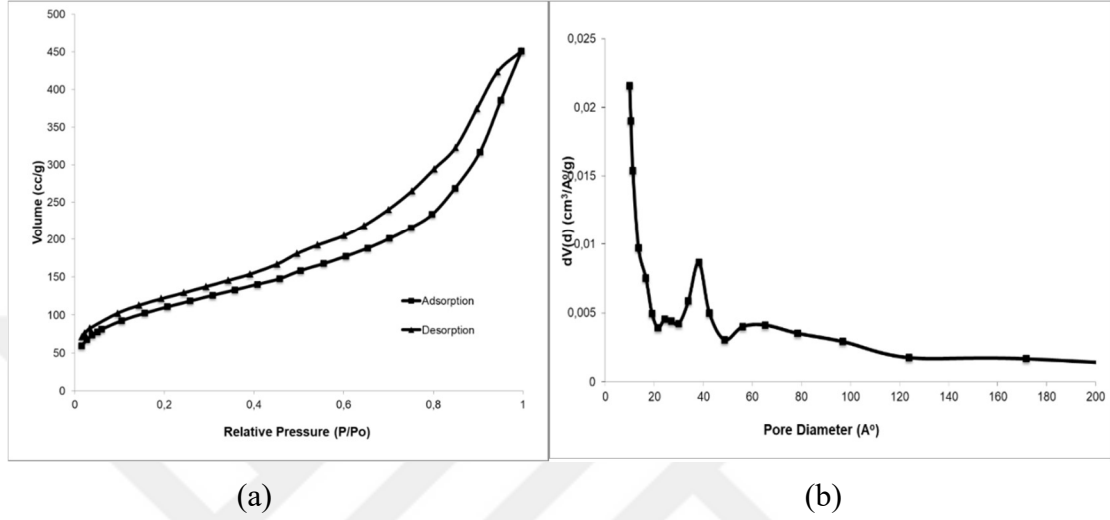


Şekil 4.4. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin SEM görüntüsü

4.4. BET Analizi

Poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin spesifik yüzey alanı, gözenek boyutu ve gözenek hacmi Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi ile belirlendi. Analiz sonuçları ile azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi hazırlandı. İzotermi ve gözenek boyutu dağılımlarını gösteren grafik Şekil 4.5'te verildi. Mikrokürelerin spesifik yüzey alanı 651,2 m^2/g olarak belirlendi. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler için Tip IV standart izotermi elde edildi. Mezogözenek ve/veya mikrogözenek içeren katılar genellikle Tip IV standart izotermine uyum göstermektedir. IUPAC'ın tanımına göre, adsorban gözenekleri üç gruba ayrılmaktadır; mikrogözenek ($\text{çap} < 2 \text{ nm}$), mezogözenek ($\text{çap} < 2-50 \text{ nm}$) ve makrogözenek ($> 50 \text{ nm}$). DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin gözenek boyutu 0,996-6,52 nm aralığında

olup, IUPAC'ın tanımına göre mikroküreler mikro ve mezogözenekler içermektedir. Gözenek hacmi ise 0,746 cm³/g'dır. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Bu özellik mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesini artıran bir parametredir.

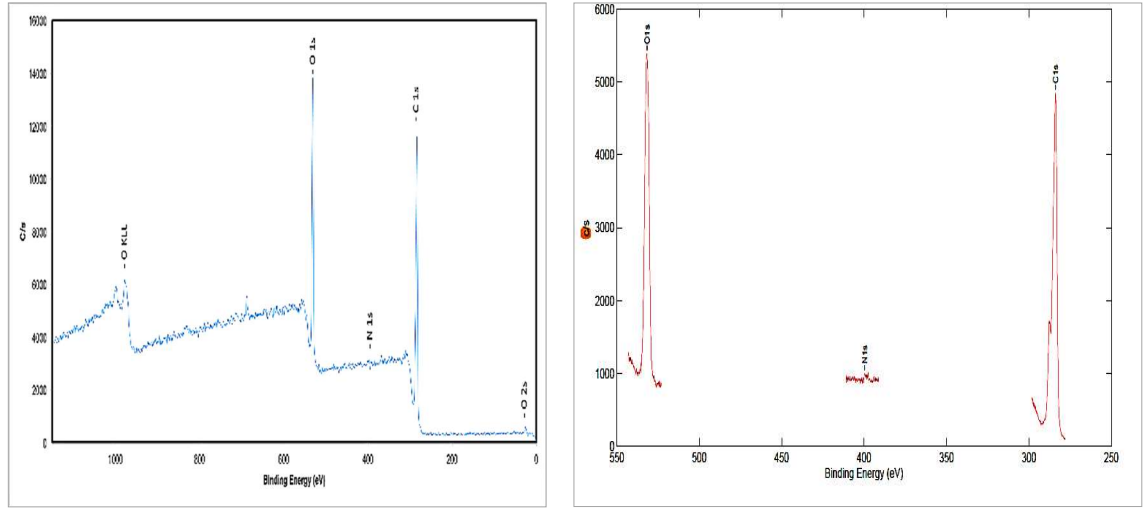


Şekil 4.5. BET analizi sonuçları

(a) Azot gazı ile 77,40 K sıcaklıkta elde edilen adsorpsiyon / desorpsiyon izotermi ve
(b) DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin ortalama gözenek çapına göre $dV / d (\log D)$ ile elde edilen gözenek boyut dağılımı

4.5. XPS Analizi

DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin XPS spektrumları Şekil 4.6'da görülmektedir. EGDMA'nın kimyasal yapısında azot bulunmadığı için elementel analiz ile tespit edilen azot polimerik yapıda yer alan MATrp monomerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç monomerin polimer yapısına başarıyla dâhil edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin XPS spektrumu

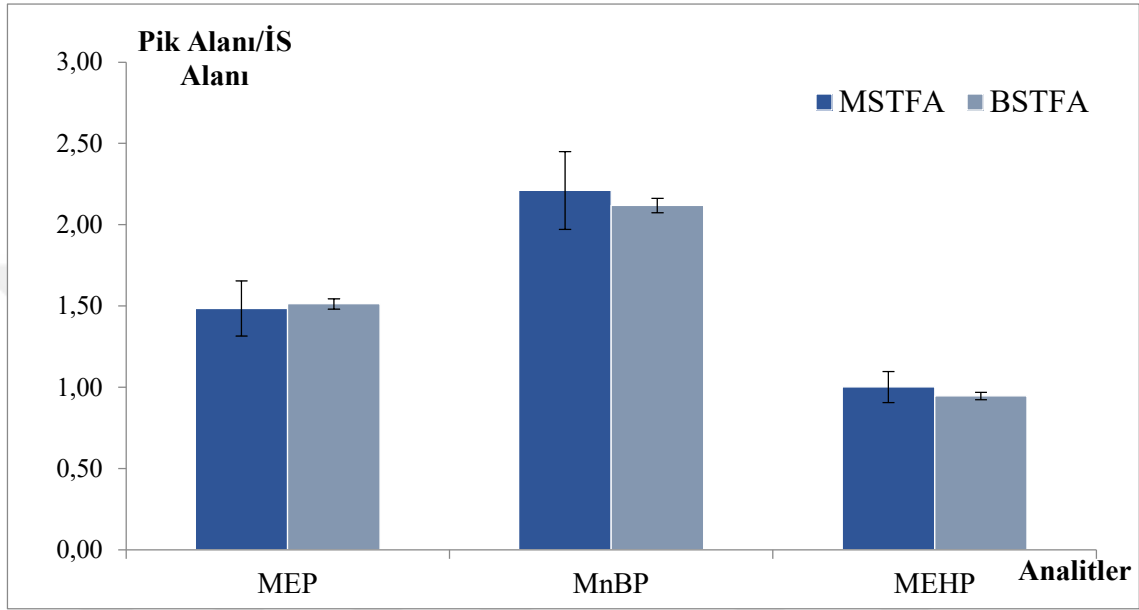
4.6. Fitalat Monoesterleri için Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

Fitalat monoesterler, yüksek kaynama noktası ve düşük uçuculuğa sahip bileşiklerdir (Çizelge 4.1). Bu bileşikler GC’de direkt olarak analiz edilemezler. Analiz öncesinde fitalat monoesterlerin aktif (polar) hidrojen atomlarının (OH, COOH, SH, NH ve CONH gibi) farklı gruplar ile yer değiştirilerek uçucu türevlerine dönüştürülmesi hedeflenir. Literatürde fitalat monoesterlerinin türevlendirilmesi amacıyla diazometan (Martens, F., ve Martens, M., 2002; Kondo vd., 2010), N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamit (BSTFA) (% 1 trimetilklorosilan) (Kim vd.,2014) ve N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit (MSTFA) (Kranvogt vd., 2014) gibi çeşitli türevlendirme reaktifleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Fitalat monoesterlerinin kaynama noktaları

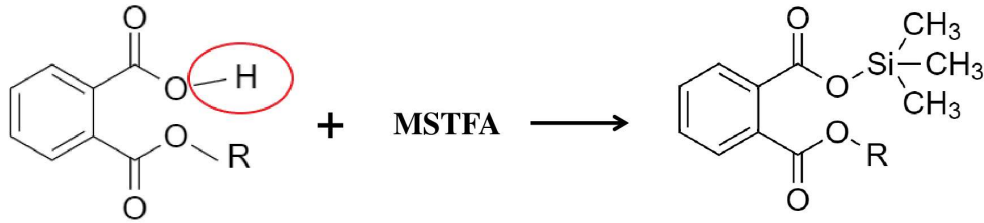
Fitalat monoesterleri	Kaynama noktası
Monoetil fitalat	339,6 ± 25,0 °C
Mono-n-bütil fitalat	363,5 °C
Monohegzil fitalat	388,8 ± 25,0 °C

Bu çalışmada, fitalat monoesterlerinin türevlendirilmesi için MSTFA ve BSTFA kullanıldı. Analiz sonucunda, fitalat monoesterleri (MEP, MnBP ve MEHP) için en yüksek pik alanı veren ve kromatogram zemin gürültüsü en az olan MSTFA seçildi (Şekil 4.7). Fitalat monoesterlerinin MSTFA ile türevlendirme reaksiyonu Şekil 4.8’de verilmektedir.



Şekil 4.7. Farklı türevlendirici reaktiflerin, fitalat monoesterlerin pik alanına etkisi

(20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP); 20 µL 10 mg/L BBz (İS); azot atmosferinde uçurma; 50 µL türevlendirici ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C’de 30 dakika inkübasyon)



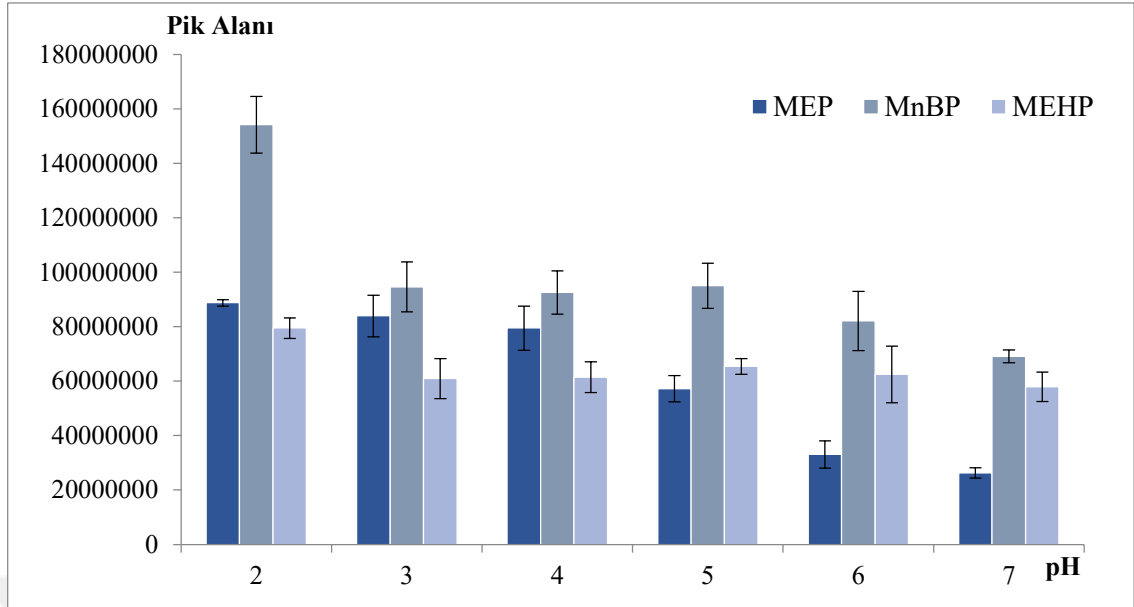
Şekil 4.8. Fitalat monoesterlerinin MSTFA ile türevlendirme reaksiyonu

4.7. Sentezlenen Adsorbentler ile SPE Optimizasyonu

pH etkisi

pH, analit ve/veya adsorbent yüzey yüklerinde değişimler meydana getirebilen önemli bir parametredir. Ayrıca, adsorbent ile sıvı ortamdaki hedef moleküller arasında uygun etkileşimlerin (iyonik etkileşimler, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler) oluşması adsorpsiyon ortamının pH'ına bağlıdır.

Bu çalışmada, fitalat monoesterlerinin DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler ile SPE işlemi sırasında, pH etkisinin incelenmesi amacıyla farklı pH (2-7) aralıklarında çalışıldı. GC-MS analizi sonucunda, fitalat monoesterlerinin adsorpsiyonunun pH ile değiştiği ve analitlere ait pik alanlarının artan pH değerleriyle birlikte azalış gösterdiği görüldü (Şekil 4.9). Bu durum, pH'ın artmasıyla fitalat monoesterlerin iyonlaşarak eksi yüklü forma dönüşmesine ve iyonlaşan analitlerin adsorbentle arasındaki adsorpsiyon ilişkisinin olumsuz yönde sonuçlanmasıyla açıklanabilir. Fitalat monoesterleri (MEP, MnBP ve MEHP) ve adsorbent pH 2 de moleküler formunu korumakta ve moleküller arasında diğer pH değerlerine göre daha güçlü bir adsorbsiyon meydana gelmektedir. Aromatik heterosiklik bir yapıya sahip olan MATrp monomerindeki indol halkası ile analitlerde bulunan benzen halkası, kuvvetli π - π etkileşimlerine yol açabilmektedir. Ayrıca monomerin heterosiklik yapısında bulunan N atomu ile analitlerin düşük pH değerlerinde ($pK_a=3,08$) sahip oldukları $-COOH$ grubundaki H ile hidrojen bağı yapma potansiyeli de mevcuttur. Sonuç olarak, tüm analitler (MEP, MBP ve MEHP) için en yüksek adsorpsiyon sağlayan pH 2 değeri seçildi.



Şekil 4.9. Fitalat monoester pik alanlarına pH etkisi

(100 mg adsorbent; 2 mL farklı pH'lara ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

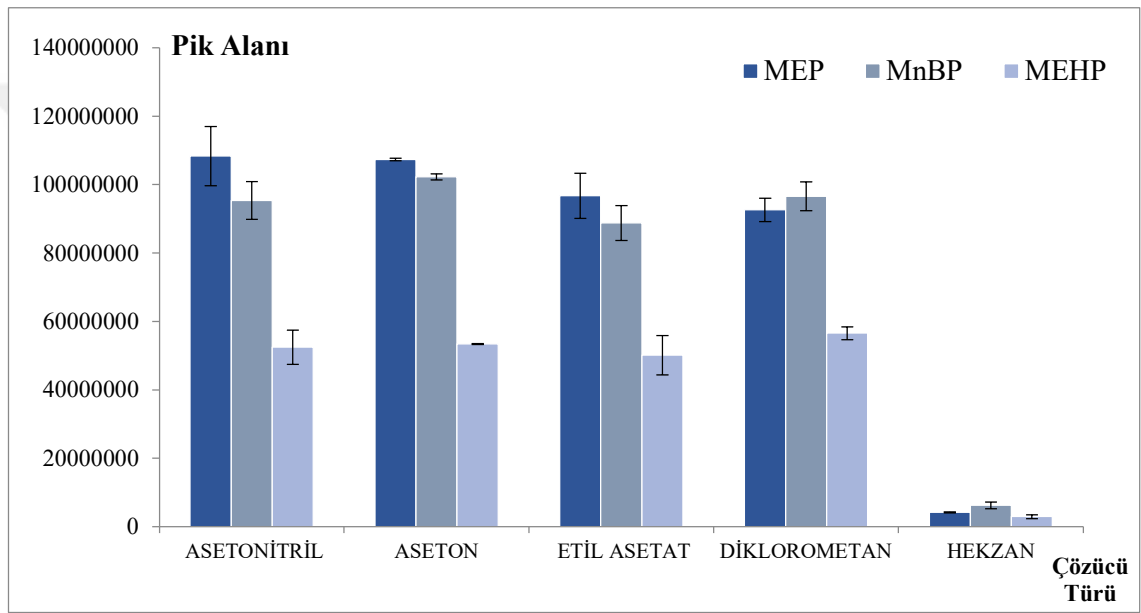
Elüsyon çözücüsünün etkisi

Elüsyon çözücüsünün türü, ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir parametredir. Çözücü türü seçiminde; uçuculuğu, fiyatı, güvenilirliği, çözücü içerisindeki bileşenin kararlılığı ve zehirliliği gibi özellikler etkilidir. Fitalat monesterlerinin elüsyonunda literatürde farklı organik çözücü ve/veya çözücü karışımları tercih edilmiştir. Bunlar: asetonitril ve etil asetat karışımı (Silva vd., 2003; Frederiksen vd., 2010; Feng vd., 2015; Yao vd., 2018a), asetonitril (Chen vd., 2012; Dewalque vd., 2014) ve metanol (Dong vd., 2017; Been vd., 2019; Dima vd., 2020) gibi çözücülerdir.

Kartuşa adsorbe olan analitlerin geri kazanılabilmesi için elüsyon çözücüsünün, analitler ile benzer polariteye sahip olması gerekmektedir. Bu çalışmada; asetonitril, aseton, etil asetat, diklorometan ve hekzan olmak üzere farklı polariteye sahip olan organik çözücülerle elüsyon gerçekleştirildi (Çizelge 4.2). Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlardaki fitalat monoesterlerinin (MEP, MnBP ve MEHP) pik alanları değerlendirilerek uygun elüsyon çözücüsü belirlendi. Aseton ve asetonitril ile yapılan elüsyon sonucunda analitler için benzer pik alanları bulundu (Şekil 4.10). Asetonitrile göre yüksek uçuculuğundan dolayı aseton elüsyon çözücüsü olarak seçildi.

Çizelge 4.2. Kullanılan organik çözücüler ve polarite indeksleri

Organik Çözücüler	Polarite İndeksi
Asetonitril	6,2
Aseton	5,4
Etil Asetat	4,3
Diklorometan	3,4
Hekzan	0,0

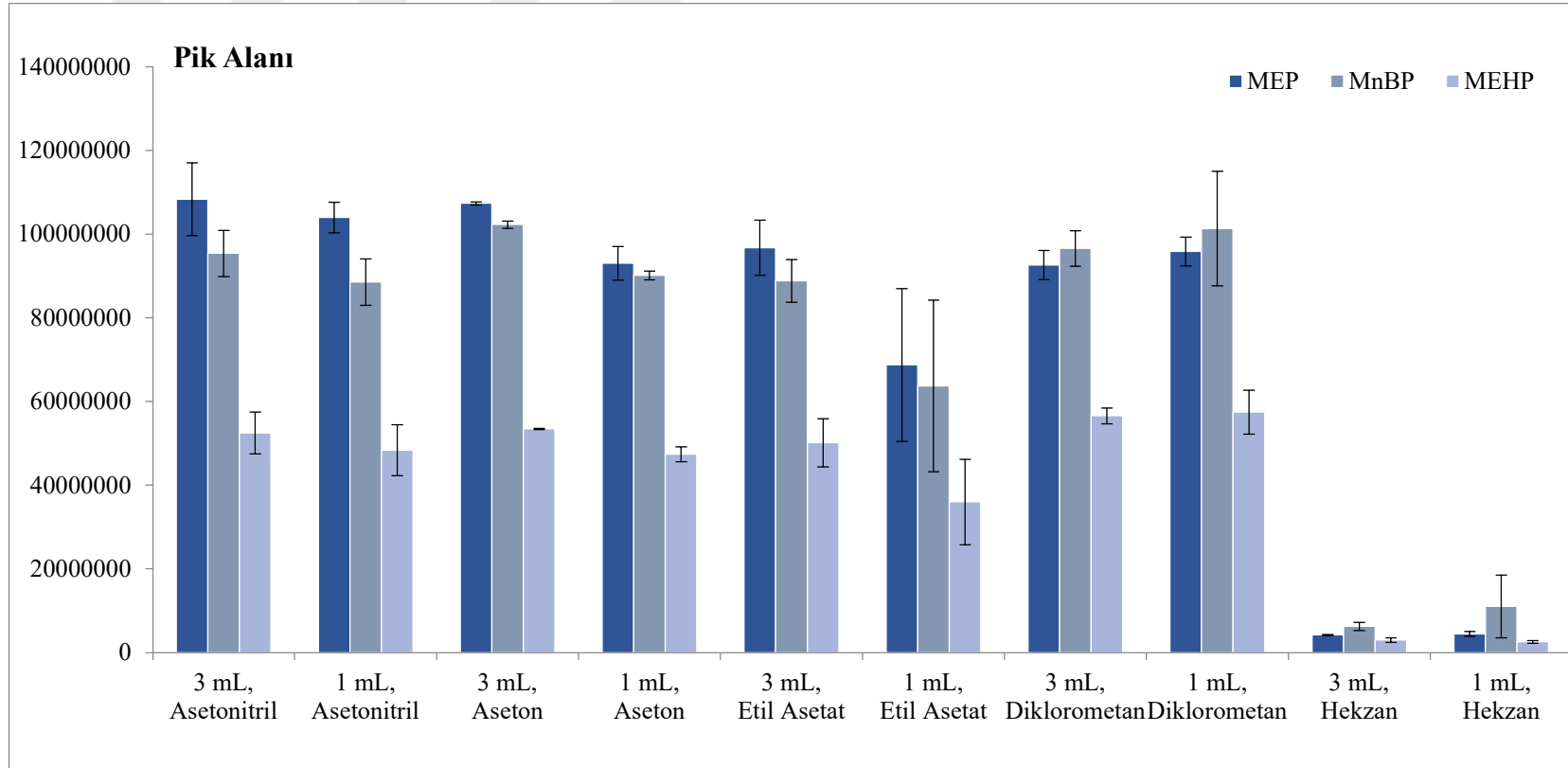


Şekil 4.10. Fitalat monoester pik alanlarına elüsyon çözücüsünün etkisi

(100 mg adsorbent; 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL organik çözücüyle elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

Kartuş hacminin etkisi

SPE kartuşlarının hacmini belirlemek için, 1 mL ve 3 mL'lik ticari kartuşlar eşit miktarda adsorbentlerle dolduruldu ve çözücü çalışmasında kullanılan çözücüler ile elüsyon gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, 3 mL'lik kartuş hacmi genel olarak tüm çözücülerde yüksek pik alanına sahip olduğu için çalışmaya 3 mL'lik kartuşlar ile devam edildi (Şekil 4.11).



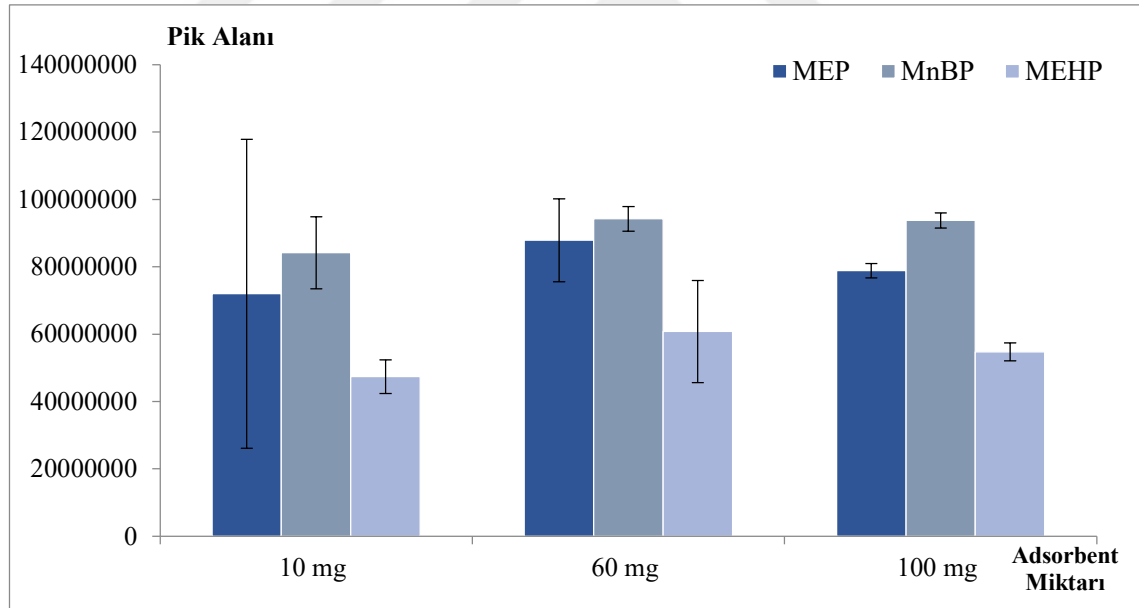
Şekil 4.11. Fitalat monoester pik alanlarına ticari kartuş hacminin etkisi

(1 ve 3 mL'lik ticari kartuşlar; 100 mg adsorbent; 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL organik çözücüyle elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

Adsorbent miktarının etkisi

Adsorbent miktarı, ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir diğer parametredir. Literatürde, fitalat monoesterlerinin analizi için genel olarak 60 mg (Blount vd., 2000; Peng vd., 2016; Dong vd., 2017; Dima vd., 2020;) ve 200 mg (Silva vd., 2003; Frederiksen vd., 2010; Chen vd., 2012; Huang v.d., 2022) adsorbentle doldurulmuş kartuşlarla çalışılmıştır.

Bu amaçla 10 mg, 60 mg ve 100 mg olmak üzere farklı miktarlarda DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler ile doldurulan kartuşlar ile çalışıldı. Analitlere ait pik alanları değerlendirildiğinde, 60 mg adsorbent içeren kartuşların tüm analitler (MEP, MnBP ve MEHP) için en yüksek pik alanı verdiği görüldü (Şekil 4.12). Adsorbent miktarının artılmasıyla elüsyon sırasında çözücü ile analit arasındaki etkileşimlerin azalması ve bunun da düşük geri kazanımlarla sonuçlanmasıyla açıklanabilmektedir.



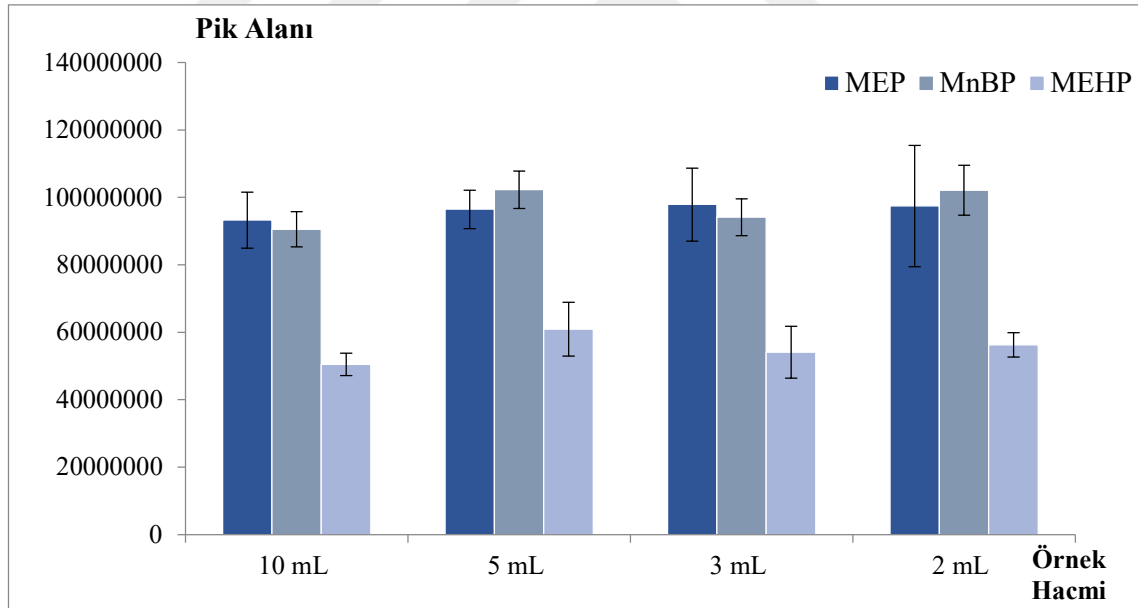
Şekil 4.12. Fitalat monoester pik alanlarına adsorbent miktarının etkisi

(3 mL'lik ticari kartuş; 10, 60 ve 100 mg adsorbent; 2 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

Örnek hacminin etkisi

Zenginleştirme, eser miktardaki analitlerin tayin edilebilmesi, matriksten analitlerin etkin bir şekilde ayrılması ve saf olarak elde edilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Zenginleştirme faktörü ise, toplanan fazdaki analit derişiminin numunedeki analit derişimine oranı olarak tanımlanır. SPE’de yüksek zenginleştirme faktörü elde etmek için kartuşa yüklenen örnek hacmi önemlidir. Örneklerin kartuşa düşük yükleme hacimleri, potansiyel matriks etkilerinin ve ekstraksiyon süreleri azaltılması açısından faydalıdır. Ancak ekstraksiyon verimliliği ve zenginleştirme faktörü örnek hacmi arttığında artmaktadır.

Bu çalışmada, 2, 3, 5 ve 10 mL olmak üzere farklı örnek hacimlerinin analitlere ait pik alanları üzerine etkisi araştırıldı. GC-MS analizi sonucunda analitlere ait elde edilen pik alanları değerlendirildiğinde, 5 mL örnek hacmi ile çalışıldığında her bir analit için en yüksek pik alanları elde edildi (Şekil 4.13).



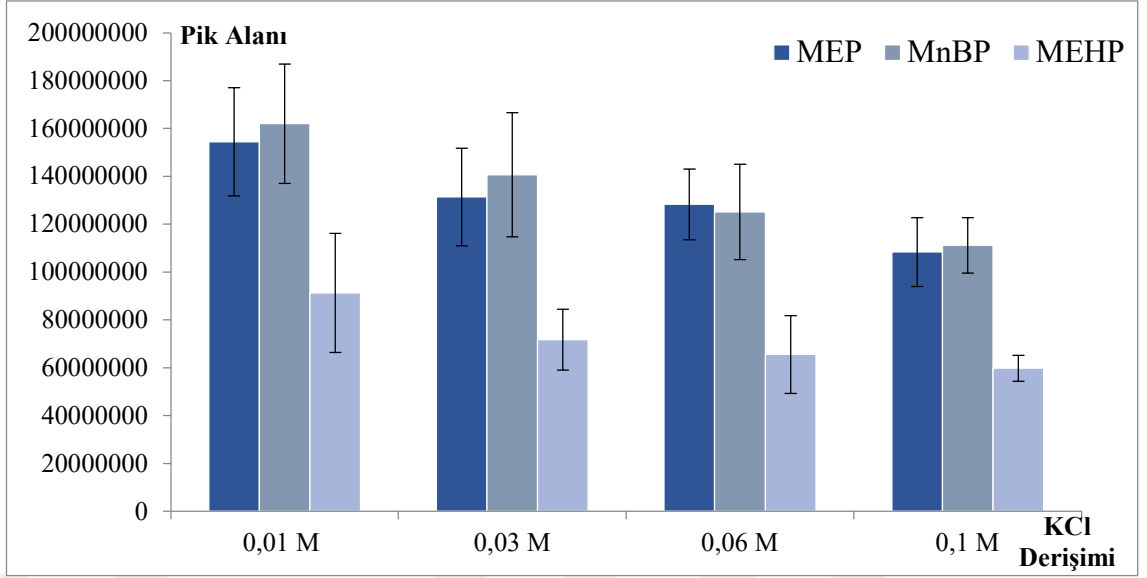
Şekil 4.13. Fitalat monoester pik alanlarına örnek hacminin etkisi

(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 2, 3, 5 ve 10 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

Tuz derişiminin etkisi

Ekstraksiyon yapılacak örneğe tuz ilavesi, tuz derişimine ve tuzun yüküne bağlı olarak ekstrakte edilen analit miktarında bir artışa veya azalmaya yol açabilmektedir. Artan tuz derişimiyle bir analitin suda çözünürlüğünde bir azalma genellikle tuzu dışarı atma “salting-out” etkisi, analit çözünürlüğündeki artış ise tuzu içeri alma “salting-in” etkisiyle olarak adlandırılmaktadır. Tuz ilavesiyle analitlerin çözünürlüğünün değişmesi, analit ile adsorbent arasındaki ekstraksiyon verimliliğini etkileyen önemli bir parametredir (Grover ve Ryall, 2005).

Bu çalışmada, farklı derişimlerde (0,01, 0,03, 0,06 ve 0,1 M) KCl içeren çözeltiler kullanıldı ve fitalat monoesterlerinin pik alanları üzerine tuz derişim etkisi incelendi. GC-MS analizi sonucu analitlere ait elde edilen pik alanları değerlendirildiğinde, tuz derişimi arttığında tüm analitler için ekstraksiyon veriminin azaldığı görüldü (Şekil 4.14). Bu da salting out etkisiyle açıklanabilir. Ortama eklenen KCl çözeltideki iyonları çeerek, su molekülleri tarafından çevrelenir. Bunun sonucunda, çözücü molekülleri hareketsizleşerek analitlerin çözünürlüğü azalır. Sonuç olarak, ortamdaki iyonik şiddetin artması hidrofilik olan analitlerin adsorbentle olan afinitesini ve ekstraksiyon verimini azaltmaktadır.

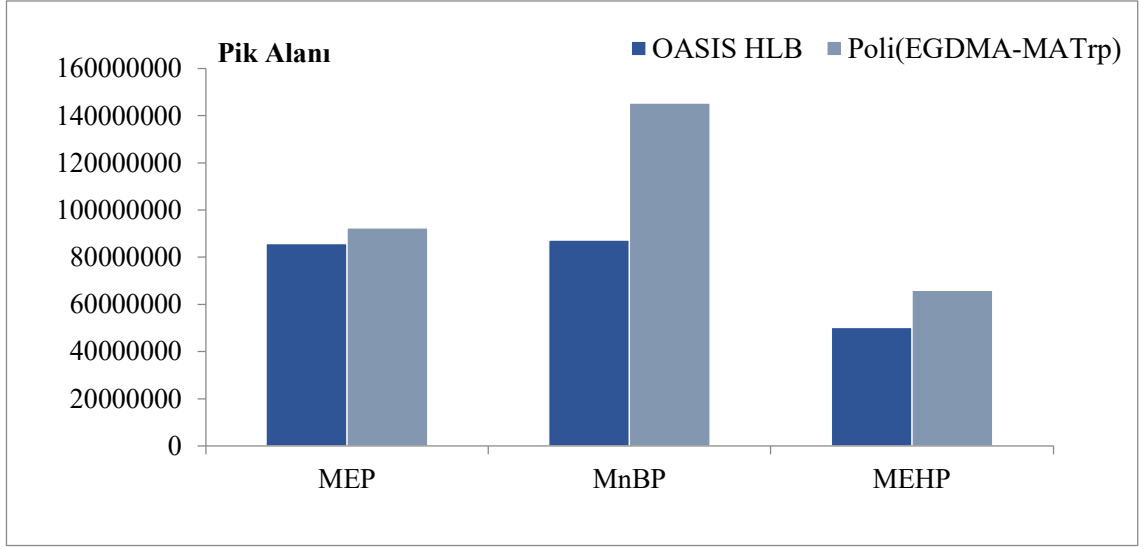


Şekil 4.14. Fitalat monoester pik alanlarına tuz miktarı etkisi

(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 5 mL farklı derişimlerde KCl ilave edilmiş pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

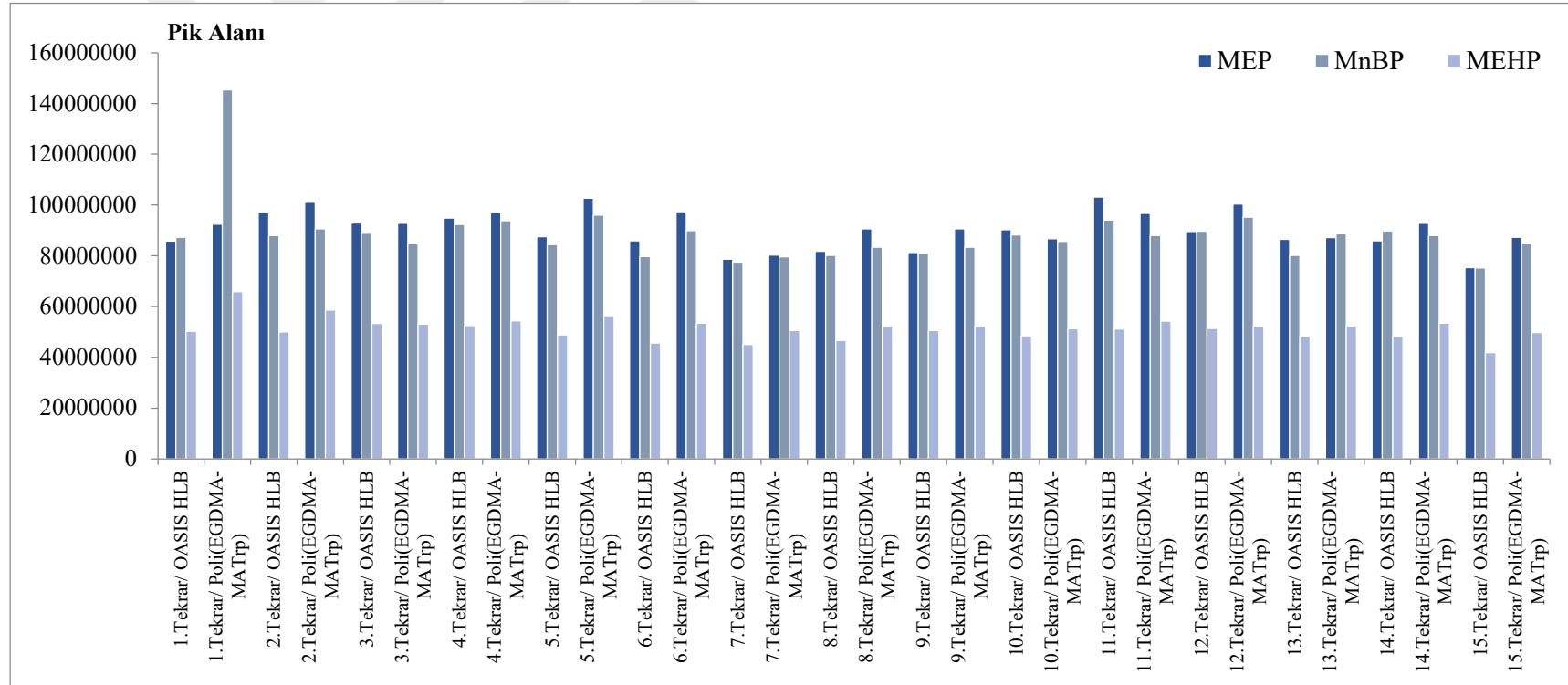
4.8. DEP Baskılanmış Poli[(EGDMA-Matrp)] SPE Kartuşu ile Ticari OASIS HLB Kartuşunun Karşılaştırılması

Ticari OASIS HLB kartuşu ile hazırlanan DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşunun karşılaştırma çalışmaları gerçekleştirildi. Hazırlanan poli[(EGDMA-MATrp)] doldurulmuş SPE kartuşu ile gerçekleştirilen çalışmalarda Şekil 4.15'te görüldüğü üzere tüm analitler için OASIS HLB kartuşuyla yapılan deriştirme işlemine göre daha yüksek pik alanlarına ulaşıldı. Ayrıca aynı önderiştirme kartuşları ile 15 kere önderiştirme işlemi tekrarlandı. 15 kere tekrar kullanımda poli[(EGDMA-MATrp)] doldurulmuş SPE kartuşuna ait pik alanları OASIS HLB kartuşuna kıyasla yüksek pik alanları bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması (1.Tekrar)

(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 5 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)



Şekil 4.16. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşu ile ticari OASIS HLB kartuşunun karşılaştırılması (1-15.Tekrar)

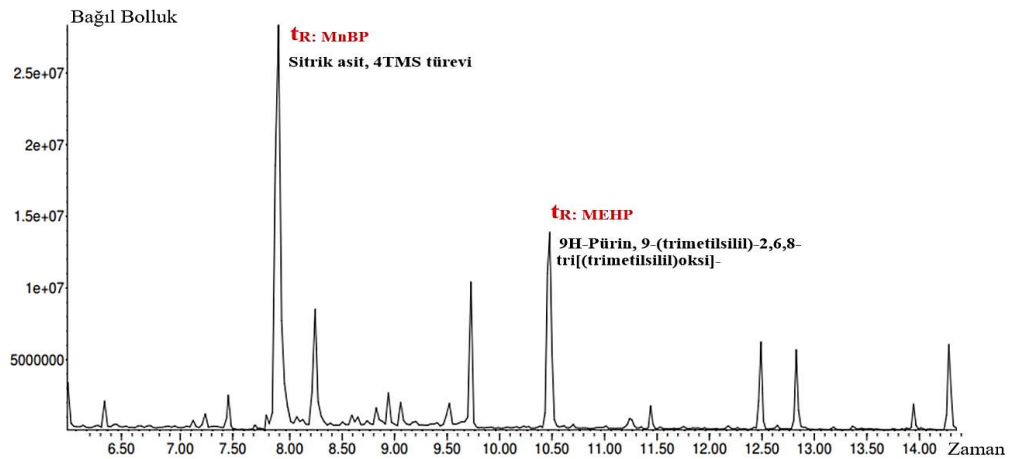
(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 5 mL pH'ı 2'ye ayarlanmış su; 20 µL 10 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

4.9. Sentetik İdrar Matriksi için SPE Şartlarının Optimizasyonu

4.9.1. Sentetik idrar çalışmalarında kartuş yıkama prosedürünün optimizasyonu

Biyolojik matriksler, ilgili analitlere benzer kimyaya sahip proteinler, tuzlar ve çeşitli organik bileşiklerin varlığı nedeniyle diğer birçok matriksten çok daha karmaşıktır. Bu yüzden SPE’de ilgili analitlerle girişim yapabilecek birçok bileşik mevcuttur. Ayrıca idrarda bulunan yoğun tuz derişimi, fitalat monoesterlerinin ekstraksiyon verimliliklerini düşürmektedir. Bu sebeplerden dolayı SPE’de ekstraksiyon verimliliğini artırılması, saflaştırma etkisini iyileştirilmesi ve analitlerin maksimum geri kazanımın elde edilmesi için idrar yüklenmiş SPE kartuşlarından analitlerin elüsyonu öncesi yıkama prosedürünün optimize edilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, gerçek idrarı taklit etmesi için sentetik idrar kullanımı ile yıkama prosedürünün optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla kartuşlar 3, 5, 10 ve 20 mL pH’ı 2’ye ayarlanmış suyla yıkandı. GC-MS analizi sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde; ilgili analitler olan MBP ve MEHP’in alıkonma zamanlarında sitrik asit, 4TMS türevi ve 9H-Pürin, 9-(trimetilsilil)-2,6,8-tri[(trimetilsilil)oksi]-türlerin girişim yaptığı tespit edildi (Şekil 4.17). Bu türler, kartuşun 20 mL pH=2’ye ayarlanmış su ile yıkanmasıyla giderildi.

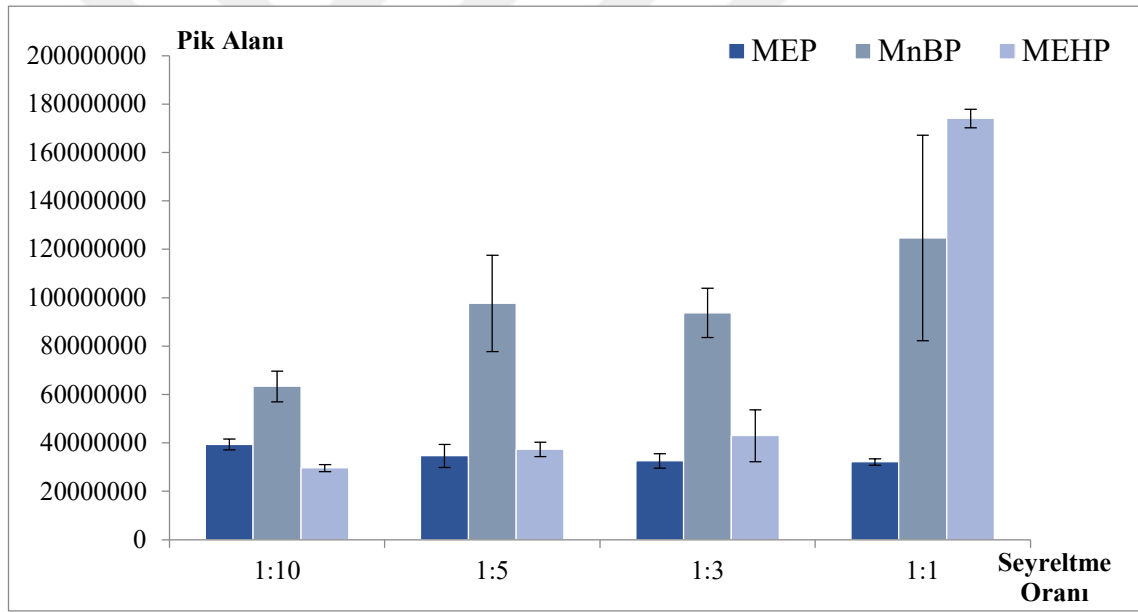


Şekil 4.17. Analitlerin bulunduğu alıkonma zamanlarında girişim yapan türler

(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 5 mL pH’ı 2’ye ayarlanmış sentetik idrar; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C’de 30 dakika inkübasyon)

4.9.2. Sentetik idrar çalışlarında seyreltme oranı optimizasyonu

Biyolojik matriks olan idrarın karmaşıklığı ve yoğun miktarda tuz içermesi nedeniyle, ekstraksiyon öncesinde matriks etkisinin giderilmesi için seyreltilerek analiz edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, 1:1, 1:5, 1:3 ve 1:10 seyreltme oranlarıyla çalışıldı. GC-MS analizi sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde, MEP'in tüm seyreltme oranlarında aynı pik alanına sahip olduğu görüldü ve bu da seyreltme oranı artsa bile geri kazanımın değişmediğini gösterdi. MnBP ve MEHP için ise seyreltme oranının azalmasıyla pik alanlarında artış görüldü. Fakat artan pik alanları analitlere ait olmayıp matriskte girişim yapan türlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Tüm analitlere ait pik alanları değerlendirildiğinde matriks etkisinin en aza indirildiği 1:10 seyreltme oranı seçildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Sentetik idrar çalışlarında seyreltme oranı optimizasyonu

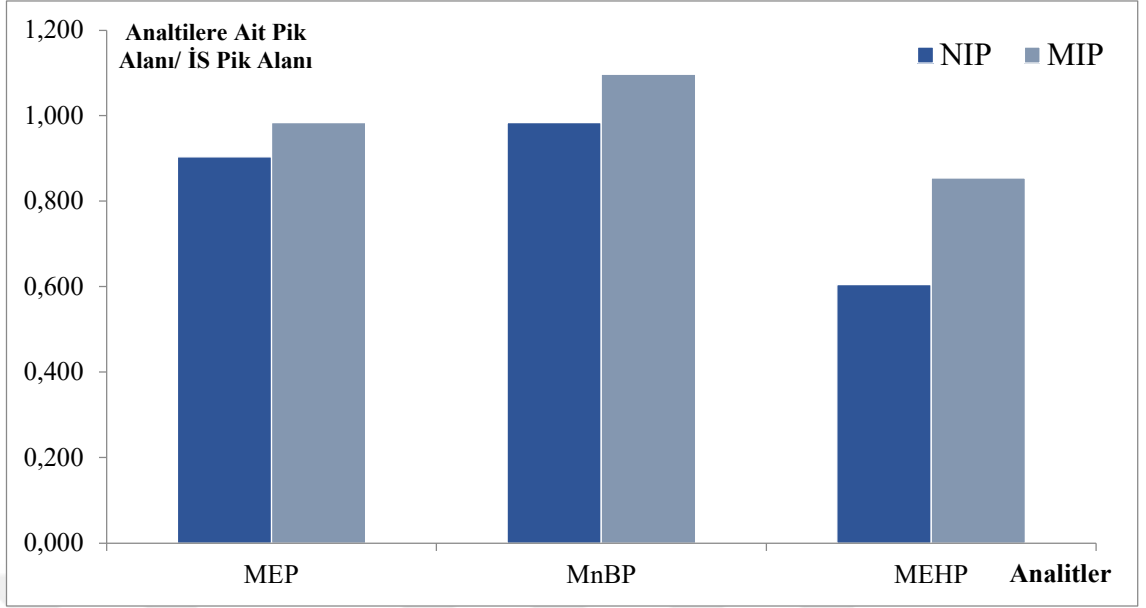
(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg adsorbent; 1:1, 1:3, 1:5 ve 1:10 olmak üzere farklı oranlarda seyreltilmiş 5 mL (pH=2) sentetik idrar; 20 µL 5 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

4.10. DEP Baskılanmış Poli[(EGDMA-Matrp)] ve Baskılanmamış Poli[(EGDMA-Matrp)] Mikrokürelerinin Baskılama Seçiciliğinin Karşılaştırılması

MIP'lerin yeni baskılama stratejilerinden biri olan yapısal analog (Dummy) baskılama; boyut, şekil ve işlevsellik açısından az bir farkla hedef türe benzeyen bir kalıp molekülün seçilerek baskılanması (D-MIP) işlemine denir. Oluşturulan boşluklar, hedef şablonla benzerliklerinden dolayı hedef moleküle yüksek afinite ve seçiciliğe sahiptir.

Daha önce grubumuz tarafından sentezi gerçekleştirilen DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin (MIP) DEP molekülüne gösterdiği seçiciliği, stiren ve vanillik asit moleküllerine karşı değerlendirilmiş ve seçicilik katsayılarının oranını gösteren k' değerleri sırasıyla 2,02 ve 1,86 olarak bulunmuştur. Bu katsayı hedef molekül ile yarışmacı moleküller arasında seçiciliği belirlerken hem de DEP baskılanmış polimer ile DEP baskılanmamış polimer arasındaki seçicilik oranını vermektedir (Özer vd., 2017).

Bu çalışmada, fitalat monoesterlerinin tayini için dummy kalıp molekülü olarak DEP kullanıldı. Baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] polimerlerin (MIP) seçiciliği DEP baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] polimerlerle karşılaştırıldı. Aynı deneysel koşullar altında, pik alanları değerlendirildiğinde NIP adsorpsiyonunun MIP'e göre nispeten daha düşük olduğu görüldü (Şekil 4.19). Bu da DEP baskılanmış polimerlerin, monoester fitalat molekülleri (MEP, MnBP ve MEHP) için yüksek afiniteye ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19. MIP ve NIP seçicilik karşılaştırılması

(3 mL'lik ticari kartuş; 60 mg DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] (MIP) ve DEP baskılanmamış (NIP) adsorbentleri; 1:10 oranında seyreltilmiş 5 mL (pH=2) sentetik idrar; 20 µL 5 mg/L standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) ilavesi; vakum altında N₂ ile kurutma; 5 mL aseton ile elüsyon; azot atmosferinde uçurma; 50 µL MSTFA ve 50 µL DCM ekleme; 65 °C'de 30 dakika inkübasyon)

4.11. Optimize Edilen Metodun Validasyonu

Validasyon ölçüm prosedürünün, metodun veya cihazın belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Analitik metod validasyonu, bir metodun performansını belirlemek için yapılan birtakım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir. Analitik ölçüm sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir. Uluslararası kabul edilen çeşitli validasyon kriterleri mevcuttur. Bunlar; doğruluk, kesinlik, özgünlük, doğrusallık, gözlenebilme sınırı (GS), tayin sınırı (TS), çalışma aralığı, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ya da kararlılık ve stabilite'dir (Erkan vd., 2022).

Tez çalışması kapsamında belirlenen SPE optimum koşullarında doğrusallık, duyarlılık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik gibi parametreler incelendi. Sentetik idrar (5 mL) çözeltisine artan derişimlerde (4-60 µg/L) fitalat monoester standartlarının (MEP, MnBP ve MEHP) ilave edilmesiyle hazırlanan kalibrasyon çözeltilerine SPE prosedürü uygulandı. Örnekler GC-MS ile analiz edildi ve

pik alanları kullanılarak her bir ftalat monoesteri için kalibrasyon eğrileri çizildi. 4-60 µg/L derişim aralığında tüm analitler (MEP, MnBP ve MEHP) için doğrusallık elde edildi ve korelasyon katsayısının kareleri (R^2) değerleri Çizelge 4.3'te verildi. Ftalat monoesterleri (MEP, MnBP ve MEHP) için gözlenebilme sınırı (GS) ve tayin sınırı (TS) değerleri sırasıyla 0,04-1,20 µg/L ve 0,15- 4,01 µg/L aralığında bulundu.

Geliştirilen metodun doğruluğunu ve kesinliğini belirlemek amacıyla gün içerisinde sentetik idrar derişimi 20 µg/L olacak şekilde içerisine standart ilave edildi ve SPE prosedürü uygulanarak GC-MS ile analiz edildi. Bu işlemler gün içerisinde 5 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Günler arası çalışmada ise sentetik idrar derişimi 20 µg/L olacak şekilde standart ilavesi ile SPE prosedürü uygulandı ve gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlikleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma (%BSS) verileri gün içi çalışmalar için %1,11-2,29 ve günler arası çalışmalar için %4,49-9,34 aralığında bulundu (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Metot parametreleri

Analitler	Doğrusal Aralık (µg/L)	R^2	GS (µg/L)	TS (µg/L)	Gün İçi %BSS	Günler Arası %BSS
MEP	4-60	0,9993	0,29	0,97	1,56	4,49
MnBP	4-60	0,9959	1,20	4,01	1,10	7,14
MEHP	4-60	0,9778	0,04	0,15	2,29	9,34

Literatürde idrarda ftalat monoesterlerinin tayinine yönelik moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak yapılan tek çalışma ile tez çalışmasının GS değerleri karşılaştırıldı. Tez çalışmasında elde edilen verilerin Li ve diğerlerinin (2021) yaptığı çalışmadan daha düşük gözlenebilme sınırına sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İdrarda fitalat monoesterlerinin tayinine yönelik moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak literatürde yapılan çalışma ile tez çalışmasının karşılaştırılması

Analitler	Monomer/Çapraz Bağlayıcı/ Baskılanan Molekül	Matriks	Ölçüm Metodu	GS (µg/L)	Referans
MMP	(3-Aminopropil)	İdrar	HPLC-UV	77	Li vd., 2021
MEP	trietoksisilan/			57	
MnBP	Tetraetil ortosilikat/			96	
MBzP	Monoheksil fitalat			194	
MEHP	(MHP)			404	
MEP	MATrp/ EGDMA/	İdrar	GC-MS	0,29	Tez Çalışması
MnBP	DEP			1,20	
MEHP				0,04	

4.12. Metodun Gerçek Örneklerle Uygulanması

İdrar içeriği bakımından zengin bir vücut sıvısıdır. İdrar bileşenleri, önemli biyobelirteçler olarak hizmet etme ve çok sayıda hastalığı teşhis etme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, idrarla çalışmanın zorlukları vardır. İdrarın içerisinde bulunan bileşenlerin türü, miktarı ve pH'ı; cinsiyete, yaşa, ırka, gıda alımına, ilaç varlığına ve egzersize göre farklılık göstermektedir (Sarigul, 2019). Örneğin, insan idrarındaki pH değerleri yaklaşık olarak 4,5-9,5 aralığında değişim göstermektedir. Bu pH değişimlerine (asidik, nötr veya bazik) bağlı olarak içerisinde bulunan bileşenler iyonik formda veya moleküler formda olabilmektedirler. Bu durum ise metot oluşturulduktan sonra analiz edilecek hedef analitlerin gerçek örneklerle uygulanma aşamasında bazı güçlüklerle neden olabilmektedir.

Örnek hazırlama basamaklarının optimize edildiği SPE metodu, gerçek idrar numunelerinde fitalat monoesterlerinin tayini için kullanıldı. Metodun uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, sağlıklı bir gönüllüden 24 saatlik toplanan idrar örneklerine derişimi 40 µg/L olacak şekilde standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve optimum koşullar altında analiz edildi. Metot uygulandığında gerçek idrarda

MEP, MnBP ve MEHP derişimleri gözlenebilme sınırlarının altında bulundu. Geri kazanım çalışmalarında ise analitlere ait geri kazanım değerleri sırasıyla MEP, MnBP ve MEHP için 97,45, 98,03 ve 104,12 olarak bulundu. Sonuç olarak, geliştirilen metotun ftalatlara maruziyetin belirlenmesi için umut vadetici bir yöntem olduğunu göstermektedir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

- ✓ MATrp monomeri, metakriloil klorürün L-triptofan metil esteri ile reaksiyonu sonucu sentezlendi. Elde edilen monomer, FTIR tekniği kullanılarak karakterize edildi.
- ✓ Dietil fitalat (DEP) baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerin sentezi için süspansiyon polimerizasyonu tekniği kullanıldı. En seçici mikrokürelerin hazırlanması amacıyla 2:1 oranında fonksiyonel monomer (MATrp) ve kalıp molekül (DEP) muamele edilerek ön kompleks hazırlandı. Polivinil alkol (sulu faz), kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı (EGDMA) ve başlatıcı (AIBN) ile sentez ortamı hazırlanarak polimerizasyon gerçekleştirildi.
- ✓ DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin karakterizasyonu için FTIR, SEM, BET ve XPS teknikleri kullanıldı. FTIR analizleri ile DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin yapısal karakterizasyonu gerçekleştirildi. SEM tekniği ile ise mikrokürelerinin morfolojik özellikleri incelendi ve mikrokürelerin küresel formda olduğu görüldü. BET analizi ile ise mikrokürelerin spesifik yüzey alanı, gözenek boyutu ve gözenek hacmi ile belirlendi. XPS analizi ile ise monomerin polimer yapısına başarıyla dâhil edildiği gösterildi.
- ✓ GC’de direkt olarak analiz edilemeyen fitalat monoesterlerinin uçucu türevlerine dönüştürülmesi için farklı türevlendirme ajanları (MSTFA ve BSTFA) denendi. Fitalat monoesterlerinin türevlendirilmesi için, en yüksek pik alanı veren ve kromatogram zemin gürültüsü en az olan MSTFA seçildi.
- ✓ Sentezlenen adsorbentler ile SPE kartuşunda, pH, elüsyon çözücüsü, kartuş hacmi, adsorbent miktarı, örnek hacmi ve tuz derişimi gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirildi.

- ✓ İlk olarak, DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikroküreler ile adsorpsiyonun pH üzerindeki etkisi incelendi. Bu amaçla 2-7 pH aralığında çalışıldı. Adsorpsiyonun artan pH ile azaldığı tespit edildi ve pik alanları değerlendirildiğinde tüm analitler için en yüksek adsorpsiyon sağlayan pH 2 değeri seçildi.
- ✓ Geliştirilen SPE metodu optimizasyonunda, kartuşa adsorbe olmuş analitlerin geri kazanılması için asetonitril, aseton, etil asetat, diklorometan ve hekzan olmak üzere farklı elüsyon çözücü türleri incelendi. Analizi sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde, tüm analitler için yüksek pik alanı veren aseton elüsyon çözücüsü olarak seçildi.
- ✓ Geliştirilen SPE metodu optimizasyonunda, adsorpsiyonun ticari kartuş üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 1 ve 3 mL'lik kartuşlar mikroküreler ile dolduruldu. GC-MS analizi sonucunda, 3 mL'lik kartuş hacminin genel olarak tüm analitler için yüksek pik alanlarına sahip olduğu için kartuş hacmi olarak 3 mL seçildi.
- ✓ Geliştirilen SPE metodu optimizasyonunda, farklı adsorbent miktarlarının (10 mg, 60 mg ve 100 mg) ekstraksiyon üzerindeki etkisi incelendi. Analizi sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde, 60 mg adsorbent içeren kartuşların tüm analitler için en yüksek pik alanları elde edildi.
- ✓ Geliştirilen SPE metodu optimizasyonunda, farklı örnek hacimlerinin (2, 3, 5 ve 10 mL) analitlere ait pik alanları üzerine etkisi incelendi. Analizi sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde, 5 mL örnek hacmiyle çalışıldığında tüm analit için en yüksek pik alanları elde edildi.
- ✓ Geliştirilen SPE metodu optimizasyonunda, farklı derişimlerde KCl içeren çözeltiler kullanıldı ve fitalat monoesterlerinin pik alanları üzerine tuz derişim etkisi incelendi. Analiz sonucunda pik alanları değerlendirildiğinde, tuz derişimi arttığında tüm analitler için ekstraksiyon veriminin azaldığı görüldü.

- ✓ Optimizasyonu gerçekleştirilen SPE metoduyla, ticari OASIS HLB kartuşu ile DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşunun pik alanları karşılaştırıldı. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] SPE kartuşuna ait pik alanlarının OASIS HLB kartuşuna kıyasla nispeten yüksek pik alanlarına sahip olduğu görüldü.
- ✓ İdrar matriksinde ilgili analitlerle girişim yapabilecek (proteinler, tuzlar ve çeşitli organik bileşikler) birçok bileşik mevcuttur. Ayrıca idrarda bulunan yoğun tuz derişimi, fitalat monoesterlerinin ekstraksiyon verimliliğini düşürmektedir. İdrar matriksini taklit etmesi için sentetik idrar kullanıldı. SPE’de ekstraksiyon verimliliğini artırılması için kartuş yıkama prosedürü ve sentetik idrar seyreltme oranı optimize edildi. Yüksek geri kazanım, 1:10 seyreltme oranının seçilmesi ve kartuşların 20 mL pH=2’ye ayarlanmış su ile yıkanmasıyla sağlandı.
- ✓ Baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] polimerlerin (MIP) seçiciliği DEP baskılanmamış poli[(EGDMA-MATrp)] polimerlerle karşılaştırıldı. Analiz sonucunda elde edilen pik alanları değerlendirildiğinde, tüm analitler için NIP’in pik alanları MIP’e göre nispeten daha düşük olduğu bulundu. DEP baskılanmış poli[(EGDMA-MATrp)] mikrokürelerinin fitalat monoesterleri için seçici olduğunu gösterir.
- ✓ SPE optimum koşullarında duyarlılık, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, gözlenebilme sınırı (GS), tayin sınırı (TS), gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik gibi validasyon parametreleri incelendi. 4-60 µg/L konsantrasyon aralığında tüm analitler için doğrusallık elde edildi ve korelasyon katsayıları kareleri 0,9778-0,9993 aralığında bulundu. Gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri, sırasıyla 0,04-1,20 µg/L ve 0,15-4,01 µg/L aralığında bulundu. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları değerleri yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile sırasıyla %1,11-2,29 ve %4,49-9,34 aralığında bulundu.

- ✓ Geliştirilen SPE metodu, gerçek idrar numunelerinde fitalat monoesterlerinin tayini için kullanıldı. Metodun uygulanabilirliğini göstermek amacıyla, gerçek idrar örneklerine derişimi 40 µg/L olacak şekilde standart karışımı (MEP, MnBP ve MEHP) eklendi ve optimum koşullar altında analiz edildi. Metot uygulandığında gerçek idrarda MEP, MnBP ve MEHP derişimleri gözlenebilme sınırlarının altında bulundu. Geri kazanım çalışmalarında ise analitlere ait geri kazanım değerleri sırasıyla MEP, MnBP ve MEHP için 97,45, 98,03 ve 104,12 olarak bulundu. Sonuç olarak, geliştirilen metotun fitalatlara maruziyetin belirlenmesi için umut vadetici bir yöntem olduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Adibi, J. J., Perera, F. P., Jedrychowski, W., Camann, D. E., Barr, D., Jacek, R., & Whyatt, R. M. (2003). Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environmental health perspectives*, 111(14), 1719-1722. <https://doi.org/10.1289/ehp.6235>
- Alp, A. C., & Yerlikaya, P. (2020). Phthalate ester migration into food: effect of packaging material and time. *European Food Research and Technology*, 246(3), 425-435. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03412-y>
- Alves, A., Vanermen, G., Covaci, A., & Voorspoels, S. (2016). Ultrasound assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME)—a fast new approach to measure phthalate metabolites in nails. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(22), 6169-6180. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9727-1>
- Alzaga, R., Peña, A., & Bayona, J. M. (2003). Determination of phthalic monoesters in aqueous and urine samples by solid-phase microextraction-diazomethane on-fibre derivatization-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 26(1-2), 87-96. <https://doi.org/10.1002/jssc.200390020>
- Anderson, W. A., Barnes, K. A., Castle, L., Damant, A. P., & Scotter, M. J. (2002). Determination of isotopically labelled monoesterphthalates in urine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 127(9), 1193-1197. <https://doi.org/10.1039/B200487A>
- Ansari, S., & Karimi, M. (2017). Recent progress, challenges and trends in trace determination of drug analysis using molecularly imprinted solid-phase microextraction technology. *Talanta*, 164, 612-625. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.007>
- Arabi, M., Ostovan, A., Bagheri, A. R., Guo, X., Wang, L., Li, J., Wang, X., Li, B., & Chen, L. (2020). Strategies of molecular imprinting-based solid-phase extraction prior to chromatographic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 128, 115923. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115923>
- Armenta, S., Esteve-Turrillas, F. A., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2021). Smart materials for sample preparation in bioanalysis: A green overview. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 100411. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100411>
- Arnold, S. M., Angerer, J., Boogaard, P. J., Hughes, M. F., O'Lone, R. B., Robison, S. H., Robert Schnatter, A. (2013). The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Critical reviews in toxicology*, 43(2), 119-153. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.756455>
- Asimakopoulou, A. G., Pasias, I. N., Kannan, K., Thomaidis, N. S. (2014). Human exposure to chemicals in personal care products and health implications. In *Personal Care Products in the Aquatic Environment* (s. 165-187). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/698_2014_301
- Autian, J. (1973). Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature. *Environmental health perspectives*, 4, 3-26. <https://doi.org/10.1289/ehp.73043>

- Bamai, Y. A., Araki, A., Kawai, T., Tsuboi, T., Yoshioka, E., Kanazawa, A., Cong, S., Kishi, R. (2015). Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(5), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.03.013>
- Bao, J., Wang, M., Ning, X., Zhou, Y., He, Y., Yang, J., Gao, X., Li, S., Ding, Z., Chen, B. (2015). Phthalate concentrations in personal care products and the cumulative exposure to female adults and infants in Shanghai. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(5), 325-341. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.968696>
- Been, F., Malarvannan, G., Bastiaensen, M., Yin, S., van Nuijs, A. L., & Covaci, A. (2019). Development and validation of a bioanalytical assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for measuring biomarkers of exposure of alternative plasticizers in human urine and serum. *Talanta*, 198, 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.024>
- Bergh, C., Torgrip, R., & Östman, C. (2010). Simultaneous selective detection of organophosphate and phthalate esters using gas chromatography with positive ion chemical ionization tandem mass spectrometry and its application to indoor air and dust. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(19), 2859-2867. <https://doi.org/10.1002/rcm.4690>
- Blount, B. C., Milgram, K. E., Silva, M. J., Malek, N. A., Reidy, J. A., Needham, L. L., & Brock, J. W. (2000). Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Analytical chemistry*, 72(17), 4127-4134. <https://doi.org/10.1021/ac000422r>
- Buszewski, B., & Szultka, M. (2012). Past, present, and future of solid phase extraction: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198-213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- Calafat, A. M., Koch, H. M., Swan, S. H., Hauser, R., Goldman, L. R., Lanphear, B. P., Longnecker, M. P., Rudel, R. A., Teitelbaum, S. L., Whyatt, R. M., & Wolff, M. S. (2013). Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Research*, 15(5), 1-2. <https://doi.org/10.1186/bcr3494>
- Calafat, A. M., Longnecker, M. P., Koch, H. M., Swan, S. H., Hauser, R., Goldman, L. R., Lanphear, B. P., Rudel, R. A., Engel, S. M., Teitelbaum, S. L., Whyatt, R. M., & Wolff, M. S. (2015). Optimal exposure biomarkers for nonpersistent chemicals in environmental epidemiology. *Environmental health perspectives*, 123(7), A166-A168. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510041>
- Calafat, A. M., McKee, R. H. (2006). Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environmental health perspectives*, 114(11), 1783-1789. <https://doi.org/10.1289/ehp.9059>
- Calafat, A. M., Slakman, A. R., Silva, M. J., Herbert, A. R., & Needham, L. L. (2004). Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *Journal of Chromatography B*, 805(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.006>
- Cantwell, F. F., & Losier, M. (2002). Liquid-liquid extraction. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 37, pp. 297-340). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80048-4)

- Chang, W. H., Herianto, S., Lee, C. C., Hung, H., & Chen, H. L. (2021). The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Science of the Total Environment*, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>
- Chang, Y. J., Lin, K. L., & Chang, Y. Z. (2013). Determination of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 420, 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.009>
- Chang-Liao, W. L., Hou, M. L., Chang, L. W., Lee, C. J., Tsai, Y. M., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2013). Determination and pharmacokinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Molecules*, 18(9), 11452-11466. <https://doi.org/10.3390/molecules180911452>
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical society reviews*, 45(8), 2137-2211. <https://doi.org/10.1039/C6CS00061D>
- Chen, M., Tao, L., Collins, E. M., Austin, C., & Lu, C. (2012). Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 904, 73-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.022>
- Cirillo, T., Fasano, E., Castaldi, E., Montuori, P., & Amodio Cocchieri, R. (2011). Children's exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate and dibutylphthalate plasticizers from school meals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(19), 10532-10538. <https://doi.org/10.1021/jf2020446>
- Del Bubba, M., Ancillotti, C., Checchini, L., Fibbi, D., Rossini, D., Ciofi, L., Rivoira, L., Profeti, C., Orlandini, S., Furlanetto, S. (2018). Determination of phthalate diesters and monoesters in human milk and infant formula by fat extraction, size-exclusion chromatography clean-up and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 148, 6-16. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.017>
- Dewalque, L., Pirard, C., Dubois, N., & Charlier, C. (2014). Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 949, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.002>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dima, A. P., De Santis, L., Verlengia, C., Lombardo, F., Lenzi, A., Mazzarino, M., Botrè, F., & Paoli, D. (2020). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of phthalates and bisphenol a in serum, urine and follicular fluid. *Clinical Mass Spectrometry*, 18, 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.10.002>

- Dirven, H. A. A. M., Van Den Broek, P. H. H., & Jongeneelen, F. J. (1993). Determination of four metabolites of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate in human urine samples. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 64(8), 555-560. <https://doi.org/10.1007/BF00517700>
- Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G., & Rudel, R. A. (2012). Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environmental health perspectives*, 120(7), 935-943. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104052>
- Dong, R., Zhou, T., Zhao, S., Zhang, H., Zhang, M., Chen, J., Wang, M., Wu, M., Li, S., & Chen, B. (2017). Food consumption survey of Shanghai adults in 2012 and its associations with phthalate metabolites in urine. *Environment international*, 101, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.008>
- Eales, J., Bethel, A., Galloway, T., Hopkinson, P., Morrissey, K., Short, R. E., & Garside, R. (2022). Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environment International*, 158, 106903. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>
- Elliani, R., Naccarato, A., Malacaria, L., & Tagarelli, A. (2020). A rapid method for the quantification of urinary phthalate monoesters: A new strategy for the assessment of the exposure to phthalate ester by solid-phase microextraction with gas chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, 43(15), 3061-3073. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000316>
- FDA, U., & Food and Drug Administration. (2001). Safety assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from PVC medical devices. Center for Devices and Radiological Health. US Food and Drug Administration.
- Feng, X. L., Lu, S. Y., Liu, D., Li, L., Wu, X. Z., Song, J., Hu, P., Li, Y. S., Tang, F., Li, Z. H., Wang, G. M., Zhou, Y., Liu, Z. S., Ren, H. L. (2013). Direct competitive immunosorbent assay for detection of MEHP in human urine. *Chemosphere*, 92(1), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.062>
- Feng, Y. L., & Zhu, J. (2008). Constant pressure-assisted electrokinetic injection for on-line enhanced detection of monophthalates in capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to human urine. *Electrophoresis*, 29(10), 1965-1973. <https://doi.org/10.1002/elps.200700773>
- Feng, Y. L., Liao, X., Grenier, G., Nguyen, N., & Chan, P. (2015). Determination of 18 phthalate metabolites in human urine using a liquid chromatography-tandem mass spectrometer equipped with a core-shell column for rapid separation. *Analytical Methods*, 7(19), 8048-8059. <https://doi.org/10.1039/C5AY00107B>
- Fernandez, M. A. M., André, L. C., de Lourdes Cardeal, Z. (2017). Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1481, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.043>
- Fierens, T., Servaes, K., Van Holderbeke, M., Geerts, L., De Henauw, S., Sioen, I., & Vanermen, G. (2012). Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2575-2583. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.029>

- Frederiksen, H., Jørgensen, N., & Andersson, A. M. (2010). Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 34(7), 400-410. <https://doi.org/10.1093/jat/34.7.400>
- Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2007). Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(7), 899-911. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600243>
- Fu, X., & Du, Q. (2011). Uptake of di-(2-ethylhexyl) phthalate of vegetables from plastic film greenhouses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11585-11588. <https://doi.org/10.1021/jf203502e>
- Giovanoulis, G., Bui, T., Xu, F., Papadopoulou, E., Padilla-Sanchez, J. A., Covaci, A., Haug, L.S., Cousins, A.P., Magnér, J., Cousins, I.T., de Wit, C. A. (2018). Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. *Environment international*, 112, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.016>
- Gong, M., Weschler, C. J., & Zhang, Y. (2016). Impact of clothing on dermal exposure to phthalates: observations and insights from sampling both skin and clothing. *Environmental science & technology*, 50(8), 4350-4357. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00113>
- Gries, W., Ellrich, D., Küpper, K., Ladermann, B., & Leng, G. (2012). Analytical method for the sensitive determination of major di-(2-propylheptyl)-phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 908, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.019>
- Grob, R. L., & Barry, E. F. (Eds.). (2004). *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons.
- Grover, P. K., & Ryall, R. L. (2005). Critical appraisal of salting-out and its implications for chemical and biological sciences. *Chemical reviews*, 105(1), 1-10. <https://doi.org/10.1021/cr030454p>
- Guo, Z. Y., Gai, P. P., Duan, J., Zhai, J. X., Zhao, S. S., Wang, S., & Wei, D. Y. (2010). Simultaneous determination of phthalates and adipates in human serum using gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. *Biomedical chromatography*, 24(10), 1094-1099. <https://doi.org/10.1002/bmc.1410>
- Hauser, R., & Calafat, A. M. (2005). Phthalates and human health. *Occupational and environmental medicine*, 62(11), 806-818. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.2004.017590>
- Herrero, L., Calvarro, S., Fernández, M. A., Quintanilla-López, J. E., González, M. J., & Gómara, B. (2015). Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples. *Analytica chimica acta*, 853, 625-636. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.043>
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(5), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>

- Holm, A., Solbu, K., Molander, P., Lundanes, E., Greibrokk, T. (2004). Sensitive biomonitoring of phthalate metabolites in human urine using packed capillary column switching liquid chromatography coupled to electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(7), 1762-1768. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2488-7>
- Högberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., Filipsson, A.F., Jansson, B., Johansson, N., Appelgren M., Håkansson, H. (2008). Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental health perspectives*, 116(3), 334-339. <https://doi.org/10.1289/ehp.10788>
- Hu, T., Chen, R., Wang, Q., He, C., & Liu, S. (2021). Recent advances and applications of molecularly imprinted polymers in solid-phase extraction for real sample analysis. *Journal of Separation Science*, 44(1), 274-309. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000832>
- Huang, C., Yang, J., Ma, J., Tan, W., Wu, L., Shan, B., Wang, S., Chen, J., & Li, Y. (2022). An efficient mixed-mode strong anion-exchange adsorbent based on functionalized polyethyleneimine for simultaneous solid phase extraction and purification of bisphenol analogues and monoalkyl phthalate esters in human urine. *Microchemical Journal*, 180, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107536>
- Hubinger, J. C., & Havery, D. C. (2006). Analysis of consumer cosmetic products for phthalate esters. *Journal of cosmetic science*, 57(2), 127-137.
- Huck, C. W., & Bonn, G. K. (2000). Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 51-72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00333-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00333-2)
- James, A. T., & Martin, A. J. (1952). Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*, 50(5), 679. <https://doi.org/10.1042/bj0500679>
- Jones, L., & Regan, F. (2019). Endocrine disrupting chemicals. [doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14512-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14512-3)
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(1), 241-258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Karasek, F. W., & Clement, R. E. (2012). *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Elsevier.
- Karthikraj, R., Kannan, K. (2018). Human biomonitoring of select ingredients in cosmetics. In *Analysis of cosmetic products* (s. 387-434). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00015-1>
- Kato, K., Silva, M. J., Brock, J. W., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Nakazawa, H., Needham, L. L., & Barr, D. B. (2003). Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 27(5), 284-289. <https://doi.org/10.1093/jat/27.5.284>

- Kato, K., Silva, M. J., Reidy, J. A., Hurtz 3rd, D., Malek, N. A., Needham, L. L., Nakazawa, H., Barr, D.B., & Calafat, A. M. (2004). Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental health perspectives*, 112(3), 327-330. <https://doi.org/10.1289/ehp.6663>
- Katsikantami, I., Sifakis, S., Tzatzarakis, M. N., Vakonaki, E., Kalantzi, O. I., Tsatsakis, A. M., & Rizos, A. K. (2016). A global assessment of phthalates burden and related links to health effects. *Environment international*, 97, 212-236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.013>
- Katsikantami, I., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Karzi, V., Hatzidaki, E., Stavroulaki, A., Vakonaki, E., Xezonaki, P., Sifakis, S., Rizos, A. K., & Tsatsakis, A. M. (2020). Phthalate metabolites concentrations in amniotic fluid and maternal urine: cumulative exposure and risk assessment. *Toxicology reports*, 7, 529-538. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.008>
- Kay, V. R., Chambers, C., & Foster, W. G. (2013). Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. *Critical reviews in toxicology*, 43(3), 200-219. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.766149>
- Kim, M., Song, N. R., Choi, J. H., Lee, J., & Pyo, H. (2014). Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Science of the total environment*, 470, 1408-1413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.037>
- Kim, S., Lee, J., Park, J., Kim, H. J., Cho, G., Kim, G. H., Eun, S. H., Lee, J. J., Choi, G., Suh, E., Choi, S., Kim, S., Kim, Y. D., Kim, S. K., Kim, S. Y., Kim, S., Eom, S., Moon, H. B., Kim, S., Choi, K. (2015). Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: Estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Science of The Total Environment*, 508, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.019>
- Kim, U. J., Karthikraj, R. (2021). Solid-phase microextraction for the human biomonitoring of environmental chemicals: Current applications and future perspectives. *Journal of Separation Science*, 44(1), 247-273. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000830>
- Koch, H. M., Gonzalez-Reche, L. M., & Angerer, J. (2003). On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 784(1), 169-182. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00785-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00785-7)
- Kondo, F., Ikai, Y., Hayashi, R., Okumura, M., Takatori, S., Nakazawa, H., Izumi, S. I., & Makino, T. (2010). Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 85(1), 92-96. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0051-8>
- Kranvogel, R., Knez, J., Miuc, A., Vončina, E., Vončina, D. B., & Vlaisavljević, V. (2014). Simultaneous determination of phthalates, their metabolites, alkylphenols and bisphenol A using GC-MS in urine of men with fertility problems. *Acta Chimica Slovenica*, 61(1).

- Kumar, A. R., & Sivaperumal, P. (2016). Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.008>
- Kyle, P. B. (2017). Toxicology: GCMS. In *Mass spectrometry for the clinical laboratory* (pp. 131-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9>
- Lake, B. G., Phillips, J. C., Linnell, J. C., Gangolli, S. D. (1977). The in vitro hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 39(2), 239-248. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(77\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0041-008X(77)90157-0)
- Latini, G. (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, 361(1-2), 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.003>
- Legler, J., Fletcher, T., Govarts, E., Porta, M., Blumberg, B., Heindel, J. J., & Trasande, L. (2015). Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(4), 1278-1288. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4326>
- Li, D., Suh, S. (2019). Health risks of chemicals in consumer products: A review. *Environment international*, 123, 580-587. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.033>
- Li, L., Cui, Y., Ren, L., Li, C., Liu, Y., & Jin, Z. (2021). Magnetic dummy molecularly imprinted polymer nanoparticles as sorbent for dispersive solid-phase microextraction of phthalate monoesters in human urine samples. *Microchemical Journal*, 167, 106266. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106266>
- Liang, D. W., Zhang, T., Fang, H. H., & He, J. (2008). Phthalates biodegradation in the environment. *Applied microbiology and Biotechnology*, 80(2), 183-198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
- Lyche, J. L. (2017). Phthalates. In *Reproductive and developmental toxicology* (pp. 829-856). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00044-5>
- Ma, T. T., Wu, L. H., Chen, L., Zhang, H. B., Teng, Y., & Luo, Y. M. (2015). Phthalate esters contamination in soils and vegetables of plastic film greenhouses of suburb Nanjing, China and the potential human health risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(16), 12018-12028. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4401-2>
- Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., Neto, E. S., Nazario, C. E. D., & Lancas, F. M. (2019). New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115633. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115633>
- Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., Neto, E. S., Nazario, C. E. D., & Lancas, F. M. (2019). New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115633. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115633>

- Majumdar, J. K. (2005). Commonly encountered analytical problems and their solutions in liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) methods used in drug development. In *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 6, pp. 35-64). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1464-3456\(05\)80005-5](https://doi.org/10.1016/S1464-3456(05)80005-5)
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology letters*, 217(1), 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
- Martens, F., & Martens, M. (2002). Determination des metabolites monoester de butylbenzyl-phthalate (bbp) par gcms dans les urines de personnes exposees: analysis of the monoester metabolites of butylbenzyl phthalate by gc-ms in urine of exposed workers. *Acta Clinica Belgica*, 57(sup1), 16-23. <https://doi.org/10.1179/acb.2002.071>
- Mazzeo, P., Pasquale, D. D., Ruggieri, F., Fanelli, M., D'Archivio, A. A., & Carlucci, G. (2007). HPLC with diode-array detection for the simultaneous determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in seminal plasma. *Biomedical chromatography*, 21(11), 1166-1171. <https://doi.org/10.1002/bmc.870>
- McNair, H. M., Miller, J. M., & Snow, N. H. (2019). *Basic gas chromatography*. John Wiley & Sons.
- Mohd, M. A. (Ed.). (2012). *Advanced gas chromatography: progress in agricultural, biomedical and industrial applications*. BoD–Books on Demand.
- Mortensen, G. K., Main, K. M., Andersson, A. M., Leffers, H., & Skakkebaek, N. E. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(4), 1084-1092. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3218-0>
- Mosbach, K., Ramström, O. (1996). The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/technology*, 14(2), 163-170. <https://doi.org/10.1038/nbt0296-163>
- Mose, T., Mortensen, G. K., Hedegaard, M., & Knudsen, L. E. (2007). Phthalate monoesters in perfusate from a dual placenta perfusion system, the placenta tissue and umbilical cord blood. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.006>
- Nassan, F. L., Coull, B. A., Gaskins, A. J., Williams, M. A., Skakkebaek, N. E., Ford, J. B., Calafat, A.M., Braun, J.M., Hauser, R. (2017). Personal care product use in men and urinary concentrations of select phthalate metabolites and parabens: results from the environment and reproductive health (EARTH) study. *Environmental health perspectives*, 125(8), 087012. <https://doi.org/10.1289/EHP1374>
- Niino, T., Ishibashi, T., Itho, T., Sakai, S., Ishiwata, H., Yamada, T., & Onodera, S. (2002). Simultaneous determination of phthalate di-and monoesters in poly (vinylchloride) products and human saliva by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 780(1), 35-44. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00413-0](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00413-0)

- Nuti, F., Hildenbrand, S., Chelli, M., Wodarz, R., Papini, A. M. (2005). Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC–MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(10), 3461-3465. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.03.005>
- Orecchio, S., Indelicato, R., Barreca, S. (2014). Determination of selected phthalates by gas chromatography–mass spectrometry in mural paintings from Palermo (Italy). *Microchemical Journal*, 114, 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.11.015>
- Öner, E., Kurutaş, E.B., Demirhan, İ., & Güngör, M. (2022). Bitki Ekstrelerinde Oksidatif Stres Biyobelirteçleri için Yöntem Performansının Değerlendirilmesi ve Biyolojik Varyasyonlar: Metot Validasyon Çalışması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(5), 965-973. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.997048>
- Özer, E. T., Osman, B., & Yazıcı, T. (2017). Dummy molecularly imprinted microbeads as solid-phase extraction material for selective determination of phthalate esters in water. *Journal of Chromatography A*, 1500, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.013>
- Page, B. D., & Lacroix, G. M. (1995). The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985–1989: A survey. *Food Additives & Contaminants*, 12(1), 129-151. <https://doi.org/10.1080/02652039509374287>
- Peng, F., Ji, W., Zhu, F., Peng, D., Yang, M., Liu, R., Pu, Y., & Yin, L. (2016). A study on phthalate metabolites, bisphenol A and nonylphenol in the urine of Chinese women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Environmental research*, 150, 622-628. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.003>
- Petersen, J. H., & Breindahl, T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Additives & Contaminants*, 17(2), 133-141. <https://doi.org/10.1080/026520300283487>
- Plotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de La Guardia, M., & Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 23-43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 362-373. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8)
- Promtes, K., Kaewboonchoo, O., Kawai, T., Miyashita, K., Panyapinyopol, B., Kwonpongsagoon, S., & Takemura, S. (2019). Human exposure to phthalates from house dust in Bangkok, Thailand. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 54(13), 1269-1276. <https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1637207>
- Przybylinska, P. A., & Wyszowski, M. (2016). Environmental contamination with phthalates and its impact on living organisms. *Ecological Chemistry and Engineering*, 23(2), 347. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0024>
- Rastkari, N., & Ahmadkhaniha, R. (2013). Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of phthalate monoesters in urine samples. *Journal of chromatography A*, 1286, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.070>

- Ros, O., Aguirre, J., Prieto, A., Olivares, M., Etxebarria, N., Vallejo, A. (2015). Simultaneous enzymatic hydrolysis and extraction of endocrine-disrupting chemicals in fish bile using polyethersulfone polymer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(24), 7413-7423. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8905-x>
- Rowland, I. R., Cottrell, R. C., Phillips, J. C. (1977). Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food and cosmetics toxicology*, 15(1), 17-21. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(77\)80257-5](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(77)80257-5)
- Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., & Brody, J. G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science & technology*, 37(20), 4543-4553. <https://doi.org/10.1021/es0264596>
- Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2003). Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 125-151. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00305-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00305-4)
- Sargazi, S., Mirzaei, R., Rahmani, M., Mohammadi, M., Khammari, A., & Sheikh, M. (2017). One-step in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction and GC-FID determination of trace amounts of di (2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite in human urine samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(5), 557-561. <https://doi.org/10.1134/S1061934817050100>
- Sarigul, N., Korkmaz, F., & Kurultak, İ. (2019). A new artificial urine protocol to better imitate human urine. *Scientific reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4>
- Sathyanarayana, S. (2008). Phthalates and Children's Health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 38(2), 34–49.
- Sellergren, B. (1994). Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. *Analytical chemistry*, 66(9), 1578-1582. <https://doi.org/10.1021/ac00081a036>
- Serrano, S. E., Braun, J., Trasande, L., Dills, R., & Sathyanarayana, S. (2014). Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environmental Health*, 13(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-43>
- Silva, M. J., Malek, N. A., Hodge, C. C., Reidy, J. A., Kato, K., Barr, D. B., Needham, L. L., & Brock, J. W. (2003). Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 393-404. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00164-8)
- Silva, M. J., Reidy, J. A., Herbert, A. R., Preau, J. L., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2004). Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 72(6), 1226-1231. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0374-4>
- Silva, M. J., Reidy, J. A., Samandar, E., Herbert, A. R., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2005a). Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Archives of toxicology*, 79(11), 647-652. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0674-4>

- Silva, M. J., Samandar, E., Preau Jr, J. L., Reidy, J. A., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2005b). Automated solid-phase extraction and quantitative analysis of 14 phthalate metabolites in human serum using isotope dilution-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 29(8), 819-824. <https://doi.org/10.1093/jat/29.8.819>
- Song, P., Gao, J., Li, X., Zhang, C., Zhu, L., Wang, J., & Wang, J. (2019). Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Environment international*, 129, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.074>
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2011). Chapter 2-gas chromatography. *Gas chromatography and mass spectrometry*, 2, 15-83.
- Staples, C. A., Peterson, D. R., Parkerton, T. F., & Adams, W. J. (1997). The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, 35(4), 667-749. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00195-1)
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). *Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. Fire Debris Analysis*, 235–293.
- Tabb, M. M., & Blumberg, B. (2006). New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular endocrinology*, 20(3), 475-482. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0513>
- Tankiewicz, M., Olkowska, E., Berg, A., & Wolska, L. (2020). Advancement in determination of phthalate metabolites by gas chromatography eliminating derivatization step. *Frontiers in chemistry*, 7, 928. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00928>
- Tranfo, G., Caporossi, L., Paci, E., Aragona, C., Romanzi, D., De Carolis, C., De Rosa, M., Capanna, S., Papaleo, B., Pera, A. (2012). Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems. *Toxicology letters*, 213(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.033>
- Tsochatzis, E. D., Tzimou-Tsitouridou, R., & Gika, H. G. (2017). Analytical methodologies for the assessment of phthalate exposure in humans. *Critical reviews in analytical chemistry*, 47(4), 279-297. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1273754>
- Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Saito, I., Sakai, H., Kobayashi, Y., & Tonogai, Y. (2001). Eleven phthalate esters and di (2-ethylhexyl) adipate in oneweek duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake. *Food Additives & Contaminants*, 18(5), 449-460. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030117484>
- Urkude, R., Dhurvey, V., & Kochhar, S. (2019). Pesticide residues in beverages. In *Quality control in the Beverage industry* (pp. 529-560). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00015-1>
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoì, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5908-5945. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- Wade Jr, L. G. (2013). *Organic Chemistry Eight Edition*.
- Wallner, P., Kundi, M., Hohenblum, P., Scharf, S., & Hutter, H. P. (2016). Phthalate metabolites, consumer habits and health effects. *International journal of environmental research and public health*, 13(7), 717. <https://doi.org/10.3390/ijerph13070717>

- Wang, L., Wu, Z., Gong, M., Xu, Y., & Zhang, Y. (2020). Non-dietary exposure to phthalates for pre-school children in kindergarten in Beijing, China. *Building and Environment*, 167, 106438. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.106438>
- Wang, Y., Zhu, H., & Kannan, K. (2019). A review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics*, 7(2), 21. <https://doi.org/10.3390/toxics7020021>
- Wild, C. P. (2005). Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(8), 1847-1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>
- Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., & Hungerbühler, K. (2006). What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans?. *Risk Analysis*, 26(3), 803-824. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x>
- Wu, J., Ye, Z., Li, X., Wang, X., Luo, F., Sheng, B., Li, Y., & Lyu, J. (2016). Optimization of a NH₄PF₆-enhanced, non-organic solvent, dual microextraction method for determination of phthalate metabolites in urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1014, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.024>
- Wulff, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(17), 1812-1832. <https://doi.org/10.1002/anie.199518121>
- Yan, H., & Row, K. H. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International journal of molecular Sciences*, 7(5), 155-178. <https://doi.org/10.3390/i7050155>
- Yang, J., Li, Y., Wang, Y., Ruan, J., Zhang, J., & Sun, C. (2015). Recent advances in analysis of phthalate esters in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 72, 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.018>
- Yao, C., Wang, J., Chan, P., & Feng, Y. L. (2018a). A novel non-targeted screening method for urinary exposure biomarker discovery of phthalates using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 10(9), 959-967. <https://doi.org/10.1039/C7AY02941A>
- Yao, Y., Shao, Y., Zhan, M., Zou, X., Qu, W., & Zhou, Y. (2018b). Rapid and sensitive determination of nine bisphenol analogues, three amphenicol antibiotics, and six phthalate metabolites in human urine samples using UHPLC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(16), 3871-3883. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1062-2>
- Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., & Kelestimur, F. (2019). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21(1), 127–147. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z>
- You, H. H., & Song, G. (2021). Review of endocrine disruptors on male and female reproductive systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 109002. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109002>

- Zhang, Y. J., Guo, J. L., Xue, J. C., Bai, C. L., & Guo, Y. (2021). Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environmental Pollution*, 118106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118106>
- Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Woodruff T. J. & Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097-4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>
- Żwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5).

