

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN

**ATIK SUDA KAFEİN ANALİZİ İÇİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ-ARDIŞIK KÜTLE
SPEKTROMETRESİ İLE YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager YELİZ ARPACIK

İSTANBUL, 2019

TEŞEKKÜR

Bana akademik bir bakış açısı sağlayan ve bu çalışmanın her aşamasında desteğini, anlayışını ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN'a

Laboratuvar çalışmalarındaki desteği ve her türlü yardımı için Kimyager Tuğba TEKİN'e,

Her zaman yanımda ve arkamda olduklarını bildiğim anneme, babama, kardeşime

Tez çalışmam süresince bana hep güç veren, her türlü imkanı sağlayan, teknik bilgisini ve yardımlarını benden esirgemeyen başta şefim Sayın Kimyager Çağrı ÖZALP, Sayın Ziraat Mühendisi Gülten ERBAŞ ve Sayın Gıda Mühendisi Ahmet ÖĞÜT olmak üzere İstanbul 1 No'lu Halk Sağlığı Laboratuvarı Kimya Birimindeki çalışma arkadaşlarıma

En içten teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Yeliz ARPACIK

Mayıs 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kafein	4
2.1.1. Kafein Tüketimi	6
2.1.2. Kafein Metabolizması ve Etki Mekanizması	11
2.1.3. Kafein Tüketiminin Sağlığa Olan Etkileri	18
2.2. Atık Sularda Kafein Analizi	22
2.2.1. Atık Suya Dayalı Epidemiyolojik Yaklaşım ve Adli Bilimler	22
2.2.2. Beşeri Biyobelirteçler	26
2.2.3. Kafeinin Popülasyon Değerlendirmesinde Kullanılması.....	28
2.2.4. Yüzey suları ve Kafein.....	31
2.3. Kromatografi	35
2.3.1. Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	36
2.4. Geçerli Kılma (Validasyon) Çalışması.....	41
2.4.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)	44
2.4.2. Doğruluk (Accuracy)	44
2.4.2.1. Gerçeklik	44
2.4.2.2. Kesinlik (Precision).....	44
2.4.3. Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma aralığı (Range).....	45
2.4.4.Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ).....	46
2.4.5. Sağlamlık (Robustness)	46
2.5. Ölçüm Belirsizliği.....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	48
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Gereçler	48
3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	49

3.3.	Standart Çözeltiler.....	49
3.3.1.	Kafein standart çözeltisi	49
3.3.2.	İç standart (IS) Çözeltisi.....	50
3.3.3.	Doğrusallık ve doğruluk çalışmaları için hazırlanan çözeltiler.....	50
3.4.	Çekitleme yöntemi	51
3.5.	Yöntemin LC-MS/MS Sistemi ile Geliştirilmesi	52
3.5.1.	MS/MS Sistem Özellikleri.....	53
3.5.2.	Sıvı Sistem Özellikleri	54
3.6	Validasyon Çalışmaları.....	54
3.6.1.	Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)	54
3.6.2.	Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ).....	55
3.6.3.	Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range).....	56
3.6.4.	Doğruluk (Accuracy)	56
3.6.4.1.	Keskinlik (Precision).....	57
3.6.4.2.	Gerçeklik	57
3.6.5.	Sağlamlık (Robustness)	58
3.7.	Ölçüm Belirsizliği.....	58
4.	BULGULAR	61
4.1.	Seçicilik	61
4.2.	Tespit ve Tayin Limiti.....	64
4.3.	Doğrusallık	65
4.4.	Doğruluk Çalışmaları	66
4.5.	Sağlamlık.....	70
4.6.	Ölçüm Belirsizliği	71
4.7.	Çekitleme Verimliliği.....	73
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	75
6.	KAYNAKLAR	81
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	90

TABLO LİSTESİ

Tablo I. Bazı yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarları.....	6
Tablo II. Bazı İçecek Gruplarında Kafein Miktarı.....	7
Tablo III. Bazı Bitkilerdeki Kafein Miktarları.....	8
Tablo IV. Farklı Ülkelerde Yetişen Yerba Mate Çaylarının İçindeki Kafein Miktarları	8
Tablo V. Çeşitli Ülkelerde Günlük Ortalama Kafein Tüketimi	9
Tablo VI. Kafein ve bazı metabolitlerinin atılım profili	16
Tablo VII. Kafein metabolizma hızına etki eden faktörler	17
Tablo VIII. Potansiyel Atık Su Biyobelirteçleri	27
Tablo IX. Yöntemin geçerli kılınması parametreleri	42
Tablo X: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Gereçler	48
Tablo XI: Laboratuvar çalışmalarında kullanılan kimyasallar.....	49
Tablo XII. MS/MS sistem parametreleri.....	53
Tablo XIII. LC sistem parametreleri.....	54
Tablo XIV. Mobil fazın zamana göre akış değişimi	54
Tablo XV. CAF için LOD ve LOQ değerleri.....	64
Tablo XVI. Tespit Limiti Doğrulaması	64
Tablo XVII. Tayin Limiti Doğrulaması	64
Tablo XVIII. 500-100000 ng/L aralığında çizilmiş kalibrasyon eğrisinin denklemi, korelasyon katsayısı, F değeri	65
Tablo XIX. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin gün içi ölçümleri	67
Tablo XX. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları	67
Tablo XXI. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin günler arası ölçümleri	68
Tablo XXII. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin günler arasındaki tekrarlanabilirlik sonuçları	69
Tablo XXIII. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin Geri Kazanımları	69
Tablo XXIV. Kolon sıcaklığı değişimi etkisi	70
Tablo XXV. Farklı analist çalışmasının yönteme etkisi.....	70
Tablo XXVI. Oda sıcaklığı, -4°C ve -20°C’de CAF çözeltisi kararlılığı	71
Tablo XXVII. Bias Belirsizliği	72
Tablo XXVIII. Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği.....	72
Tablo XXIX. Belirsizlik Kaynakları ve Genişletilmiş Bağlı Standart Belirsizlik	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kafein Kimyasal Yapısı	4
Şekil 2.2. Kafein İçeren Bitkiler	5
Şekil 2.3. Paraksantin, Teobromin, Teofilin maddelerinin kimyasal yapıları	12
Şekil 2.4. Kafein Metabolizması	12
Şekil 2.5. İnsan metabolizmasında kafeinin metabolik yolu	14
Şekil 2.6. SCORE oluşumuna katılan ülke ve şehir sayısı.....	25
Şekil 2.7. Kromatografik Ayırım Modeli	35
Şekil 2.8. LC-MS sistem birimleri	37
Şekil 2.9. Kütle Spektrometresi kısımları	37
Şekil 2.10. Moleküler iyon oluşumu, Moleküler iyonun parçalanması	38
Şekil 2.11. Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS)	39
Şekil 2.12. Validasyon ve Verifikasyon Ayırımı	43
Şekil 3.1. Çekitleme Düzenegi.....	52
Şekil 4.1. MeOH, CAF, Kokain-d ₃ pikleri ve alıkonma zamanları.....	63
Şekil 4.2. Kalibrasyon Eğrisi	66
Şekil 4.3. Çekitleme verimliliği CAF pik alanı karşılaştırılması.....	74

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

5-HIAA: 5- Hidroksiindolasetik asit

6-MAM: 6- Monoasetilmorfin

AAMU: 5-Asetilamino-6-Amino-3-Metilürasil

AFP: A-Fetoprotein

AFMU: 5-Asetilamino-6-Formilamino-3-Metilürasilin

AMP: Adenozin Mono Fosfat

APCI: Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon

API: Atmosferik Basınç İyonizasyon

ASAP-SCIM: Kanalizasyon Kimyasallarını Kullanarak Popülasyon Analizi Yapılması
(Analysis Of Small-Area Populations By Sewage Chemical-Information Mining)

b: Kalibrasyon Eğrisi Eğimi

BOİ: Biyolojik Oksijen İhtiyacı

CAF: Kafein

CEA: Karsinoembriyonik Antijen

CI: Kimyasal İyonizasyon

CV: Değişkenlik Katsayısı

Cbk: Biyobelirtecın Konsantrasyonu

Cf: Hedef Madde Düzeltme Faktörü

Ctr: Atık Sudaki Hedef Madde Konsantrasyonu

DDD: Biyobelirteç İçin Tanımlanmış Günlük Doz

ER: Biyobelirtecın Vücuttan Atılım Hızı

EDC: Endokrin/Üreme Sistemini Bozan Kimyasallar

EMCDDA: Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi

ESI: Elektrosprey İyonizasyon

F: Kanalizasyon Sistemindeki Atık Suyun Akış Hızı

FAB: Hızlı Atom Bombardımanı

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FEUDS: Kanalizasyondaki İlaç Verileriyle Adli Epidemiyoloji (Forensic Epidemiology
Using Drugs in Sewage)

GRAS: ABD Gıda ve İlaç Kurumu tarafından güvenli olarak tanımlanan (Generally Recognized As Safe)

IS: İç Standart

KOI: Kimyasal Oksijen İhtiyacı

L: Litre

LC: Sıvı Kromatografisi

LC-MS/MS: Sıvı Kütle Ardışık Kütle spektrometresi

LOD: Tespit Limiti

LOQ: Tayin Limiti

MALDI: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu

MDMA: 3,4 Metilendioksi-N-Metilamfetamin, Ekstazi

MeOH: Metanol

MS: Kütle Spektrometresi

MSA: Manyetik Sektör Analizörü

mg: Miligram,

µg: Mikrogram

mL: Mililitre

µL: Mikrolitre

MRM: Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring)

n: Ölçüm Sayısı

N: Toplam Ölçüm Sayısı

ng: Nanogram

p: Kalibrasyon Eğrisinde Her Bir Konsantrasyon İçin Okuma Sayısı

PhAC: Farmasötik Olarak Aktif Bileşik

ppb: Milyarda Bir Birim

PPCP: Tıbbi İlaçlar ve Kişisel Bakım Ürünleri

ppm: Milyonda Bir Birim

ppt: Binde Bir Birim

PXT: Paraksantin

Q: Kuadropol Kütle Analizörü

r²: Korelasyon katsayısı

r: Tekrarlanabilirlik

R: Tekrarüretilebilirlik

RSD: Relatif Standart Sapma

RSDpool: Hesaplanan Tüm Relatif Standart Sapma Değerlerinin Birleştirilmesi

RSDwr: Günler Arası Relatif Standart Sapma

SCORE: Avrupa Atık Su Analizleri Grubu (Sewage Analysis COREGroup Europe)

SD: Standart Sapma

SIM: Seçili İyon İzleme (Selected/Single Ion Monitoring)

SRM: Seçili Reaksiyon İzleme (Selected Reaction Monitoring)

t_R (RT): Alıkonma zamanı

TOF: Zaman-yol Bağımlı Analizör

u: Standart Belirsizlik

u_c: Birleştirilmiş Bağlı Standart Belirsizlik

U: Genişletilmiş Bağlı Standart Belirsizlik

WBE: Atık Suya Dayalı Epidemiyolojik Yaklaşım

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Xi: Ölçüm sonucu

Xo: Kalibrasyon Aralığının Ortasına Denk Gelen Bir Konsantrasyon Değeri

Xr: Ölçüm Sonuçlarının Ortalaması

ÖZET

Tüketilen veya maruz kalınan kimyasalların ve metabolitlerinin atık suda analizine dayanan ve toplumla ilgili pek çok bilgiye ulaşılmasını sağlayan çalışmalar, atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşım (WBE) olarak adlandırılır. Kafein tüketiminin çok eski tarihlere dayanması ve ana kaynağı olan kahvenin popülaritesinin giderek artması atık sularda kafein ve metabolitlerine rastlamayı mümkün kılmaktadır. Buna kafeinin kararlılığının iyi olması, sadece beşeri faaliyetleri yansıtmaması gibi özellikleri de eklenince, atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşım temelli çalışmalar için kafein önemli bir biyobelirteç haline gelmektedir. Beşeri biyobelirteçler, WBE temelli çalışmalarda popülasyon büyüklüğü ve dinamiği hakkında bilgi sağlar. Ayrıca kafein antropojenik bir belirteç olduğundan yüzey sularında varlığı suların kirlendiğinin de göstergesidir. Bu yüzden atık sularda kafein için hızlı ve güvenilir bir yöntem oluşturmak ve geliştirmek önemlidir. Bu çalışmada da suda kafein analizi için son zamanlarda kullanımı giderek artan Sıvı Kütlesi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile doğrulama gerektirmeyen, düşük tayin limitine sahip, hızlı ve güvenilir bir yöntem oluşturma ve geçerli kılma çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi parametreleri ile akış programı ayarlanan yöntemde; seçicilik, analitik duyarlılık, tespit ve tayin limiti, doğrusalılık, doğruluk ve sağlamlık gibi geçerli kılma parametreleri çalışılmıştır. Tespit Limiti (LOD) 200 ng/L, Tayin Limiti (LOQ) 500 ng/L olarak hesaplanmış; 500-100000 ng/L doğrusal aralıkta, r^2 0,997 ile doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Tüm çalışmalarda %RSD <10; farklı günlerde ve farklı konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda geri kazanım %87-109 arasında bulunmuştur. Ön işlem gerektiren bu yöntemde 50000 ng/L konsantrasyon ile zenginleştirme yapılan çeşme suyu numuneleri, katı faz çekitleme işlemine tabi tutulmuş; çekitleme işleminden verimlilik ortalama %93,34 olarak bulunmuştur. Geliştirilen bu yöntemde atık sularda kafein analiziyle bölgenin popülasyon büyüklüğü ve dinamiği; yüzey sularında analizi ile de kirlilik düzeyi tespit edilip çevresel risk olup olmadığı hakkında değerlendirme yapılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Atık su, Kafein, Biyobelirteç, Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi, Validasyon

ABSTRACT

Waste water based epidemiological (WBE) approach is an analysis of wastewater chemicals exposed and consumed by population and access all population data. Since the consumption of caffeine goes back to ancient times and the popularity of coffee (main source of caffeine) that gradually increases makes possible come across caffeine and its metabolites in wastewater. In addition, stability of caffeine and to indicate only human activities make caffeine significant biomarker for wastewater based epidemiological analyses. Human biomarkers provide us information about population size and Dynamics in WBE based studies. Also, because of being an anthropogenic marker, caffeine indicate contamination on surface waters. Therefore, it is important developing a fast and reliable caffeine method. In this study it is aimed to create and validate a fast and reliable method with low quantification limit and which does not require any verification by LC-MS/MS which has been used recetly. LC-MS/MS parameters and flow program set up and validation parameters such as selectivitiy, analytical sensivity, limit of detection and determination, linearity, accuracy and robustness were studied. Limit of detection was calculated 200 ng/L, limit of quantitation was calculated 500 ng/L. Accuracy studies with 0,997 were performed in the linear range of 500-100000 ng/L. In all studies %RSD was <10; recoveries were found between %87 and %109 in different days and at different concentrations studies. In this method which requires pretreatment, tap water samples were enriched with a concentrations of 50000 ng/L and extracted. The efficiency of extractions was found %93,34 on average. In this developed method, by analysis of caffeine in wastewater, population size and dynamics of the region can be evaluated and level of pollution in surfacewater can also be evaluated whether there is a environmental risk.

Key Words: Waste water, Caffeine, Biomarker, Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Validation

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Atık sular bir toplumun tükettiği ve maruz kaldığı her şeyi, yaşam tarzını, alışkanlıklarını ve sağlıkla ilgili bilgilerini yansıtan iyi bir veri sağlayıcısıdır (1,2). 2001 yılında Daughton tarafından ortaya atılan atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşım (WBE); maruz kalınan, tüketilen kimyasalların ve metabolitlerinin atık suda analizi esasına dayanmaktadır (3). WBE yaklaşımı; eş zamanlı, doğru ve güncel yasa dışı madde kullanımı bilgisi edinmek için ilk kez 2005 yılında Zuccato ve ark. tarafından yüzey sularında kokain tespitiyle uygulanmaya başlanmış; günümüzde toplum ve çevre sağlığıyla ilgili değerlendirmelerde uygulanmaya devam etmektedir (4).

İnsanda metabolizma faaliyetleri sonucunda atılım olarak ortaya çıkan maddeler biyobelirteç olarak tanımlanır. Toplumla ilgili doğru bilgiye ulaşabilmek, en uygun biyobelirtecin tespit edilmesiyle mümkündür. Bu yüzden sularda kararlı olan, sadece insan faaliyetlerini yansıtan, tespiti kolay ve farmakokinetik verilere sahip olan kimyasallar, ideal bir biyobelirteç olarak kabul edilmekte ve atık sularda tespit edilerek toplum sağlığı ve çevre sağlığı konusunda bilgi sunmaktadır (5).

Kafeinin ana kaynağının kahve olması nedeniyle kullanımının çok eski tarihlere kadar uzanması ve günümüzde popülaritesinin devam etmesi nedeniyle, atık sularda kafeine ve metabolitlerine rastlamak oldukça mümkündür. Ayrıca kararlı olması, insan faaliyetlerini yansıtması ve tespitinin kolay olması biyobelirteç olarak değerlendirilme hususunda dikkat çekmektedir (2).

Kafein ve metabolitlerinin yüzey sularında ya da yer altı sularındaki varlığı; atık su arıtma sistemlerinin iyi çalışmadığını ya da insan faaliyetleri sonucunda kirlendiğini gösteren antropojenik bir belirteçtir. Kafein ve parasetamolün E.coli ile ilişkisinin değerlendirildiği Bristol Liman sularında yapılan bir çalışmada, kafein ile E.coli arasında paralel bir ilişki

gözlemlenmiştir. Bu da sulara bir antropojenik girişin olduğunu yani kanalizasyon sisteminin karıştığını göstermektedir (6). Endüstriyel kirlenmenin dışında kafeinin de içinde olduğu farmasötik aktif maddeler (PhAC), tıbbi ilaçlar ve kişisel bakım ürünleri (PPCP), endokrin bozucu maddeler (EDC) gibi tüketim sonucu kanalizasyon sisteminden yüzey ve yer altı sularına karışan kimyasallar; son dönemde ortaya çıkan kirletici sınıfındadır. Gelecek dönemde ortaya çıkaracakları tehlikeler çevresel boyutta ölçülmeye başlanmıştır (7-10). Bu yüzden bugüne kadar gıdalarda kafein tespitinin, plazma ve idrar gibi biyolojik materyallerde farmakokinetik çalışmaların yanı sıra kafeinin sularda tespit edebileceği yöntemlerin oluşturulması ve geliştirilmesi de önem taşımaktadır.

Kafeinin popülasyonla olan ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalarda, hidrokimyasal parametrelerle kafein ve metabolitleri üzerinden değerlendirmeler yapılmış popülasyon hareketinin bu verilerle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (1,5). Kafeinin, popülasyon büyüklüğünü ve dinamiğini göstermesi açısından önemli bir biyobelirteç olduğu kanaatine varılmıştır.

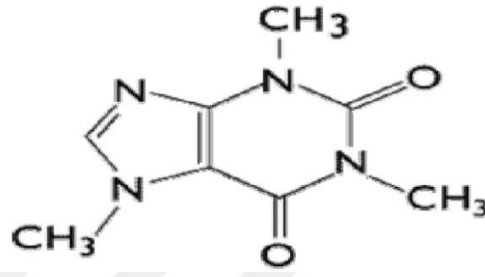
Adli bilimler açısından kafein gibi beşeri biyobelirteçler; güncel nüfus bilgisi ve hareketi sağlaması yönünden önemlidir. Bu çalışmanın da çıkış noktalarından biri; Türkiye’de İstanbul ve Adana’da yapılan çalışmalarda olduğu gibi, birçok ülkede analiz edilen atık suda uyuşturucu kullanım miktarının hesaplanmasında yaşanan anlık nüfus bilgisine ulaşamama, nüfus hareketini izleme konusunda yaşanan eksikliklerdir (11,12). Belli bir bölgede uyuşturucu kullanım miktarı da dahil birçok kişi başı tüketim miktarı çalışmalarında “*de jure (hukuki)*” nüfus bilgisi kullanılmakta, bu da doğru sonuçlara ulaşmaya engel olmaktadır. Bu yüzden WBE yaklaşımını kullanarak kafein gibi beşeri biyobelirteçlerin atık sulardan en doğru yöntemle analiz edilmesi “*de facto (fiilen)*” nüfus bilgisine ve hareketine ulaşma konusunda önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında Sıvı Kromatografisi - Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile atık suda kafein analizi için yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kafein için LC-MS/MS sisteminde yöntem geliştirilecek ve yöntemin geçerli kılınması parametreleri olan seçicilik, doğrusallık, tespit ve tayin limitleri, doğruluk, kesinlik, sağlamlık çalışmaları yapılmıştır. LC-MS/MS kullanılarak hızlı, kolay, özgün, düşük tayin limitli, tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geliştirilmesi amaçlanarak hem yüzey sularına karışan kafein tespit edilebilecek hem de atık su analizlerinde kafein ve metabolitlerinin miktarı ile popülasyon büyüklüğü ve dinamiğinin günlük/haftalık/aylık değişimleri takip edilerek belirlenen bölgelerde günlük 1000 kişi başına düşen yasa dışı madde miktarı bilgisine gerçek zamanlı olarak ulaşılabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

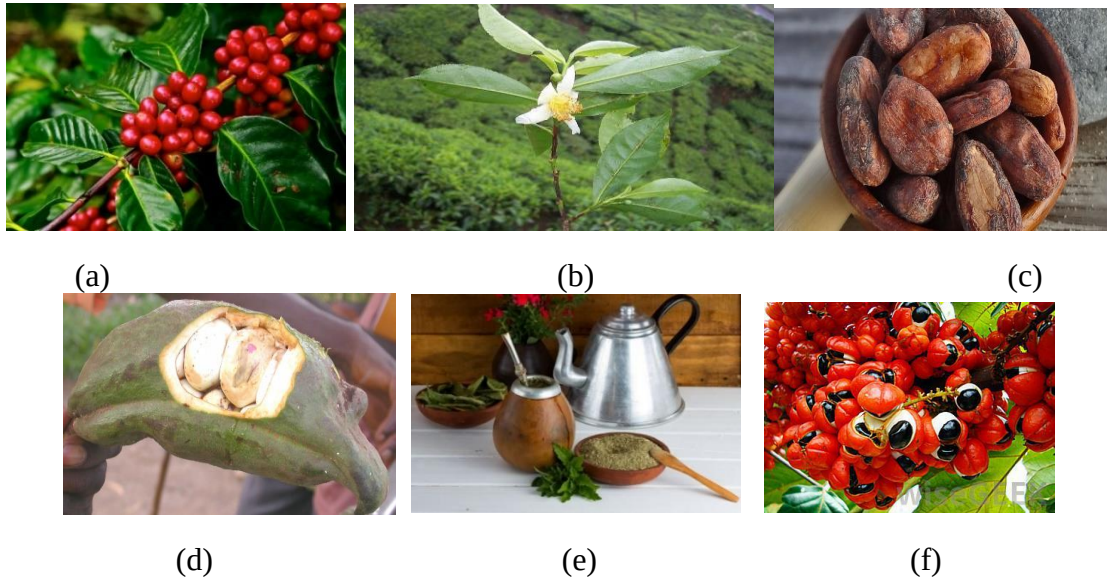
2.1. Kafein

Kafein; tam adı 1,3,7 trimetilksantin ($C_8H_{10}N_4O_2$) olan pürin türevi bir bitkisel alkaloiddir. (13,14). Molekül ağırlığı 194,19 g/mol, yoğunluğu 1,2 g/cm³'tür. Erime noktası 238°C, kaynama noktası 178°C olan kafeinin saf hali beyaz toz yapıdadır. Suda çözünmesine rağmen diklorometan, kloroform, methanol gibi organik çözücülerde daha iyi çözünmektedir (15,16). Organik çözücüler içerisinde genelde sıcaklık arttığında çözünürlülüğü artarken; kloroform çözeltisi içerisinde sıcaklık azaldığında çözünürlülüğü artmaktadır (17). Şekil 2.1'de kafeinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kafein Kimyasal Yapısı (16)

Kafein 60'dan fazla bitki çeşidinde ve meyve tohumlarında bulunmaktadır (5,18). Kafeinin ana kaynağı kahve çekirdekleri (*coffea arabica*, *coffea robusta*) ve çay yapraklarıdır (*camellia sinensis*). Aynı zamanda kola fındığında (*cola acuminata*), kakao çekirdeğinde, yerba mate çayında ve Guarana bitkisinde de bulunmaktadır (19). Şekil 2.2'de kafein içeren bitkiler gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kafein İçeren Bitkiler: (a) Kahve Bitkisi, (b) Çay, (c) Kakao çekirdeği, (d) Kola fındığı, (e) Yerba mate çayı, (f) Guarana Bitkisi) (20-25)

Kafein tüketimi; milattan önce 2737 yılında Çin İmparatoru Shen Nung tarafından, yakınında bulunan çay yapraklarının kaynar suya düşmesiyle suda farklı bir tat oluşturduğunu ve aroma verdiğini fark etmesiyle başlar. Kafeinin kahve olarak tüketilmesi ise 9.yüzyıla dayanmaktadır. Güney Arap yarımadasında bir çoban yabani kahve tanelerini yiyen bir keçinin daha hareketli olduğunu fark etmiş, kahve tanelerinin öfori ve uyarıcı etkisini daha sonra kendi üzerinde denemiştir. Kahve ilk önce Afrika'ya, 1600'lerde ise Avrupa'ya ulaşmış;1800'lü yılların sonlarında Dr. Pepper ile başlayıp Coca Cola, Pepsi gibi içeceklerin içeriğinde kullanılmaya başlanmasıyla günümüze kadar yaygınlaşmıştır. Kafeinli içeceklere ilginin giderek artmasıyla kafein dünyada en çok tüketilen içeceklerden olmuştur (13).

Kafein; ilk kez 1820'de Alman kimyager Runge tarafından, kahve çekirdekleri kullanılarak izole edilmiştir. Fransız kimyager Oudry siyah çaydan bu alkaloidi ayırarak Tein ismini vermiş ancak daha sonra bunun kafein olduğu anlaşılmıştır (16). 1861'de de Strecker tarafından kafein, teobromin metilasyonu ile sentetik olarak hazırlanmıştır (14). Kakao bitkisinin içeriğindeki teobromin, dimetilsülfat veya metil-p-toluenesulfonat gibi metilasyon ajanlarıyla kafeine dönüşmektedir (14).

2.1.1. Kafein Tüketimi

Kafein; çoğunlukla kahve, çay ve alkolsüz içeceklerin tüketilmesiyle metabolizmaya girer. Bu içeceklerin dışında kakao ve çikolata gibi yiyeceklerde, analjezik ilaçlarda ve diyet ürünlerinde de kafein bulunmaktadır. Son yıllarda enerji içeceklerinin, sporcu içecek ve meyve sularının tüketiminin artmasıyla da kafein tüketimi giderek artmaktadır (5,13).

Tablo I’de bazı yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarları gösterilmiştir.

Tablo I. Bazı yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarları (14,26)

Yiyecek ve İçecekler	Kafein Miktarı
Normal dem kahve	85 mg/150 mL
Hazır kahve tozu (Kahve özü)	60 mg/150 mL
Kafeini alınmış kahve	3-5 mg/150 mL
Türk Kahvesi	57 mg/ 60 mL
Normal çay	40 mg/150 mL
Hazır çay tozu (Çay özü)	30 mg/150 mL
Kola	18 mg/200 mL
Sıcak Çikolata	4 mg/150 mL
Çikolatalı Şekerleme	5-20 mg/ 100 g

Tablo II’de farklı bir çalışmadan elde edilen içeceklerde kafein miktarları verilmiştir (13). Bu çalışmaya göre espresso kahvesi kafein içeriği bakımından en yüksek miktara sahip kahve çeşididir. Yerba mate çayı diğer içeceklere oranla yüksek miktarda kafein içerir. Kafein miktarı;

bitki çeşidine, yetiştirildiği ortama, demleme yöntemine göre de farklılık göstermektedir. Tablo III ve IV’te farklı ülkelerde yetişen bazı bitkilerin kafein içeriği sunulmuştur (13,17).

Tablo II. Bazı İçecek Gruplarında Kafein Miktarı (13)

Kafein kaynağı	Kafein Miktarı (mg) (8 oz/240mL için)
<i>Kahve</i>	
Kafeinsiz	5
Toz kahve	93
Espresso	320
Sade, demleme	133
<i>Çay</i>	
Yeşil çay	45
Siyah çay	47
Yerba mate	78
<i>Alkolsüz İçecekler</i>	
Coca-Cola Klasik	23
Pepsi Cola	25
Diet Coke	31
<i>Enerji İçecekleri</i>	
RedBull	76
Monster	80
Burn	76

Tablo III. Bazı Bitkilerdeki Kafein Miktarları (13,17)

Bitki	Kafein %
Guarana	4
Cola Nut	1,5
Türk Çayı	2,7-5,0
Sri Lanka Çayı	2,8
Assam Çayı	3,6
Darjeeling Çayı	4,2

Tablo IV. Farklı Ülkelerde Yetişen Yerba Mate Çaylarının İçindeki Kafein Miktarları (13)

Yerba Mate Çayı	İçeriğindeki kafein konsantrasyonu (%)
Itabo, Paraguay	15,5±0,01
Asuncion, Paraguay	13,5±0,006
Canarias, Brezilya	13±0,01
San Mateo do Sol, Brezilya	10,4±0,002
Misiones, Arjantin	8,6±0,004
Corrientes, Arjantin	10,8±0,009

Türkiye’de satılan farklı markalardaki içeceklerde kafein miktarına bakıldığında en yüksek kafein oranı türk kahvesinden (858 mg/L) elde edilmiştir. Dökme çayda 840 mg/L, çözülebilir kahve 509 mg/L, poşet çayda 218 mg/L, kolada 148 mg/L, enerji içeceklerinde ise 169 mg/L bulunmuştur. Sağlık açısından günlük doz limiti düşünüldüğünde bu miktarlar dikkate alınmalıdır (27).

Tablo V’te bazı ülkelerdeki günlük ortalama kafein tüketim miktarı gösterilmiştir.

Tablo V. Çeşitli Ülkelerde Günlük Ortalama Kafein Tüketimi (13)

Ülkeler	Ortalama Günlük Kafein Tüketimi (mg/gün)
Çin	16
Güney Afrika	40
Kenya	50
Birleşik Devletler	168
Japonya	169
Birleşik Krallık	202
Kanada	210
Avustralya	232
Fransa	239
İsviçre	288
Brezilya	300
Finlandiya	329
Danimarka	390

Bu araştırmada Kafein tüketimine kahve, çay, mate ve kakao içeriğine sahip ürünler dahil edilip kola tipi içecekler araştırma kapsamına alınmadığından ortalama günlük kafein tüketimi (mg/gün) gerçek tüketimden daha düşüktür. Kafein tüketiminin çeşidi farklıdır. Örneğin ABD, Kanada, Finlandiya, İsviçre gibi ülkeler için kafein alımı kahve ile gerçekleşirken; İngiltere çay ile; Çin yeşil çay ile; Brezilya Arjantin gibi ülkeler kahve, yerba mate çayı ile kafein alımını gerçekleştirmektedir (13).

Kafein tüketiminin ana kaynağı yetişkinler için kahve olurken; çocuklarda çay, kola tipi meşrubatlardır. 2002 yılında Frary ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada ABD’de ortalama 70 kg ağırlığında bir kişinin günde 280 mg kafein tükettiği ortaya çıkmıştır. Ergenlerde ve çocuklarda bu oran daha azdır (28). 2019 yılında Amerika’da üniversite öğrencileri arasında kafein tüketimini öğrenmek için yapılan bir araştırmada üniversite öğrencilerinin günlük 159 mg kafein tükettikleri ve bunun büyük bir çoğunluğunu kahveden aldıkları ortaya çıkmıştır (29).

Dünya Sağlık Örgütü 10-19 yaş aralığını adolesan, 15-24 yaş aralığını gençlik dönemi olarak kabul etmektedir. Türkiye’de Isparta Yalvaç’ta adolesanlarda kafein tüketimi araştırılmış; 14-19 yaş grubu çalışmaya katılan adolesanların bir günde tükettikleri ortalama kafein miktarı 172,40 mg olarak bulunmuştur. Kafein dikkati artırma, odaklanma gibi zihinsel yetenekleri arttığı için özellikle ders çalışırken ve ara öğünlerde tüketilmektedir. Bu bölgede gençler arasında kafeinli ürünlerin tüketimi çoktan aza doğru sırayla çay, kola, hazır kahve, kafein içeren yiyecekler (çikolata ve çikolatalı ürünler), bitki çayı ve enerji içeceği şeklindedir (30). Kocaeli’nde sağlık çalışanları ve öğrenciler arasında yapılan anket çalışmasında ise kafein tüketimi belirli gruplara ayrılmış günde 100-200 mg kafein tüketenler %27, 200-300 mg kafein tüketenler %29’luk oran ile Türkiye’deki kafein tüketiminin Amerika ve İngiltere’deki benzer oranlara sahip olduğu ortaya çıkmıştır (31).

Sağlıklı yetişkin bireyler için günde 400 mg’a kadar olan kafein dozunun güvenli olduğu bildirilmiştir (32).

1959 yılında FDA kola tipi içeceklerinin içindeki kafeini güvenli olarak (Generally Recognized As Safe-GRAS) kabul etmiştir (33). O tarihten günümüze de kafein ile ilgili çalışmaları yakından takip etmeye devam etmektedir.

Bazı ülkelerde kafeinli içecek grubuna sınırlamalar getirmiştir (13):

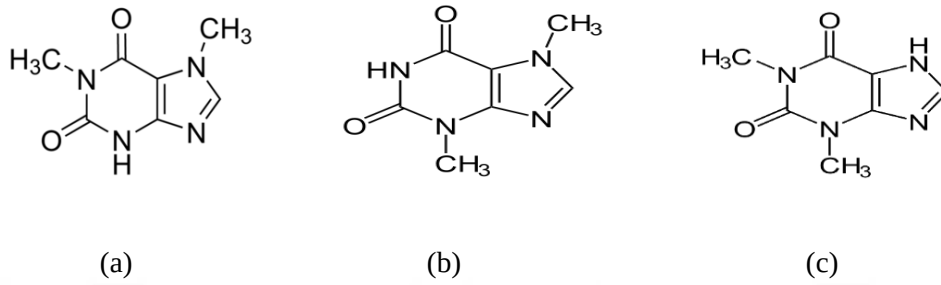
- ABD’de FDA, kafeini GRAS sınıfında %0,02 olarak sınırlamıştır.
- Avustralya maksimum 320 mg/L kafein olarak sınırlamıştır.
- Kanada kola tipi içeceklerde kafeini 200 mg/L’ye kadar izin vermektedir. 10-12 yaş aralığında çocuklar için 85 mg/gün; hamileler için 300 mg/gün ile sınırlandırmıştır.
- Avrupa Birliği ülkeleri için içeceklerde herhangi bir kafein üst limiti yoktur; ancak 150 mg/L geçtiği anda etikete ‘Yüksek Kafein İçeriği’ ibaresi konulması gerektiği bildirilmiştir.
- Asya’da Güney Kore Gıda ve İlaç İdaresi yetişkinler için günde 400 mg/L’den az, hamileler için 300 mg/gün’den az, çocuklar için ise en çok 2,5 mg/kg/gün kafein önermektedir. Tayvan kahve ve çay dışındaki içecekler için 320 mg/L kafein üst limiti koymuştur. Latin Amerika ülkelerinden Meksika, kafein için içeceklere herhangi bir üst limit öngörmemektedir; ancak kafein miktarı 200 mg/L’den fazla ise ‘Kafein Eklenmiş İçecek’ sınıfına sokmaktadır. Brezilya 320 mg/L, Şili 320 mg/L kafein içeren içecekleri sporcu içeceği sınıfına dahil etmektedir. İçecekler için herhangi bir kafein üst limiti yoktur; ancak günlük 500 mg’den fazla kafein tüketimini tavsiye etmemektedir.

Türk Gıda Kodeksi Enerji İçecekleri Tebliğine göre enerji içeceklerindeki kafein miktarına 150 mg/L şeklinde sınırlama getirilmiştir (34). Ancak ürünün etiket bilgisi, gerçek kafein oranını yansıtmayabilir. Adana’da yapılan çalışmada farklı markalara ait 16 adet enerji içeceklerindeki kafein miktarı analiz edilmiş, bunlardan 13 tanesinin sınırın üstünde kafein içerdiği sonucuna ulaşılmıştır (35).

2.1.2. Kafein Metabolizması ve Etki Mekanizması

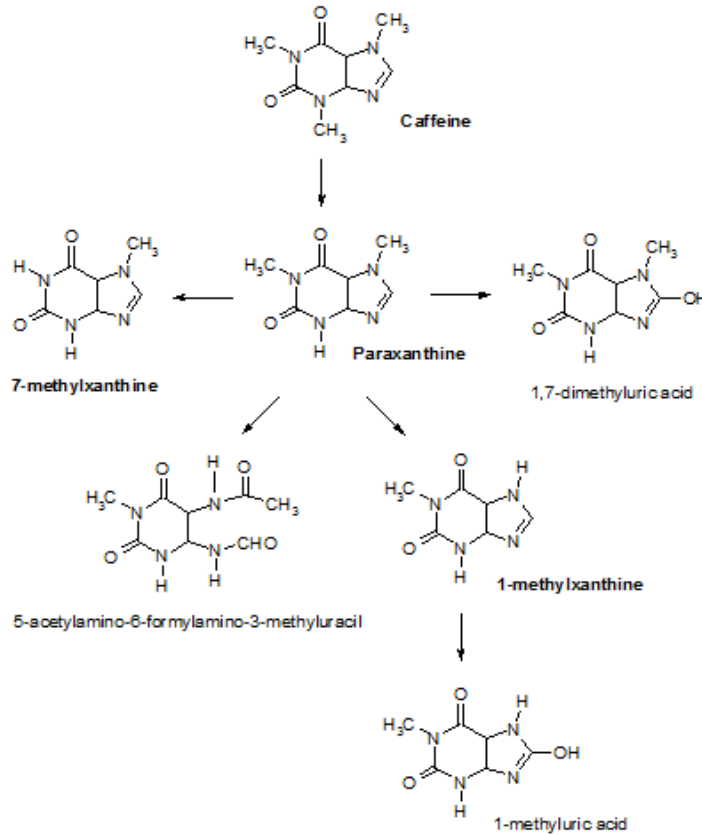
Kafeinin metabolik yolu karmaşıktır. Kafein, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize olur ve idrarla atılır. Paraksantin (1,7-dimetilksantin) %84, teobromin (3,7-

dimetilksantin) %12, teofilin (1,3-dimetilksantin) %4 ortalama oranda üç ana metabolite dönüşmektedir. Bu metabolitler daha sonra karaciğerde demetilasyon ve oksidasyona uğrayarak başka metabolitlere dönüşür (13). Paraksantin (PXT), teobromin ve teofilin kimyasal yapıları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. (a) Paraksantin, (b) Teobromin, (c) Teofilin maddelerinin kimyasal yapıları (19)

Kafeinin metabolik yolu Şekil 2.4 'te gösterilmiştir:



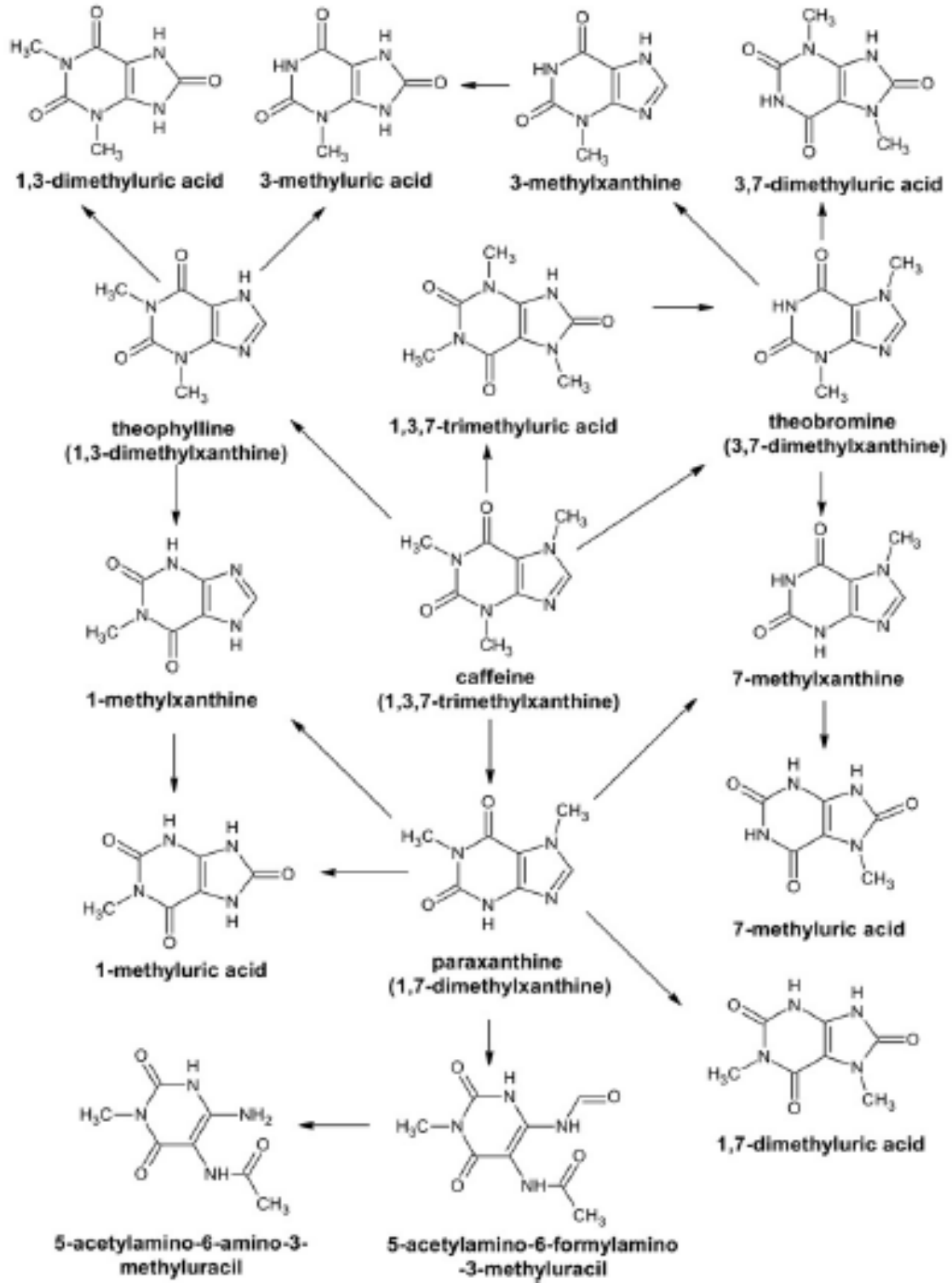
Şekil 2.4. Kafein Metabolizması (5)

Kafein, 3-demetilasyona uğrayarak paraksantin oluşturur. Bu metabolit daha sonra üç farklı reaksiyon verir (5):

- 8-hidroksilasyon ile 1,7-dimetilürük asit
- 7-demetilasyon ile 1-metilksantin. 1-metilksantin bir kısmı da 1-metilürük aside metabolize olur.
- Açık halka ürünü olan 5-asetilamino-6-formilamino-3-metilürasilin (AFMU) (kararsız yapıda olduğundan daha sonra 5-asetilamino-6-amino-3-metilürasil [AAMU]'e dönüşür)

Bir başka kafein metaboliti olan 7-metilksantin, hem teobromin hem de paraksantin demetilasyonu ile oluşabilir.

Kafein için metabolik yollar Şekil 2.5'te de gösterilmiştir:



Şekil 2.5. İnsan metabolizmasında kafeinin metabolik yolu (19)

Bazı ürünlerin içeriğinde kafein metabolitlerinden teobromin ve teofilin doğal olarak bulunur. Kafein tüketimi hesaplaması yapıldığında gerçek verilere ulaşmak için bu değerler de dikkate alınmalıdır. Örneğin;

- Çikolata %1,3 teobromin, %0,75 kafein, teofilin az oranda
- Kola findığı %2-3,5 kafein, %1-3,5 teobromin, teofilin az oranda
- Çay yaprakları %3 kafein, teofilin ve teobromin az oranda

Kafein biyoyararlanımı %100'dür ve tamamen emildiğinden dışkı göz ardı edilebilir (13). Metabolitlerin haricinde düşük oranda kafeinin kendisi de idrarla atılır. Kafein tüketildikten sonra 1 saat içinde plazmada yüksek konsantrasyona ulaşır. Sağlıklı bir insanda kafein alımı sonrası gastrik boşaltma; kafeinin %50'si ilk 1-2 saat içinde, geri kalan kısmı ortalama 3,5 saat içinde meydana gelir. 70-100 mg arası kafeinin karaciğerdeki farmakokinetiği lineerdir. Kafein-dozu arttıkça atılım yarı ömrü artmaktadır ve lineer yapıdan sapmaktadır (13).

Dünya Anti-Doping kurumunun kafein sınırının olması ve sporcuların ne kadar kahve tüketmesi gerektiğiyle ilgili Ürdünlü sporcular üzerinde yapılan bir çalışmada Türk kahvesi tüketiminin 3 saat sonrasında kafeinin idrarda maksimum düzeye ulaştığı görülmüştür. Bu durumda literatürdeki kahve tüketiminin maksimum atılım zamanının 2-5 saat olduğunu doğrulamaktadır (36).

Tablo VI'da Gracia-Lor ve ark. yaptığı çalışmadan alınan, kafein ve bazı metabolitlerinin atılım profili gösterilmiştir.

Tablo VI. Kafein ve bazı metabolitlerinin atılım profili (19)

	Farmakokinetik çalışmalardan elde edilen % Ortalama Atılım (SD)	Spot idrar analizleri (%95 güven aralığında)*	Atık su çalışmalarından elde edilen % Ortalama Atılım
Kafein	1,7 (1,0)	1,57-2,08	20,9 (6,0)
Paraksantin	4,6 (1,4)	6,73-8,29	22,1 (4,0)
1-metilksantin	10 (3,4)	15,4-19,0	15,8 (3,5)
7-metilksantin	3,1 (1,2)	28,6-34,3	24,9 (6,4)
1-metilürik asit	16,5 (6,2)	35,8-43,4	4,7 (1,1)
1,7-dimetilürik asit	6,7 (2,3)	11,0-13,6	11,6 (2,0)
Teofilin	0,6 (0,4)	0,796-0,955	Analiz edilmedi
Teobromin	1,5 (1,3)	11,4-13,5	Analiz edilmedi
1,3-dimetilürik asit	1,6 (0,7)	3,17-3,89	Analiz edilmedi
3,7-dimetilürik asit	0,2 (0,4)	0,714-0,861	Analiz edilmedi
3-metilksantin	2,0 (1,1)	17,5-21,0	Analiz edilmedi

Yapılan bu çalışmalarda:

- 1-metilksantin ve 7-metilksantin değerleri teofilinin ve teobrominin de metaboliti olması farmakokinetik çalışmalara oranla atık su ve spot idrar örneklerinde yüksek çıkmasına neden olmuştur.

- Kafeinin atık suda, spot idrar ve farmakokinetik çalışmalara oranla fazla çıkması kahvenin doğrudan kanalizasyona ulaşması (kahvelerin lavaboya dökülmesi gibi) nedeniyle olmuş olabilir.
- 1-metilürük asitin atık suda bozulması, kararlı yapıda olmaması gibi nedenlerle atık suda daha düşük çıkmış olabilir.
- Paraksantin için de farklılıklar gözlemlenirken tabloya göre her üç durumda da birbirine en yakın sonuçlar veren 1,7-dimetilürük asit olmuştur. Bu yüzden atık su ve metabolizma ile ilgili çalışmalarda bu metabolitin dikkate alınması daha doğru sonuçlara ulaştıracaktır (19).

İnsanda kafein atılımına etki eden faktörler değişmektedir. Gebelikte kafeinin atılımı zorlaşmaktadır. Annenin atamadığı kafein, bebek plazmasında kafein seviyesini yükseltir. Bu yüzden gebelikte kafein tüketimine dikkat edilmelidir. Yeni doğanlarda karaciğer enzim aktivitesi düşüklüğünden dolayı kafein yarı ömrü 3-4 güne kadar çıkabilir. Erken doğan bebeklerde solunum zayıflığını kafeinle tedavi ederken bu durum göz önünde tutulmalıdır. Sigara kullanımı da, karaciğerdeki kafein biyotransformasyonundan sorumlu enzimlerin artmasına sebep olur ve kafeinin vücuttan daha hızlı atılmasını sağlar. Tablo VII'de kafeinin metabolizmasına etki eden bazı durumlar gösterilmiştir.

Tablo VII. Kafein metabolizma hızına etki eden faktörler (14)

Faktör	Kafeinin plazmadaki yarı ömrü
Normal	5-6 saat
Gebelik	18 saat
Oral kontraseptifler	10,7 saat
Sigara içme	3-4 saat
Karaciğer yetmezliği	Birkaç gün

Kafeinin merkezi sinir sistemi üzerinde etkisi, adenosin aktivitesini inhibe etmesi ile meydana gelmektedir. Adenosin kafein yapısına benzer özellik gösterir ve kafein, adenosinin sinir hücrelerine bağlanmasını engelleyerek adenosin alıcı ajanlarını, özellikle A_1 ve A_{2a} 'yı işgal eder (18). A_1 reseptörleri hipokampus, serebral ve serebellar korteks ve bazı talamik çekirdeklerde en ağır konsantrasyona sahip beyin tüm kısımlarında bulunur; A_{2a} reseptörleri ise beyin dopamin bakımından yoğun yerlerinde bulunur. Kafein buraya bağlandıktan sonra adenosini bloklar, nöronları hızlandırarak adenosinin uykuya yol açan etkilerini ortadan kaldırır (13).

Adenosin A_1 reseptörlerini ve fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek hücre içinde siklik AMP konsantrasyonunu artırır. Kafein ve Teofilin, ryanodine reseptörlerini aktive eder iskelet ve kalp kasında Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak kasılma gücünü artırarak kardiyak etki meydana getirir (37).

2.1.3. Kafein Tüketiminin Sağlığa Olan Etkileri

Kafein zihinsel uyanıklığı ve metabolizma hızını artıran, fiziksel yorgunluğu azaltan metabolit bir uyarıcıdır. Merkezi sinir sistemini uyarır, kap atışlarını ve kan basıncını artırır. Kafein tüketimiyle uyku azalır, uykuya dalma süresi artar (14).

Kafein, Dünya Anti Doping Ajansının 2008 yılında yayınladığı yasaklılar listesinde yoktur ve Amerikan Psikiyatri Birliği, Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabında bağımlılık yapıcı maddeler sınıfında değildir.

Solunum uyarıcı ve diüretiktir; koroner damar genişlemesine sebep olur. Bronş ve kalp stimulantı olarak bebek solunum güçlüklerinin giderilmesi, migren, cilt hastalıkları tedavisi gibi terapötik amaçlı kullanılmaktadır (14). Analjezik karışımlarında, migren tedavisinde ve anti-

soporifik preparatlarında oral yoldan uygulanır. Nadiren, prematüre bebeklerde apne gibi diğer bazı durumların tedavisi için de intravenöz (damar yolu) olarak uygulanır (5).

Uyanıklılık, egzersiz performansını artırma, farkındalık, dikkati artırmaya olan etkilerinin yanı sıra, Parkinson hastalığına bağlı semptomların azalmasına da yardımcı olmaktadır. Parkinson hastalığı dopamin eksikliğinden kaynaklanır ve kafein, A_{2a} reseptörlerini bloke ederek dopaminerjik sistemin etkilerini artırır (38).

Kahve tüketiminin cilt kanserini azalttığı yönünde çalışmalar vardır. Günlük kahve tüketimi 6 ve daha fazla olan Kafkas kadınlarında %30 daha az deri kanseri görüldüğü tespit edilmiştir (13,39).

Kahve tüketimi ile anti-inflamatuvar biyobelirteçleri arasındaki ilişki, Yunanistan'ın Attika bölgesinde 3042 sağlıklı kişiler üzerinde araştırılmıştır. Bazı inflamatuvar biyobelirteçlerin (C-reaktif protein, interlökin 6, tümör nekroz faktörü α , amiloid A) konsantrasyonunun kahve tüketmeyenlere oranla arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kahve tüketimiyle inflamasyon arasında pozitif bir ilişki bulunsa da bunu destekleyen daha fazla sayıda metabolik çalışmaya ihtiyaç vardır (13).

Kafein ve metabolizma hızı ilişkisine bakıldığında, ilk 3-4 saatte kafeinin metabolizma hızını artırdığı yönündedir. Ancak geri kalan zaman diliminde bazal metabolizmanın normale döndüğü görülmüştür. Kafein insan metabolizmasında lipit yıkımına, adrenalın salgısının artmasına, plazma trigliserit ve laktat konsantrasyonunun yükselmesine, kalp kasının kasılmasına, kan akışının hızlanmasına neden olur. Kafein kullanımında enerji artışı doza bağlıdır (18).

Kafein ve metabolizma ilişkisi çalışmalarının esas amacı; kafeinin metabolik sendrom riskini azaltıcı etkisini incelemek ve kilo vermeye yardımcı olup olmadığının araştırılmasıdır. Metabolik sendrom ABD nüfusunun %25'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Tip 2 diyabet; karın bölgesinde yağlanma; yüksek tansiyon, trigliserit, kolesterol değerleri; bunun

sonucunda gelişen kalp hastalıkları metabolik sendromun belirtisidir. Obezite ve Tip 2 diyabet dikkate alınarak yapılan çalışmalarda kafein tüketimiyle metabolik sendrom etkisinin azaldığı görülmüştür (13).

Kafeinin birçok olumlu etkisinin yanında, özellikle hamileler ve çocuklar üzerinde negatif etkileri de vardır. Çocukların uyku düzenini bozabilir ve gelişimini olumsuz yönde etkiler. Bunun yanında kafein, çoğunlukla şeker katkılı içeceklerden gelir; bu durum da kilo artışına ve diş hastalıklarına neden olabilir (13). Hamilelikte fetal büyüme ve düşük doğum ağırlığı ile kafein alımı arasındaki ilişki araştırılmıştır. CARE Study Group tarafından yapılan çalışmada çıkan sonuçlar; kafein alımı ile fetal büyüme bozukluğu riski arttığı, gebelik öncesi ve hamilelik sırasında kafein alımının azaltılması yönündedir. Yüksek risk eşiği tam olarak tanımlanmasa da CARE Study Group çalışmasında, kafein tüketiminin doğurganlığı olumsuz etkilediği ve hamile kadınların günde 100 mg/gün den az kafein tüketmesi fetal büyüme bozukluğu riskini azaltığı sonucuna ulaşılmıştır (13,40).

Yapılan çalışmalarla kafeinin bazı hastalıklarla olan ilişkisi araştırılmıştır:

- *Obezite*

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre dünyada 1 milyardan fazla yetişkin aşırı kilolu; 300 milyondan fazla insan da obez sınıfındadır. Obezite dünya genelinde bir sorun olduğundan, kafein ile kilo alımı arasındaki ilişki incelenmiştir.

Kilo alımında enerji dengesi önemlidir. Kafein de bu enerjiyi dengelemede; enerji harcamada; metabolik hızı, lipidoksidasyonda, lipolitik ve termojenik aktiviteyi artırmada önemli rol oynar. 24 saatlik zaman diliminde 300 mg/gün kafein tüketildiğinde yaklaşık 79 kcal/gün enerji harcandığı gözlemlenmiştir. Bu durum enerji dengeleme açısından önemlidir. Birleşik Devletlerde insanlar yılda ortalama 1 kg alır; bu da günlük 15 kcal fazla alımına denk gelir. Ayrıca toplumun %90'ının günlük kalori ihtiyacından 50 kcal daha fazla aldığı bilinmektedir.

Bu demektir ki 50 kcal/gün'lük bir azalma, enerji dengesini sağlayacaktır. Kafein tüketimiyle harcanan 79 kcal/gün aktif bireyler için kilo verdimese de kilo korumasına olumlu yönde katkı sağlar. Uzun süreli kafein tüketimi ise daha az kilo alımıyla ilişkilendirilmiştir (13,41,32).

- *Tip 2 Şeker Hastalığı (Type 2 Diabetes Mellitus)*

200000 kadın ve erkek üzerinde yapılan çalışmalarda kafeinli kahve tüketimi ile Tip 2 şeker hastalığı arasında ters ilişki bulunmuştur (13,42). Tip 2 şeker hastalığına yakalanma riski günde 2 fincan kahveden daha az tüketenlere kıyasla; günde 4-6 fincan kahve tüketenlerde %28; günde 6 fincan kahve tüketenlerde %35 daha azdır. Çalışmalar kahve tüketimi üzerinden yürütülmüştür; çünkü yetişkinlerde kafein alımının çoğu kahve üzerinden olmaktadır.

Normal kahve ile kafeinsiz kahve tüketilerek yapılan çalışmalarda normal kahve ile Tip 2 şeker hastalığı arasındaki ters ilişki daha belirgin iken; kafeinsiz kahve tüketimi ile yapılan çalışmalarda da Tip 2 şeker hastalığı riskinin azaldığı gözlemlenmiştir (43). Çünkü kafeinsiz kahvenin de içeriğinde 5 mg /240 mL kadar kafein vardır. Bunun dışında kahve içerisinde potasyum, niyasin, klorojenik asit, magnezyum gibi elementler ve vitaminler de vardır. Azalan Tip 2 şeker hastalığı riskinin kafein tüketimi mi yoksa bu kimyasallardan mı kaynaklı olduğunu anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ancak kafein tüketimi sonucu Tip 2 şeker hastalığını artıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (13).

- *Kalp Hastalıkları*

Kafein tüketimi ve kalp hastalıkları arasındaki ilişkiler, çalışmalardaki tutarsızlıklar yüzünden net değildir. Çünkü 1993-1994 yıllarında yapılan araştırma, günde 5 ve daha fazla kahve tüketenlerin, tüketmeyenlere göre % 40-60 oranında kalp hastalığı geçirme riskini ortaya koyarken (44); yakın zamanda akut myokard enfarktüsü tanısıyla ölen kişiler üzerinden

yürütülen çalışmalarda, kafein tüketimi ile ölüm sebebi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (13,43).

Kafeine karşı aşırı duyarlı kişilerde kafeinin fazla tüketilmesi taşikardi, huzursuzluk, titreme gibi durumlara sebep olabilir. Ayrıca kafein alımı kan basıncını da artıracığından hipertansif bireylerde tüketimine dikkat edilmelidir (13).

- *Fiziksel Performansa Olan Etkileri*

Bisiklet ergometresinde 5 mg/kg kafein verilen deneklerde kas içi yağ oksidasyonunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada 9 mg/kg kafein verilen deneklerde egzersiz başındaki glikojenolizde anlamlı bir düşme gerçekleşmiş, yağ asidi mobilizasyonunun arttığı görülmüştür. Performans artışına yol açmasının bir başka sebebi de kafeinin beta endorfin salgılanmasına sebep olmasıdır. Beta endorfinler stres ve ağrı durumunda hipofiz bezinden salgılanır ve vücudun doğal ağrı kesicileridir. Egzersiz öncesi ortalama 6 mg/kg kafein alımı, yorgunluk ve ağrı hissini ortadan kaldırarak fiziksel performans artışı sağlar (32).

2.2. Atık Sularda Kafein Analizi

2.2.1. Atık Suyu Dayalı Epidemiyolojik Yaklaşım ve Adli Bilimler

Atık su; evsel, endüstriyel ya da diğer faaliyetler sonucunda oluşan, içerisinde birçok kirleticiyi barındıran kullanılmış sulardır. Kanalizasyon şebekesi, atık suları toplamaya, uzaklaştırmaya ve arıtma tesislerine iletmeye yarayan tesisleri içeren ve birbirleriyle bağlantılı boru ya da kanal sistemleridir (45).

Atık sular bir toplumun tükettiği ve maruz kaldığı her şeyi, bunların beşeri metabolitlerini ve bozulma ürünlerini içerir; bu yüzden yaşam tarzını, alışkanlıkları, tüketilen, maruz kalınan kirleticileri ve sağlıkla ilgili bilgileri yansıtır (2) ve toplumla ilgili yapılan her türlü değerlendirme için önemli bir veri sağlayıcısıdır (1).

Atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşım (WBE) ise toplumun tükettiği, maruz kaldığı, spesifik insan metabolizmasının atılım ürünlerinin analizine dayanan bir yaklaşımdır. Toplanan atık sular binlerce kişinin idrar numunesini içerdiği için aslında bu yaklaşım; geniş çaplı bir idrar testi olarak da düşünülebilir (46).

WBE'nin temeli; tüketilen, kullanılan, maruz kalınan her şeyin metabolize olarak atık su sistemine dahil olmasıdır (5). WBE tabanlı çalışmalar, aşağıdaki aşamaları içerir (47):

- Atık su numunelerinin toplanması
- Numunelerdeki hedef madde kalıntılarının analitik yöntemlerle analiz edilmesi
- Kanalizasyon hacmi, akış hızı gibi kanalizasyon sisteminin özellikleri dikkate alınarak kanalizasyon sistemindeki toplam hedef madde kalıntısının hesaplanması
- İnsan metabolizmasındaki farmakokinetik çalışmalarının dikkate alınması
- Çıkan sonuçların popülasyon büyüklüğü ile değerlendirilmesi

WBE farklı disiplinleri bir araya getirir (47):

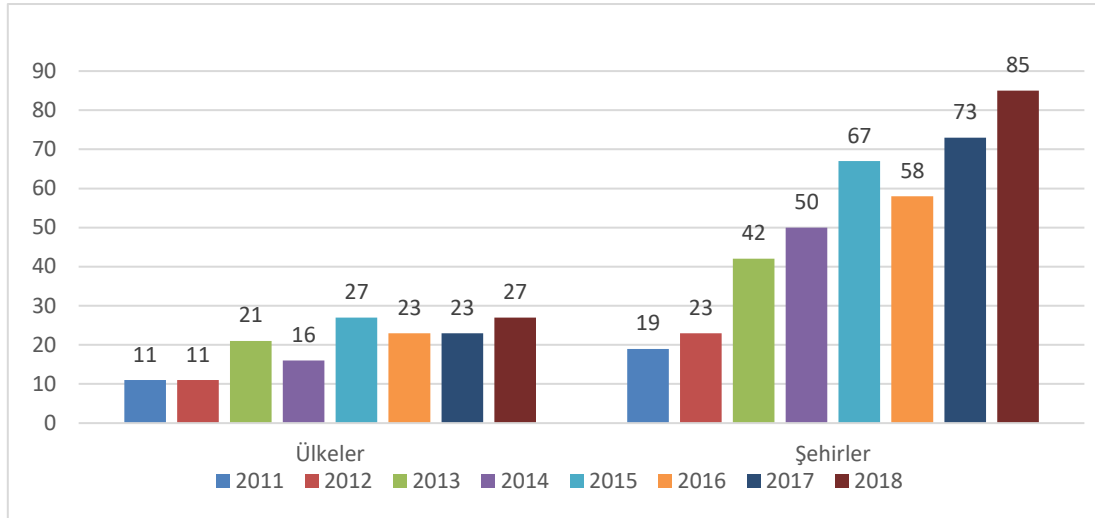
- Çevre mühendisliği: Tüm toplumu temsil edecek şekilde numunelerin toplanması
- Analitik kimya: Hedef madde kalıntı miktarı için hızlı bir yöntem geliştirme
- Çevre kimyası: Kanalizasyon içindeki maddenin transformasyonu
- Farmakoloji: Toplam tüketimi değerlendirmek için metabolizmadan salgılanan hedef madde kalıntısının ve metabolitlerinin miktarını ve kimliğini tespit etmek
- Epidemiyoloji: Elde edilen bu bilgiler ile madde kullanım yaygınlığını değerlendirme

Toplumun madde kullanımına dair veriler; bugüne kadar kan, idrar, saç gibi biyolojik örneklerle bireyler üzerinden ya da anket çalışmalarıyla elde edilmekteydi. Anket çalışmaları; edinilen bilginin gerçek verileri yansıtmaması, kişiyi etiketlemesi ve kişinin kullandığı maddenin ne

olduğuyla ilgili bilgisinin olmaması gibi nedenlerle sınırlı ve eksik kalmaktadır. Bu yüzden WBE tabanlı yaklaşımın ilk çıkış amacı, madde kullanımına dair eş zamanlı gerçek veriler elde etmektir.

İlk kez 2001 yılında Daughton tarafından önerilmiş (3); uygulamaya ise 2005 yılında İtalya’da Zuccato ve ark. tarafından yüzey sularında kokain araştırılmasıyla konulmuştur (4). Yine Zuccato ve ark. tarafından 2008 yılında amfetamin, metamfetamin, MDMA (3,4 metilendioksi-N-metilamfetamin/ekstazi), kannabinoid gibi diğer yasa dışı madde gruplarının araştırılmasında uygulanarak günümüzde de yasa dışı madde tüketiminin tahmini için bir çok ülkede başarıyla uygulanmaya devam edilmektedir (48-52)

2010 yılında atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşım ile Avrupa’daki ülkelerde, yasa dışı madde kullanımını takip etme ve uluslararası karşılaştırma yapma fikriyle SCORE (Sewage Analysis COREGroup Europe) kurulmuştur. Kanalizasyon sistemini kullanarak beşeri biyobelirteç analizleriyle toplumun yaşam tarzı, sağlığı, maruz kaldığı kimyasal ajanların analizini yapma amaçlı uzmanları bir araya getiren bir oluşumdur. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi (EMCDDA) tarafından da desteklenen SCORE, Avrupa’da uyuşturucu kullanımını değerlendirmek amacıyla atık suların analizine izin veren ülkeler ağıyla 11 ülkeyle başlamış günümüzde sayısı 27’ye ulaşmıştır. Avrupa’da atık su analiz ağı oluşturarak kokain, MDMA, amfetamin ve metamfetamin analizleriyle, madde kullanım miktarlarının yıllar arasındaki değişimleri takip edilmektedir (46). Ülkemizdeki ilk uygulama İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü, Adli Toksikoloji Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiş ve İstanbul’dan ilk veriler 2018 yılı SCORE raporlarında yer almıştır.



Şekil 2.6. SCORE oluşumuna katılan ülke ve şehir sayısı
(Veriler <http://score-cost.eu/> web sitesinden alınmıştır.)

Bu yaklaşım kullanılarak farklı bölgelerde eş zamanlı analizler yapılabilir. Farklı zamanlarda yapılan analizlerle de günlük değişimler; tatil dönemlerindeki, festival zamanlarındaki hareketlilik takip edilebilir. Sadece yasa dışı madde kullanımı açısından değil; toplumda belli bir ilaç grubunun kullanımı (örneğin öğrencilerin sınav döneminde dikkat eksikliği giderici ilaçların kullanımı vs.), yaşam tarzı, beslenme, maruz kalınan tarım ilaçları, endokrin bozucu diğer kimyasallar ya da herhangi bir salgın durumunu önceden bildirme açısından da önemlidir. Örneğin devlet kurumları aşırı alkol tüketiminin önüne geçmek için vergilerin artması, satış saatlerinin kısıtlanması gibi yollara gider. Kanalizasyondaki alkol biyobelirteçleri analizi ile uygulanan politikalar takip edilir ve kaçak içki kullanımının olup olmadığı değerlendirilir. 2012 yılında Olimpiyat oyunlarında sporcularda doping tespiti için de bu yaklaşım gündeme gelmiştir (53,54).

Bu yaklaşım disiplinler arası bir yaklaşımdır. Halk sağlığı kurumları ya da madde bağımlılığını önlemeyi amaçlayan kuruluşlarla adli tıp kurumlarının bir araya gelmesi, farklı bakış açılarını ortaya koyarak bu yaklaşımın ilerlemesini ve farklı uygulama alanlarının açılmasını sağlar (47).

İtalya’da başlayan bu yaklaşım; Belçika, İngiltere, İspanya, Norveç, ABD ve Türkiye’den İstanbul ve Adana şehirlerinin de içinde olduğu birçok ülkede başarıyla uygulanmıştır.

2.2.2. Beşeri Biyobelirteçler

Bir toplumda yasa dışı madde kullanım miktarı gibi kantitatif bilgilere ulaşmak için, hedef madde miktarının doğru analiz edilmesinin yanında toplumdaki kişi sayısının da net bilinmesi önemlidir. Madde kullanım miktarı hesaplamalarında atık su örneklerinin toplandığı kanalizasyon sistemini kullanan kişi sayısına dair bilgi bu tip analizler için en büyük belirsizlik kaynağıdır. Popülasyon büyüklüğünü değerlendirme için kullanılan yöntem genelde nüfus sayımı ya da hidrokimyasal parametreler (Kimyasal Oksijen İhtiyacı [KOİ], Biyolojik Oksijen İhtiyacı [BOİ], Toplam Azot, Toplam Fosfor) olmaktadır. Nüfus sayımı verileri sabit veriler olduğundan; belli tarihlerdeki anlık popülasyonu göstermemektedir. Hidrokimyasal parametrelerden elde edilen veriler ise sadece insan metabolizmasını değil endüstriyel faaliyetler sonucu kimyasal ve biyolojik olarak parçalanabilen maddeleri de yansıtmaktadır. Bu yüzden popülasyon tahmini için daha kesin sonuç almaya yönelik, atık suda beşeri biyobelirteç analizine dayanan yöntemler geliştirilmektedir (1). Beşeri biyobelirteçler; insani tüketim ya da maruziyet ile biyolojik faaliyet sonucu oluşan moleküllerdir. Aslında atık suyun toplum hakkında bilgi vermesi biyobelirteçlerin değerlendirilmesiyle olur. Biyobelirteçler değerlendirme açısından aşağıdaki gruplara ayrılabilir (2):

1. Yaşam tarzı hakkında bilgi edinilenler
2. Çevre ve gıdalardaki toksiklere maruz kalma bilgisi verenler
3. Halk sağlığı ve hastalıklar hakkında potansiyel bilgi sağlayıcı olanlar
4. Popülasyon büyüklüğü hakkında bilgi verenler

Atık sularda biyo-belirteçlerin popülasyon tahmininde doğru değerlendirilmesi için aşağıdaki özelliklere sahip olması önemlidir (5) :

1. İnsan metabolizmasına özgü olmalıdır.
2. Dışarıdan sisteme dahil olmamalıdır.
3. Kararlı yapıda olmalıdır.
4. Atık su sisteminde homojen dağılmalıdır.
5. Atık su içerisindeki mikrobiyolojik aktiviteden etkilenmemelidir.
6. Çevresel örneklerde tespiti kolay, hızlı ve güvenli olmalıdır.

İnsan sağlığını yansıtan potansiyel atık su biyobelirteçleri Tablo VIII’de gösterilmiştir:

Tablo VIII. Potansiyel Atık Su Biyobelirteçleri (53)

	Sağlık Parametresi	Biyobelirteç
Yaşam Tarzı	Alkol Kullanımı	Etil Sülfat
	Tütün Kullanımı	Kotinin,Tütüne Özgü Nitrozaminler
	Yasa Dışı İlaç Kullanımı	İlaç ve İdrar Metabolitleri (Benzoilekgonin, Ekgonin,Tetrahidrokanabinol, amfetamin, metamfetamin, MDMA, 6-MAM)
Beslenme	Aşırı Anabolik Steroid Kullanımı	Sentetik Steroidler ve Metabolitleri Sentetik Tatlandırıcılar
	Meyve ve Sebze Tüketimi	Flavonoidler
	Kafein Tüketimi	Kafein
	Et Tüketimi	Kreatinin, Taurin, 1-Metilhistidin, 3-Metilhistidin
Sağlık	Hastalık	Çeşitli İlaçlar ve Metabolitleri
	Oksidatif Stres	F2-İsoprostanlar, 8-Hidroksideoksiganizon
	Hamilelik	İnsan Koryonik Gonadotropini
	Alerji	Antihistaminler
Kanser	Göğüs, Pankreas, Akciğer, Testiküler	A-Fetoprotein (AFP), Karsinoembriyonik Antijen (CEA)
	Over	CA 125
Çevre	PAH Maruziyeti	Fenantrol ve Diğer PAH Metabolitleri,
	Aflatoksin Maruziyeti	Aflatoksin N(7)-Guanin

2.2.3. Kafeinin Popülasyon Değerlendirmesinde Kullanılması

Beşeri biyobelirteçler ile yapılan popülasyon büyüklüğünün ve hareketinin değerlendirilmesi, idrarla ya da feçesle atılan ve kararlı yapıda olduğu bilinen biyobelirteçlerin, kanalizasyon sisteminden alınan örneklerden analiziyle gerçekleşir. Böylece gerçek popülasyon resmi popülasyondan ayrılmış olur. Bu yöntem 2001’de G. Daughton’dan önce, 1970’lerde ‘‘Demographics’’ ve ‘‘flush’’ kelimelerinden türetilen ‘‘Demoflush’’ kavramı ile ortaya atılmıştır. Ocean City, Maryland’de kanalizasyon atık suları akış oranlarına bakarak bölgeye gelen turist sayısını değerlendirmişlerdir. ASAP-SCIM (Kanalizasyon kimyasallarını kullanarak popülasyon analizi yapılması) ve FEUDS (Kanalizasyon ilaç verileriyle adli epidemiyoloji) kavramını ortaya atan G. Daughton, popülasyon değerlendirmesinde bir majör idrar metaboliti olan kreatinin ile majör fekal sterol olan koprostanolün popülasyon tahmininde kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmiştir. Popülasyon büyüklüğünü değerlendirmek için her ilaç grubunun değil, biyobelirteçlerin kullanılması ve kararlı yapıda olması gerektiği; insan dışındaki canlılardan kanalizasyon sistemine ulaşmaması; örneklemenin düzgün yapılması; kanalizasyon sisteminin özellikleri gibi durumların üzerinde durmuştur. Ayrıca atık sulardaki hedef madde analizleriyle yasa dışı madde kullanımının dışında toplum sağlığıyla ilgili bilgilere de ulaşılabilceği söylenmektedir (55).

Yasa dışı madde kullanım miktarı çalışmalarında, yasa koyuculara ve yasa dışı madde kullanımıyla mücadele eden birimlere doğru bir sonuç sunmak önemlidir. Bölgenin numune toplanan andaki gerçek nüfus bilgisine ulaşmak ve nüfus hareketlerini izlemek yaşanan sıkıntılardandır. Bu yüzden kafein gibi beşeri biyobelirteçlerden gerçek nüfus bilgisine ulaşmak önemlidir.

Atık suda popülasyon tahmini aşağıdaki formüle göre hesaplanır (1);

$$Popülasyon = \frac{C_{bk} \times F \times E_R}{DDD}$$

C_{bk}: Biyobelirtecın konsantrasyonu (ng/L)

F: Akış hızı (L/gün)

E_R: Biyobelirtecın vücuttan atılım hızı

DDD: Biyobelirteç için tanımlanmış günlük doz (mg/1000 kişi).

Buradan elde edilen popülasyon değeri, günlük 1000 kişi başına yasa dışı madde kullanımının hesaplanması için veri sunmaktadır.

$$Madde\ kullanımı\ (mg/gün/1000\ kişi) = \frac{(C_{tr} \times F) \times C_f}{Popülasyon}$$

C_{tr}: Atık sudaki hedef madde konsantrasyonu (ng/L)

F: Akış hızı (L/gün)

C_f: Hedef maddenin düzeltme faktörü

Atık sularda idrar biyobelirteci olarak kullanılabilen kimyasalları, ilk kez 2008 yılında Chiaia ve ark. değerlendirmiştir (56). Çalışmada; kreatininin insan idrarındaki varlığı, dolayısıyla da atık sularda her daim bulunması; yasa dışı madde kullanımı oranıyla kıyaslama yapılabilen bir alternatif beşeri biyobelirteç olabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmadan sonra artık popülasyon büyüklüğünü değerlendirmede kullanılabilecek olan daha kararlı ve daha doğru sonuca götüren metabolitler ve maddeler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Lai ve ark. 2011 yılında çeşitli farmasötikler ile yasa dışı maddeler arasında değerlendirme yapmış bir beta bloker ilaç olan atenololün popülasyon değerlendirilmesinde kullanılabilen önemli bir aday olduğunu tespit etmişlerdir. Chen ve ark. 2014 yılında kolesterol, kreatinin,

koprostonal, kotinin, kortizol, androstenediyon ve 5-hidroksiindolasetik asiti (5-HIAA) popülasyon değerlendirmesi için analiz etmişler. Kreatinin, kortizol, androstenediyon stabilite nedeniyle değerlendirilememiş; kotinin ve 5-HIAA güncel nüfus ile orantılı sonuçlar vermiştir (1).

Kafeinin popülasyon büyüklüğünü değerlendirilmede kullanılması; 2015 yılında Senta ve ark. kafein, nikotin ve bazı metabolitlerini analiz etmesiyle başlar. Kafeinin popülasyon büyüklüğünü değerlendirmede niteliksel bir biyobelirteç; nikotinin ise niceliksel bir biyobelirteç olduğu sonucuna ulaşmışlardır. 2016 yılında Rico ve ark. Valencia’da yaptığı çalışmada asesülfam, 5-HIAA, atenolol, kafein, karbamazepin, kodein, kotinin, kreatinin, hidroklorotiyazid, naproksen, salisilik asid, hidroksikotinin aynı kanalizasyon sistemindeki hidrokimyasal parametrelerle kıyaslama yaparak değerlendirilmiştir. 3 farklı kanalizasyon sisteminde çalışılan numunelerde; kafein, kotinin ve 5-HIAA’nın KOİ ile benzer popülasyon tahminine ulaştırdığı görülmüştür (1). 2017 yılında ise Gracia Lor ve ark. atık su-kafein analizlerinde kafein metabolitlerinden hangisinin çalışmalarda daha uygun sonuca ulaştırdığı konusuna yoğunlaşmışlardır. Kafein ve metabolitlerinin farmakokinetik verilerini derleyerek anlık idrar analizi ile atık sulardaki analizini kıyaslamışlardır. Kafein metabolitlerinden 1,7-dimetilürik asitin diğer metabolitlere göre daha kararlı yapıda olduğu sonucuna ulaşarak bu metabolit için bir düzeltme faktörü oluşturmuşlardır. Avrupa şehirlerindeki ticari verilerden topladıkları kişi başı kafein tüketim miktarı ile düzeltme faktörü kullanarak atık sulardaki 1,7-dimetilürik asit üzerinden kişi başı kafein tüketim miktarlarını kıyaslamışlar ve sonuçların uyumlu olduğunu gözlemlemişlerdir. Böylece kafein metaboliti olan 1,7-dimetilürik asit üzerinden atık su analizlerini gerçekleştirmenin, popülasyon büyüklüğü ve dinamiğini bu metabolit üzerinden yürütmenin daha doğru sonuçlara ulaştırdığına kanaat getirmişlerdir (19).

Günümüzde toplumla ilgili verilerde atık su analizlerinde biyobelirteç olarak kafeinin yanı sıra, nikotin (1,2,5,19), çeşitli farmasötikler (1,2), tıbbi ilaç ve kişisel koruyucu ürünler (PPCP) (57) ve pestisitler (58) de kullanılmaktadır.

2.2.4. Yüzey suları ve Kafein

Yüzey suyu; yer altı suları haricindeki bütün iç suları, geçiş suları ve kıyı suları olarak tanımlanır (59). Hem kentlerin hem de nüfusun giderek artması, su kaynaklarının hızlı tüketilmesine ve kirlenmesine neden olmaktadır. Ülkeler, kişi başına düşen kullanılabilir su miktarına göre sınıflandırıldığında yıllık 1000 m³ ten az ise su fakiri, 1000-2000 m³ ise su azlığı çeken ülke ve 2000 m³ ten fazla ise su zengini ülke olarak sınıflandırılmaktadır. Ülkemiz de kişi başına düşen 1555 m³ su miktarıyla su azlığı çeken ülke sınıfındadır. Bu yüzden var olan kaynakların dikkatli kullanılması, kullanılan suların ise geri kazandırılması önemlidir (60).

Yüzey sularının kalitesinin takibi, izlenmesi ülkemizde Yüzeysel Sular ve Yeraltı Sularının İzlenmesine Dair Yönetmelik esas alınarak yapılmaktadır (59).

Yasal ve yasal olmayan ilaçlar; kozmetik, besin takviyeleri, kişisel bakım ürünleri içerikleri ve bunların metabolitleri; PPCP olarak tanımlanmakta ve bu ürünler kullanılmaları sonucunda kanalizasyon aracılığıyla doğada varlığına devam etmektedir. Daughton ve Ternes 1999 yılında şimdiye kadar kirletici olarak pestisitlere, endüstriyel ara ürünlere odaklanıldığını ve bunlar üzerinden değerlendirme yapıldığını ifade etmekte; ancak bunları büyük bir yapbozun sadece bir parçası olarak değerlendirmektedir. Daha az dikkat çeken PPCP'ler de gizli birer kirletici olup su ekosistemine devamlı akıtılmaları halinde çevre ve orada yaşayan canlılar için tehlike oluşturmaktadır (61). 1965'lerde hormonların atık sularda tam olarak giderilemediği; 1970'lerde ise bu farmasötiklerin toksikolojik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmasıyla daha önce kontaminant olarak düşünülmeyen ancak devam eden kullanımı

nedeniyle son dönemde “‘emerging pollutants” diye tabir edilen kirleticiler üzerine araştırmalar yoğunlaşmaya başlamıştır (9).

EDC, PPCP, tıbbi ilaçlar, antibiyotik gibi kimyasallar kullanım sonrası insan metabolizmasında dönüşüme uğrayarak kanalizasyon aracılığıyla atık su şebekesine ulaşır. Bu metabolitler atık su sisteminde giderilemeyip alıcı ortama deşarj edildiğinde ya da atık su sistemindeki sızıntılar nedeniyle yüzey sularına ve yer altı sularına ulaşp kaynakların kirlenmesine neden olmaktadır.

CAF; kahve, çay gibi içeceklerin dışında grip, soğuk algınlığı, idrar söktürücü, ağrı kesici, anti inflamatuvar birçok ilaç grubunun içinde de bulunmaktadır. CAF ve PXT metabolizma faaliyetleri sonucunda ortaya çıkar. Kafeinin bir kısmı metabolize olmadan, büyük çoğunluğu da PXT’ye dönüşerek idrarda salgılanır. Bu yüzden yüzey sularına atık suların karıştığını gösteren antropojenik bir belirteç olarak kabul edilir (7).

Arıtma tesisi çıkışında ve yüzey sularında; ilaç kalıntıları, CAF, kotinin gibi kimyasalların tespit edildiği çok fazla sayıda çalışma vardır (7,9,10,62). Kosta Rika ve Brezilya’da yapılan çalışmalarla kafeinin yüzey sularında varlığı 753.5-1100 $\mu\text{g/L}$ ıkmıştır (10). Yüzey sularında CAF tespitinde Avrupa’da en yüksek oran Romanya ve İşpanya’dadır (63,64) .

Kafeinin deniz sularında ölçülen en yüksek değeri, 11 $\mu\text{g/L}$ ile Kuzey Avustralya’da Darwin Limanına aittir. Onu 8 $\mu\text{g/L}$ ile Japonya takip etmektedir. Avrupa’da bu çalışmalar daha azdır. Fransa, Danimarka, Almanya, Hollanda, Portekiz gibi ülkelerin deniz sularını içeren 2014 yılında yapılan çalışmada, Çanakkale boğazından alınan numunelerde ortalama 3 $\mu\text{g/L}$ ile en yüksek orana, İtalya ise 1 $\mu\text{g/L}$ ile ikinci en yüksek CAF konsantrasyonuna sahiptir (10).

Türkiye’de yapılan çalışmalara baktığımızda Aksaray şehrinde hastane atık sularında, kanalizasyon atık sularında, içme suyu olarak kullanılacak ham sularda ve arıtılmış sularda PhAC tespiti için çalışma yapılmıştır. PhAC’ların miktarı kış mevsiminde sıcaklığın düşük olması ve bozunmanın daha az olması nedeniyle yaza oranla daha fazla tespit edilmiştir. CAF

en yaygın PhAC'lardandır. Çalışmadaki atık su numunelerinde 20,8-159,79 µg/L bulunmuştur. Türklerdeki aşırı çay tüketimi ve çayların doğrudan lavaboya dökülmesi atık sularda ve sularda kafeinin yüksek çıkmasına neden olmuştur. Tüm su numunelerinde PhAC'ların tespit edilmesi, kamu ve çevre sağlığı açısından potansiyel risk olduğunu göstermektedir. Şu an içme sularında PhAC sınırı için herhangi bir yönetmelik ya da öneri bulunmamaktadır ancak kullanım yoğunluğu devam ettiği sürece yakın zamanda değerlendirilmeye alınabilir (9).

Çerkezköy bölgesinde atık su arıtma tesisi çıkışında alınan su numunelerinde az miktarda da olsa CAF ve ilaç kalıntıları tespit edilmiştir. Bu da arıtma tesisinin yeterli olmadığını ve yüzey sularının kalıcı olarak kirlenmesine neden olabileceğini göstermektedir (37).

Ceyhan nehrinde; ağrı kesiciler, kardiyovasküler ilaçlar, merkezi sinir sistemi uyarıcıları gibi çeşitli PhAC analizi için farklı noktalardan numune alınıp çevresel risk değerlendirilmesi yapılmıştır. Nehirde tespit edilen kimyasallar arasında 4,8 µg/L en yüksek ortalama ile CAF bulunmaktadır. Şu an için herhangi bir çevresel risk ortaya çıkmamıştır; ancak PhAC'ların bir arada bulunmasıyla oluşabilecek toksik etkiler ile ilgili daha çok araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır (8).

Su kaynaklarının kirlenmesiyle denizde yaşayan canlıların zarar görür, biyoçeşitlilik azalır ve patojenik salgılar gibi çevre sağlığı ve dolayısıyla insan sağlığı da tehdit altında olur. Bu kimyasal kirleticilerin kalıcılığı, taşınması tam olarak bilinmemekte, yeni yeni risk değerlendirmesi yapılmaktadır (62). Yüzey sularında artık PPCP'lerle birlikte CAF ve PXT gibi kafein metabolitlerinin de varlığı çevresel açıdan risk değerlendirilmesinin de yapılmasını gerektirir. Ancak bu tarz çalışmalarda en zor kısım veri toplamadaki sıkıntılardır. Çevresel örneklerde ortaya çıkan kirleticilerin takibini yapmak, referans laboratuvar olmak ve projelere destek vermek amacıyla 2005'te Avrupa Komisyonunun desteğiyle faaliyete başlayan

NORMAN ağı üzerinden dahi kamuya açık olan verilere ulaşmak konusunda Rodriguez-Gil ve ark. yaptıkları çalışmada sıkıntılar yaşandığını ifade etmiştir (7).

Ülkemizde, çevre ve canlı varlıkların korunması adına atık suların uygun alıcı ortama verilmeden önce, kanalizasyon şebekesi için uygulanacaklar 13.03.1984 tarihinde Atık Suların Kanalizasyon Şebekesine Deşarj Yönetmeliği ile garanti altına alınmıştır (45). Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği ile de arıtılmış suların doğaya bırakılması kontrol altındadır.

Temiz su kaynaklarının azalması nedeniyle arıtılmış sular, tarımda yeniden kullanılabilir. Tarımda kullanılan bu geri dönüşüme uğramış atık sular, toprakta birikip yeraltı ve yerüstü su kaynaklarına bulaşabileceğinden, iyi bir arıtma işleminden geçirilmeli; sağlık riski oluşturan patojenler ve kimyasallar dikkate alınmalıdır. Böylece kafein gibi kirleticilerin temiz su kaynaklarına karışması önlenmiş olur (65,66).

Yüzey sularında CAF ve metabolitlerinin varlığı az miktarda da olsa suyun kirlenmesine neden olmakta ve burada yaşayan canlıları etkilemektedir. Yüzey sularında ya da arıtma tesisi çıkış sularında yapılan çalışmalarda CAF diğer kimyasallara oranla hep fazla miktarda tespit edilmiştir. Bu durum, kafeinin yoğun kullanımından kaynaklanmaktadır. Deniz ekosisteminde yaşayan canlılar için CAF kirletici konumundadır; gereken önem gösterilmeli ve konuyla ilgili daha çok araştırma yapılmalıdır. Bu ilaçların yüzey sularında varlığıyla oluşan toksisitesi, sinerjik etki yaratarak tek başlarına olan etkilerinden çok daha fazla olmaktadır (10). Gelecek yıllarda bu çalışmaların artmasıyla; CAF gibi atık su kaynaklı yüzey ve yeraltı sularını kirletici kimyasalların yarattığı kalıcı hasarların, ne kadar önemli olduğu anlaşılacaktır (7).

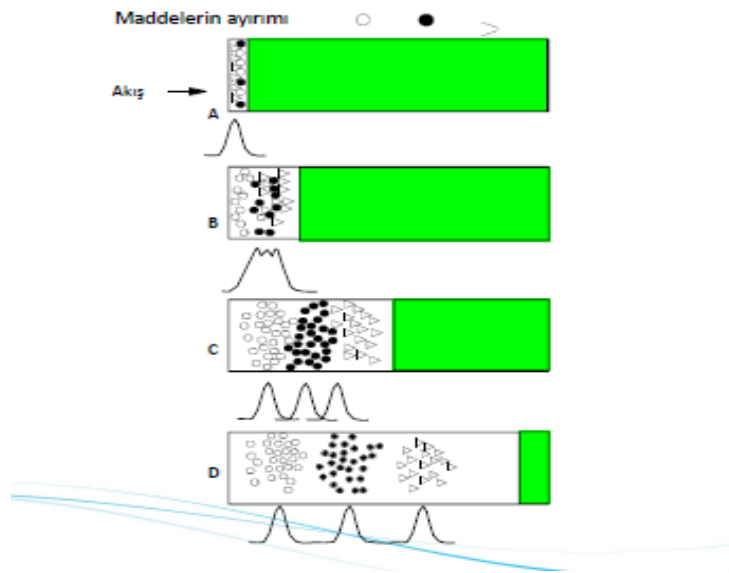
Özetle atık sularda hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirip beşeri biyobelirteç olarak kafein analizinin yapılabilmesi; atık suda yasa dışı madde analizi çalışmalarında popülasyon büyüklüğü ve dinamiği hakkında veri sağlamaya ve antropojenik bir belirteç olarak yüzey

sularına atık suların karıştığını, yüzey sularında kirlilik olduğunu gösteren bilgiye ulaşmayı sağlayacaktır.

2.3. Kromatografi

Kromatografi, maddelerin birbirinden ayrılmasını ve tanınmasını sağlayan kimyasal bir yöntemdir. ‘‘*Khroma (renk)*’’ ve ‘‘*graphe (yazı)*’’ kelimelerinden türetilmiştir (67). İlk kez 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin ayrımında kullanılmasından bu yana günümüzde sağlık, kozmetik, gıda, tarım, sanayi gibi birçok sektörde kullanılmaya devam edilmektedir.

Kromatografi, sabit bir faz üzerinde yürütülen hareketli faz yardımıyla karışımındaki maddelerin birbirinden ayrılması esasına dayanır. Sabit faz katı ve sıvı, hareketli faz ise sıvı ve gaz olabilir. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi örnekteki maddelerin göç etme hızlarının farklı olması nedeniyle maddeler gruplaşarak ilerler ve birbirinden ayrılır (68,69).



Şekil 2.7. Kromatografik Ayrım Modeli (69)

Kromatografide bilinmesi gereken bazı kavramlar vardır:

- Mobil faz, numuneyi sabit faz boyunca taşıyan çözücü karışımdır. Mobil faz seçiminde, çalışılacak numunenin özellikleri önemlidir.
- Sabit faz, mobil fazla gelen numunenin etkileşime girdiği ve alıkonulduğu fazdır. Kolon olarak da adlandırılır. Kromatografi tekniğinin çeşidine göre ticari boyutta çeşitli kolon üretimi yapılmaktadır. Kolon mm cinsinden uzunluk ve çap, firma adı, sabit faz türü, Ångström türünden poroz yüzey çapı ve mm cinsinden partikül büyüklüğü şeklinde tanımlanır (67).
- Alıkonma, mobil faz ile birlikte gelen numunenin sabit faz içinde etkileşime girerek yavaşlaması ve daha geç sabit fazı terk etmesi olayıdır. Sabit fazı terk ettiği zamana da alıkonma zamanı (RT) denir. RT, her kimyasalın parmak izi niteliğindedir.

Kromatografi çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. Kullanılan mobil faza göre ise gaz ya da sıvı (likit) kromatografisi adını alır.

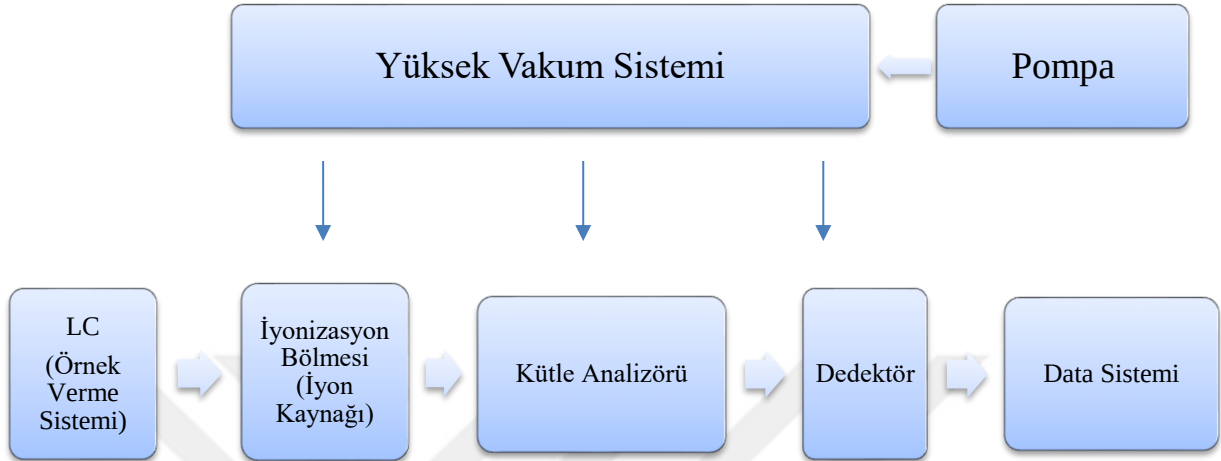
2.3.1. Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı kromatografisinin (LC) kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kullanılarak molekül yapısının aydınlatılmasında kullanılan bir cihaz ve yöntemdir. Duyarlılık, özgüllük ve sonuç verme süresinin kısalığı bakımından diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır ve uçucu olmayan büyük moleküllü yapılar için tespit ve tayin yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Kütle spektrometresi; numunenin cihaza verildiği bölüm, iyonizasyon bölgesi, kütle analizörü, iyon dedektörü ve data-kayıt sistemi olmak üzere 5 kısımdan oluşur.

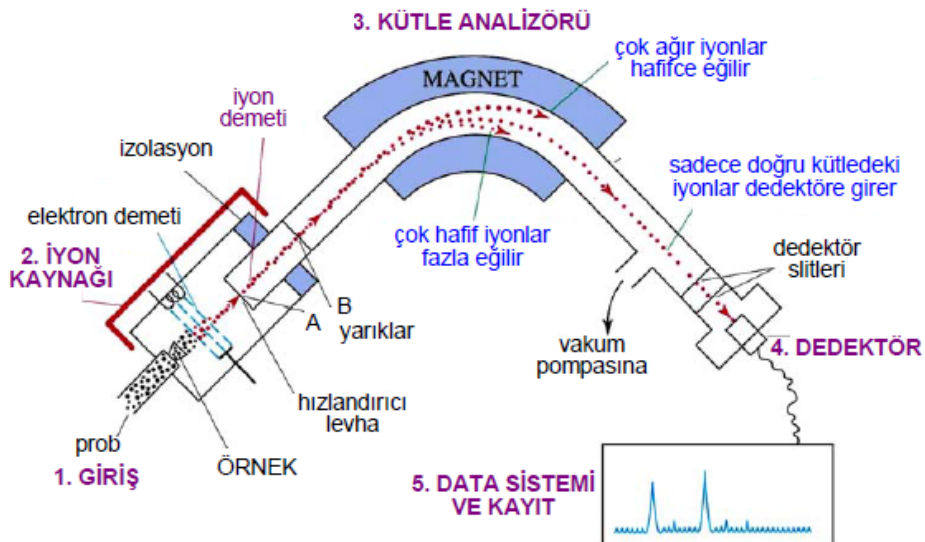
Numunenin MS sistemine girişi, sıvı kromatografisi kullanılarak gerçekleşiyorsa sistem, LC-MS olarak tanımlanır. LC-MS'te numunedeki bileşenler ilk önce sıvı kromatografisi ile birbirinden ayrılır, daha sonra kütle spektrometresi kullanılarak tanınır ve miktarı hesaplanır.

Şekil 2.8’de LC-MS sisteminin genel birimleri gösterilmiştir. Sistem yüksek vakum altında çalışır. Bunun nedeni iyonize moleküllerin başka iyonlarla çarpışmasını engelleyerek tekrarlanabilir fragmentasyon sağlamak ve yüksek hassasiyetle analiz gerçekleştirmektir.



Şekil 2.8. LC-MS sistem birimleri

Şekil 2.9’da Kütle Spektrometresinin bölümleri gösterilmiştir.

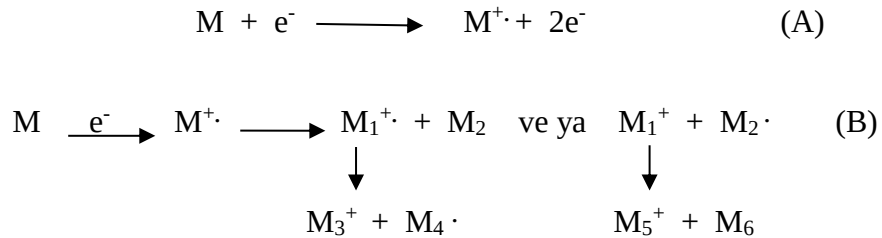


Şekil 2.9. Kütle Spektrometresi kısımları (70)

MS iyon kaynağı, numunenin iyonlaştırılarak kütle analizörüne gönderildiği kısımdır. Hem pozitif (+) hem de negatif (–) iyonlar oluşur; ancak + iyonlar çoğunluktadır. Kimyasal İyonizasyon (CI), Hızlı Atom bombardımanı (FAB), Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI), Atmosferik Basınç İyonizasyonu (API) gibi çeşitli iyon kaynakları vardır. LC-MS sistemi için en yaygın kullanılan iyonizasyon kaynağı API'dır. API iki tiptir:

- Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
- Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI)

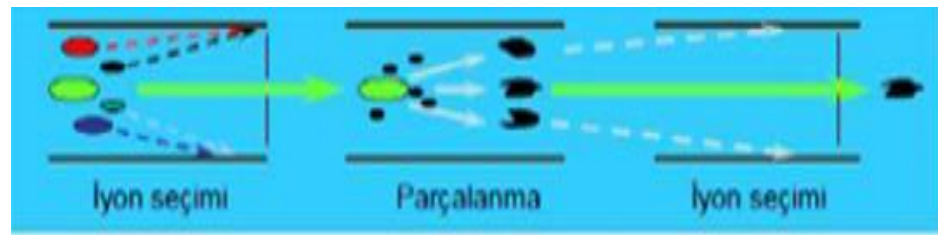
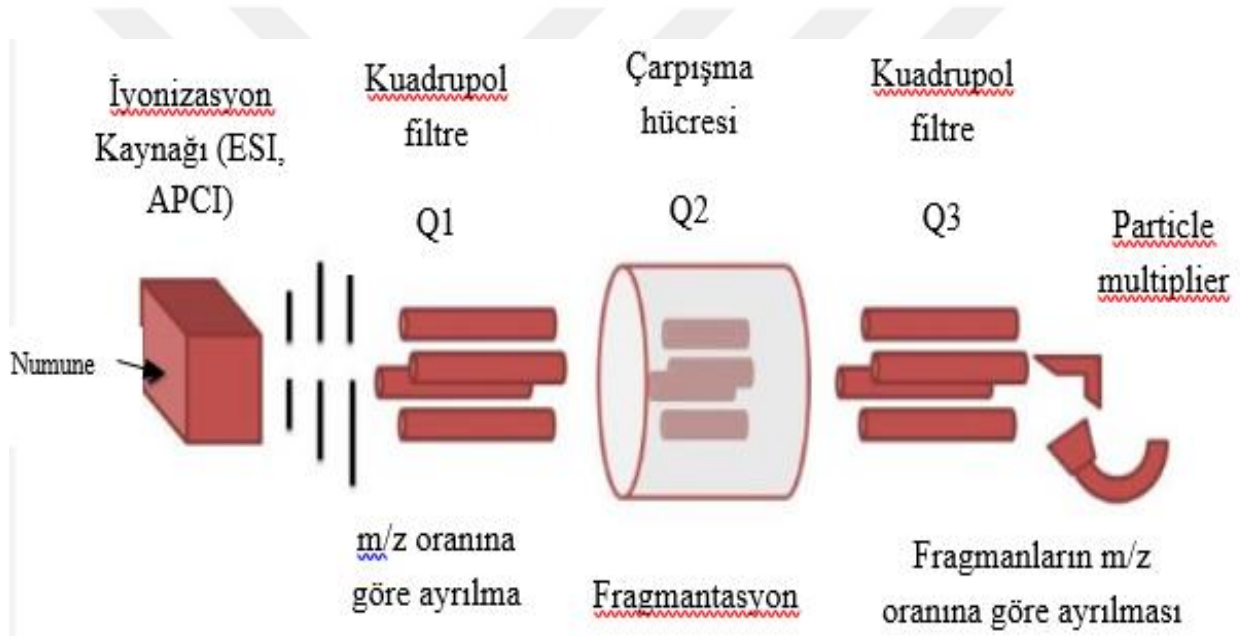
Molekül iyon kaynağında elektron bombardımanına tutulur. Bu elektronların enerjisi, molekülün iyonizasyon potansiyeline yükseltildiğinde molekülden $1 e^-$ ayrılır ve moleküler iyon (M^+) meydana gelir. M^+ daha ileri parçalanmalara yani fragmentasyona da uğrar. Oluşan bu küçük moleküllere fragman denir. Bu durum Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Bir molekülde bölünmenin nereden olacağı o moleküle özgüdür ve oluşan spektrum bize ana molekül hakkında bilgi verir (71,72).



Şekil 2.10. Moleküler iyon oluşumu (A), Moleküler iyonun parçalanması (B) (71)

Kütle analizörü, iyon kaynağından gelen iyonların manyetik alandan geçerek m/z oranına göre ayrıldığı kısımdır. Çok küçük kütle farklılıklarını algılayıp buna bağlı iyon akımlarının üretilbildiği bir düzeneştir. Manyetik Sektör Analizörü (MSA), Kuadropol Analizör (Q), Zaman-yol Bağımlı Analizör (TOF) gibi kütle analizörleri vardır.

LC-MS sistemlerinde genelde kütle analizörü olarak kuadrupol analizörler kullanılır. Ardışık kütle spektrometresinde iyonlaşan moleküller 1.kuadrupol filtreden (Q1) geçerek m/z oranına göre ayrılır. Daha sonra çarpışma hücresinde (Q2) “collision gas” adı verilen yüksek saflıkta gaz ile parçalanmaya tabi tutulur. İkinci kuadrupol filtrede (Q3) parçalanmış iyonlar üzerinden teşhis ile molekül tanımlanarak miktar tayini yapılır. İki kez kuadrupol filtreden geçtiği için cihaz LC-MS/MS adını alır (73,74). Moleküllerin kuadrupol kütle analizöründeki ilerleyişi Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Moleküler iyon (precursor ion)

Ürün iyon (product ion)

Şekil 2.11. Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS) (73,74)

Kuadrupol kütle analizöründe Seçili İyon İzleme (SIM), Seçili Reaksiyon İzleme (SRM), Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM), Öncü İyon (Precursor İon) gibi çeşitli tarama (scan) modları kullanılmaktadır. LC-MS/MS sisteminde yüksek duyarlılık ve özgüllük için MRM yöntemi kullanılır. MRM yönteminde, kantitasyonu yapılacak analite özgü ve daha önceden tanımlanmış m/z değerindeki ana iyon ve fragman iyon ikilisi izlenir. Bu ikili, kantite edilecek bileşene aittir ve daha fazla iyon çifti izlenerek özgüllük artırılır (75,76).

İyon dedektörü, kütle analizöründen gelen iyonların toplayıcı bir elektrot üzerine düştüğü ve iyon akımının oluştuğu kısımdır. İyon enerjilerini elektriksel sinyallere dönüştürür. Daha sonra yazılım bu sinyalleri alan değere dönüştürerek okur (67,73).

Data Sistemi ve kayıt, iyon akımlarının oluşturduğu sinyallerle oluşan kütle spektrumlarının bilgisayar programlarında sayısal değerlere dönüştürülmesi ve kaydedilmesidir.

LC-MS/MS sisteminde her bir molekül için t_R ve m/z oranı vardır. Aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000'dir (67). Bu yüzden LC-MS/MS sonuçlarının doğrulanmasına gerek duyulmaz. Yüksek duyarlılık, kesinlik, az miktarda örnek gerektirmesi, geniş analitik ölçüm aralığı, birçok analiti aynı anda ölçebilme gibi avantajlarının yanında cihaz bakımının yüksek maliyetli olması, analizin kompleks olması nedeniyle yeterli deneyime sahip analiste ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları da vardır.

LC-MS/MS ile yöntem geliştirmesi için gerekli basamaklar; çalışılacak analitin kimyasal özelliklerinin tanımlanması, analite özgü fragmanların belirlenmesi, uygun kolon seçimi, kolon üzerinde akış ve sıcaklık parametrelerinin belirlenmesi şeklindedir (77).

2.4. Geçerli Kılma (Validasyon) Çalışması

Bir analitik yöntemin geçerli kılınması, analitik yöntemin ihtiyaç duyulan gereksinimi karşılayacak yeteneğe sahip olduğunu onaylamak amacıyla yapılan ölçüm işlemleri sürecidir. Bu onaylanma deneylerden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak yorumlanmasıyla kanıtlanır.

Analitik yöntemle yapılan ölçümün sonuçları; laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan standart madde, analist gibi birçok faktörden etkilenir. Bu koşulların ölçüm sonuçlarına etkisi belirlenmelidir. Bu yüzden yöntemin geçerli kılınması gereklidir.

Geçerli kılma yeni bir yöntem geliştirildiğinde, bir yöntem laboratuvara ilk kez uygulandığında, mevcut yöntemde değişiklik yapıldığında, geçerli kılınmış bir yöntem farklı bir laboratuvarda uygulandığında, kalite kontrol testleri sonunda yöntemin performansında zamanla değişim olduğunda yapılır (72,78).

Yöntemin geçerli kılınmasından önce cihazın performansının test edilmesi ve uygunluğunun sağlanması gerekir.

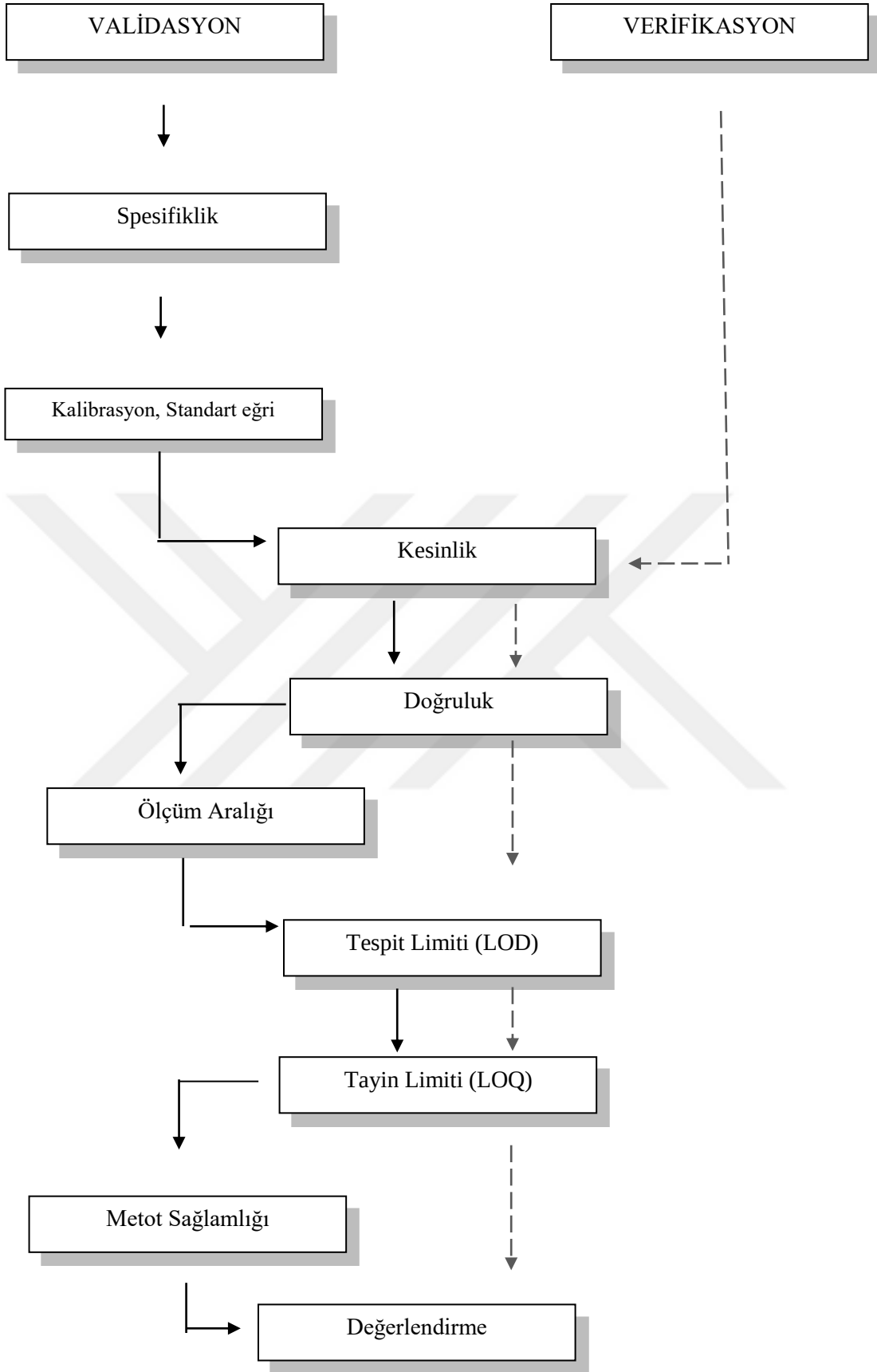
Tablo IX’da bir analitik yöntemin geçerli kılınması için değerlendirilmesi gereken parametreler gösterilmiştir.

Tablo IX. Yöntemin geçerli kılınması parametreleri (79)

Seçicilik/Spesifiklik
Tespit Limiti ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ)
Doğrusallık ve Çalışma aralığı
Analitik duyarlılık
Doğruluk - Gerçeklik (Sapma, Geri kazanım) - Kesinlik (Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik)
Sağlamlık (Dayanıklılık)
*Ölçüm belirsizliği yöntemin performans özelliği ve geçerli kılma parametrelerinden değildir; o metod performansı kullanılarak elde edilmiş sonuçların bir özelliğidir.

Doğrulama ya da verifikasyon, laboratuvar arası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir yöntemin laboratuvar şartlarında teyit edilmesidir. Bir yöntem laboratuvarlar arası çalışma ile geçerli kılınmışsa doğrulama (verifikasyon) yapılması yeterlidir (72,79,80,81).

Şekil 2.12’de Validasyon ya da Verifikasyon yapıldığında hangi geçerli kılma bileşenlerinin çalışması gerektiği gösterilmiştir (80).



Şekil 2.12. Validasyon ve Verifikasyon Ayrımı (80)

2.4.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

Spesifite, yöntemin aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğidir (80). Yöntemin analite özgü olup olmadığını gösterir.

2.4.2. Doğruluk (Accuracy)

Kullanılan analitik yöntemde elde edilen ölçüm sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır. Sistemik ve rastgele hataları göz önünde bulundurarak sonuçların doğruluğu değerlendirilir. Gerçeklik ve Kesinlik olarak iki ana bileşenden oluşur.

2.4.2.1. Gerçeklik

Gerçeklik için sistemik hata hesabı (bias) yapılır. Gerçeklik; sertifikalı referans materyalin sertifika değerini kullanarak, referans metot kullanarak, yeterlilik testine katılarak ya da geri kazanım çalışmaları yapılarak hesaplanır (79).

2.4.2.2. Kesinlik (Precision)

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı numuneye tekrar tekrar uygulandığında elde edilen ölçümler arasındaki tutarlılığıdır. Tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar üretilebilirlik (reproducibility) olarak ikiye ayrılır.

Tekrarlanabilirlik; aynı cihaz, aynı laboratuvar, aynı analist tarafından kısa zaman içinde yapılan ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesidir. ‘r’ ile ifade edilir. Tekrar üretilebilirlik; farklı laboratuvar, farklı analist, farklı ekipman ve kimyasallarla geniş zaman aralığında elde edilen ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesidir. ‘R’ ile ifade edilir. Eurachem rehberine göre tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik arasında bir de ara kesinlik (intermediate precision) çalışmaları vardır. Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik olarak da ifade edilir.

Çalışmalarda sapan verilerin tespiti için ölçüm sayısına göre Grubbs ya da Dixon Testi uygulanır (80).

Kesinlik çalışmaları, farklı derişimlerde (3 farklı konsantrasyon önerilir) ve 6-15 tekrarla gerçekleştirilir (72,79,81).

Kesinlik kantitatif analizlerde standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) ile ifade edilir.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad \%RSD (CV) = \frac{SD}{\bar{X}} * 100$$

2.4.3. Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma aralığı (Range)

Bir analitik yöntemde doğrusallık, belirli konsantrasyon aralıklarında ölçüm sonuçlarının konsantrasyonla orantılı artmasıdır. Doğrusallık için Eurachem Rehberine göre ölçümler, en az 6 noktada olacak şekilde 3 tekrarlı yapılmalıdır. Her bir nokta ana solüsyondan dilüsyon şeklinde değil bağımsız olarak hazırlanmalıdır. Doğrusallık, referans konsantrasyona karşılık ölçüm sonucu ya da ölçüm sinyali olarak çizilebilir. Sonuçlar grafiksel verilir. Doğrunun denklemi ($y=ax+b$) ve korelasyon katsayısı (r) belirlenir. Kalibrasyon eğrisinin lineer olduğunun göstergesi korelasyon katsayısının ± 1 'e yakın olmasıdır (84). Bunun yanında F değeri ile de karşılaştırılarak doğrusallık kontrol edilir. Hesaplanan F değeri, F tablosundan (%95 güven aralığında $n-2; n*p-n$ serbestlik derecesi ile) elde edilen değerden küçük ise kalibrasyon eğrisi doğrusaldır denir (80).

Kantitatif analizlerde bir çalışma aralığının da belirlenmesi gerekir. Çalışma aralığında alt limit LOQ olurken, üst limit analitik duyarlılıkta bozulmanın görüldüğü konsantrasyon olabilir ya da çalışılacak analize, numuneye göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Doğruluk çalışmaları ve çalışılan numuneler yöntemin lineer olduğu aralıkta olmalıdır.

2.4.4. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

Tespit Limiti (LOD), maddeye ait sinyalin gürültüden ayırt edilebildiği en düşük konsantrasyondur. Algılama sınırı olarak da ifade edilir.

Tayin Limiti (LOQ), yöntemin performansının kabul edilebilir olduğu en düşük konsantrasyondur yani belirlenmiş koşullarda kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukta tespit edilebilen miktardır.

TURKLAB Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu Rehberine göre hesaplamalar; kör örneklerin sonuçları üzerinden, düşük analit miktarı üzerinden, yöntemin standart sapması üzerinden veya cihazın sinyal-gürültü oranından yapılabilir. Ayrıca elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin doğrulaması da yapılmalıdır (80).

2.4.5. Sağlamlık (Robustness)

Analitik yöntem üzerinde planlı değişiklikler yapılmasını ve bu değişikliklerin ölçüm sonuçları üzerine etkisini incelenmesidir. Ufak değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise yöntem o kadar sağlamdır. Farklı oda sıcaklıkları, farklı tecrübeye sahip analistler, farklı marka kimyasallar, standart çözeltilerin saklama koşulları gibi durumların üzerinde değişiklik yapılarak yöntem performansı üzerinde ne kadar etkisi olduğu incelenebilir.

2.5. Ölçüm Belirsizliği

Belirsizlik, ölçülen büyüklüğe karşılık gelebilecek değerlerin dağılımını gösteren bir parametredir. Ölçüm Belirsizliği, geçerli kılma bileşenlerinden değildir. Ancak geçerli kılma aşamasında belirsizlik kaynakları tespit edilip her birinden gelen belirsizlik değeri hesaplanabilir. Validasyon çalışmalarında kesinlik, gerçeklik ve doğrusalılık bileşenleri en büyük belirsizlik kaynağıdır. Ölçüm Belirsizliği değeri için her bir bileşenin standart belirsizliği

üzerinden *Relatif Standart Belirsizlik* hesaplanır. Tüm Relatif Standart Belirsizlikler birleştirilerek *Birleşik Standart Belirsizlik* (u_c) değeri hesaplanır (82).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihaz, araç ve gereçler Tablo X’da gösterilmiştir.

Tablo X: Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

Gereç	Marka/Model
LC-MS/MS Sistemi	Shimadzu LCMS-8045
Analitik Kolon	Waters Cortecs C18, 2.7µm, 2.1x100mm
Azot Jeneratörü	Peak Scientific Genius 1051
Yazılım	LSSMainWindow
Distile Su Cihazı	ELGA Purelab Flex
SPE Kartuş	ISOLUTE C18 500mg/6mL
SPE Manifoldu	Macherey-Nagel
SPE Vakum Motoru	Rocker 300/Millipore Billerica MA 01821
Azot Altında Uçurma Düzeneği	HyperVap HV-300 Gyrozen
Santrifüj	Hettich
Vorteks Cihazı	VELP Scientifica
Buzdolabı	Sanyo Labcool
Derin dondurucu (-20°C)	Samsung CooltechPlus
Ultrasonik Banyo Cihazı	Bandelin Sonorex
Hassas Terazî	Sartorius ACCULAB
Vial	ISOLAB
Otomatik Pipet	LLG Labware
Balonjoje	ISOLAB
Falkon tüpler	ISOLAB

3.2.Çalışmada kullanılan kimyasallar

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve markası Tablo XI’de gösterilmiştir.

Tablo XI: Laboratuvar çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Markası
Metanol	Sigma-Aldrich
Amonyum format	Fluka, eluent additive for UHPLC-MS
Formik asit	Fluka, eluent additive for LC-MS
Kafein (katı form)	Sigma-Aldrich
Kokain-d ₃ (iç standart)	Lipomed

3.3.Standard Çözeltiler

Çalışılacak tüm standart çözeltiler, iç standart (IS) olarak belirlenen Kokain-d₃ ile Madde 3.3.2’de belirtilen şekilde hazırlandı. Tüm stok çözeltiler +4°C’de, ağzı parafilm ile kaplanarak muhafaza edildi. Kalibrasyon çözeltileri, bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Kalibrasyon için kullanılan tüm referans standart maddelerin saflıkları >%99,0 olduğundan çözeltilerden gelen belirsizlik hesaplamalarda göz ardı edildi.

3.3.1. Kafein standart çözeltisi

Ana stok çözeltisi (100mg/L): 1 mg kafein (katı) tartılıp 10 mL metanol içerisinde çözülerek hazırlandı.

Ara stok çözeltisi (1 mg/L): Ana stok çözeltiden 0,1 mL alınıp metanol ile 10 mL’ye tamamlandı.

100 µg/L standart çözelti: Ara stok çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 10 mL’ye tamamlandı.

10 µg/L standart çözelti: Ara stok çözeltisinden 0,1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.3.2. İç standart (IS) Çözeltisi

Ara stok çözeltisi (10 mg/L): 1000 mg/L kokain-d₃ standart çözeltisinden 50 µL alındı 5 mL'lik balonjede metanol ile çözüldü.

Ara stok çözeltisi (1 mg/L): Kokain-d₃ ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Tüm çözeltilere son hacimde 10 µg/L olacak şekilde IS eklendi.

3.3.3. Doğrusallık ve doğruluk çalışmaları için hazırlanan çözelti

100000 ng/L standart çözelti: Kafein ara stok çözeltisinden 100 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 890 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

50000 ng/L standart çözelti: Kafein ara stok çözeltisinden 50 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 940 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

25000 ng/L standart çözelti: Kafein ara stok çözeltisinden 25 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 965 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

10000 ng/L standart çözelti: Kafein ara stok çözeltisinden 10 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 980 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

5000 ng/L standart çözelti: 100 µg/L kafein standart çözeltisinden 50 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 940 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

2000 ng/L standart çözelti: 100 µg/L kafein standart çözeltisinden 20 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 970 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

1000 ng/L standart çözelti: 100 µg/L kafein standart çözeltisinden 10 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 980 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

500 ng/L standart çözelti: 10 µg/L kafein standart çözeltisinden 50 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 940 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

400 ng/L standart çözelti: 10 µg/L kafein standart çözeltisinden 40 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 950 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

300 ng/L standart çözelti: 10 µg/L kafein standart çözeltisinden 30 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 960 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

200 ng/L standart çözelti: 10 µg/L kafein standart çözeltisinden 20 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 970 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

100 ng/L standart çözelti: 10 µg/L kafein standart çözeltisinden 10 µL, kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 980 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

Blank (kör) çözelti: Kokain-d₃ IS çözeltisinden 10 µL alınıp 990 µL çözücü eklendi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı.

3.4. Çekitleme yöntemi

Atık suda kafein analizi için geliştirilen bu yöntemde, numuneler LC-MS/MS sisteminde analiz edilmeden önce çekitleme ön işleminden geçirildi. Çalışmada, atık su numunelerine yakın bir örnek olan çeşme suyu numunesi kullanıldı. 50000 ng/L konsantrasyonunda kafein çözeltisi ile zenginleştirilen çeşme suyu numuneleri, katı faz çekitleme işleminden geçirilerek ölçümü yapıldı; çekitleme işleminin geri kazanım değerleri hesaplandı.

SPE kartuş boş (blank) : Çeşme suyuna sadece 500 µL IS ara stok çözeltisi ilave edildi. Hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

SPE kartuş (50000 ng/L): Çeşme suyu numunelerine kafein ara stok çözeltisinden 50µL, IS ara stok çözeltisinden 500 µL ilave edildi. Hacmi 50 mL'ye tamamlandı. 3 çalışma yapıldı ve her bir çalışma 3 tekrarla ölçüldü.

Çekitleme aşamaları

4. 6 mL metanol ve 6 mL distile su ile SPE kartuşları şartlandı.
5. 50 mL örneğin kartuşlara yüklemesi yapıldı.
6. 3 mL metanol-distile su (5:95) ile yıkama işlemi yapıldı.
7. 2x2 mL metanol ile elüsyon işlemi yapıldı. Azot altında uçurularak kalan kısım 1 mL 1:1 Mobil faz A: Mobil faz B karışımına alındı.



Şekil 3.1. Çekitleme Düzenegi

3.5. Yöntemin LC-MS/MS Sistemi ile Geliştirilmesi

LC-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirilmesi çalışmaları için önceki çalışmalardan yola çıkarak kafeinin ürün iyonları, parçalanma enerjileri, kafein için uygun mobil faz çözeltisi, akış zamanı, uygun kolon bilgileri araştırıldı. Tablo XII'te gösterilen değerler LC-MS/MS sistemine eklendi. Kafeinin kimyasal özelliklerinden yola çıkarak uygun mobil faz seçildi. Belirli

konsantrasyonlarda kafein standart çözeltileri LC-MS/MS sisteminde analiz edildi ve kafeinin alıkonma zamanı tespit edildi. LC sistemi için uygun kolon, enjeksiyon hacmi, analiz süresi, mobil faz akış bilgileri gibi parametreler Tablo XIII’de gösterilmiştir. Akış zamanı ve mobil faz oranları üzerinde değişiklik yapılarak kısa zamanda iyi bir ayırım ve seçicilikte kafein piki elde edilmeye çalışıldı. Yöntem için oluşturulan mobil fazın zamana göre değişimi Tablo XIV’te gösterilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki kafeinin pik alanları değerlendirilerek yöntemin duyarlılığı değerlendirilip validasyon parametreleri çalışıldı.

3.5.1. MS/MS Sistem Özellikleri

Tablo XII. MS/MS sistem parametreleri

İyonizasyon Modu	Elektrosprey İyonizasyon
Kafein Q1/ Q3 Mass (Da)	195.1 (ana molekül) 138 (Q1) / 110 (Q2)
Kokain-d ₃ (IS) Q1/Q3 Mass (Da)	307 (ana molekül) 105 (Q1) / 85.1 (Q3)
Declustering Potential (DP)	80
Entrance Potential (EP)	10
Collision Energy (CE)	Kafein Q1/Q3: 35/30 Kokain-d ₃ Q1/Q3: 47/47
Collision Cell Exit Potential (CXP)	8
Curtain Gas (CUR)	25
Collision Gas (CAD)	6
İonspray Voltage (IS)	5500
Temperature (TEM)	450
Ion Source Gas 1 (GS1)	30
Ion Source Gas 2 (GS2)	35
Collision Gas	N ₂ (Azot)
Dwell Time	250 milisaniye
Scan Type	MRM

3.5.2. Sıvı Sistem Özellikleri

Tablo XIII. LC sistem parametreleri

Akış hızı	0,5 mL/dk
Analiz süresi	6 dk
Enjeksiyon hacmi	100 µL
Kolon fırın sıcaklığı	50 °C
Mobil Faz A	Su (2 mM Amonyum Format + %0,1 Formik Asit)
Mobil Faz B	MeOH (2 mM Amonyum Format + %0,1 Formik Asit)
Kolon	Waters Cortecs C18 2.7µm 2.1x100 mm
t_R Kafein - t_R Kokain-d3	2.06 dk - 2.43 dk

Tablo XIV. Mobil fazın zamana göre akış değişimi

Zaman	Akış hızı	Mobil Faz A %	Mobil Faz B %
00.01	0.5	95	5
01.30	0.5	60	40
04.00	0.5	5	95
05.00	0.5	95	5
06.00	0.5	95	5

3.6 Validasyon Çalışmaları

3.6.1. Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

Madde 2.4.1.'de anlatıldığı gibi yöntemin seçiciliğini değerlendirmek için; içerisinde analit olmayan çözücü (MeOH) ile 1000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standart çözeltisinin pikleri karşılaştırıldı. Çözücünden kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirildi.

3.6.2. Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

Madde 2.4.4.'te verilen bilgiler doğrultusunda düşük konsantrasyonda (300 ng/L) CAF çözeltisi hazırlanarak LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. 10 tekrarlı olarak çalışıldı (n=10). Çalışmanın standart sapması hesaplanarak 3 katı LOD, 10 katı LOQ olarak kabul edildi.

$$LOD=3*SD$$

$$LOQ=10*SD$$

Tespit limiti için doğrulaması için 300 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF çözeltisi ile kör çözeltinin 3 tekrarlı ölçümü yapıldı (n=3). 300 ng/L CAF çözeltisinin ölçüm sonuçları ortalaması hesaplandı. Kör numune sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Tayin limiti doğrulanması için 300 ng/L konsantrasyonunda 3 tekrarlı ölçüm yapıldı (n=3). Ölçüm sonuçlarından elde edilen SD değeri, aşağıdaki formüle göre hesaplanan standart sapma (s) ile karşılaştırıldı.

$$s = \frac{x_{LO} \times \sqrt{n}}{3 \times t_{f;\alpha}}$$

($t_{f;\alpha}$: t tablosunda $f=n-1$ ve $\alpha=0,05$ değeri)

Tespit ve Tayin limiti için doğrulama çalışmaları TURKLAB Rehber 01'e göre yapıldı (80). (LOD doğrulaması için; zenginleştirme yapılan kör numunelerin ortalaması, maksimum kör değerden fazla olduğunda tespit limiti doğru kabul edilir. LOQ doğrulaması için; ölçüm sonuçlarının standart sapması, formüle göre hesaplanan s değerinden küçük ya da eşit olduğunda tayin limiti doğrulanmış olur.)

3.6.3. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)

Yöntemin doğrusallık çalışmaları için 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 25000, 50000 ve 100000 ng/L olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda CAF standart çözeltileri hazırlanıp 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüm yapıldı (p=3). Doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) hesaplandı. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı F testi ile de onaylandı. F değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$S_1 = \frac{\sum (y - y_t)^2}{n - 2} \quad S_2 = \frac{\sum (a - b)^2}{N \cdot p - N}$$

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

y: x konsantrasyonuna karşılık gelen y alan değeri

y_t : Kalibrasyon eğrisi formülünde x değerine karşılık gelen hesaplanan y değeri

a: İlgili konsantrasyondaki ilk paralel değer

b: İlgili konsantrasyondaki ikinci paralel değer

N: Toplam ölçüm sayısı

p: Her bir ölçümdeki tekrar sayısı

m: Toplam kalibrasyon noktası (Kalibrasyon 3 tekrarlı yapıldığında $N \cdot p - N$ formülü yerine 2m kullanılır)

F_{limit} değeri; $N - 2, 2n$ serbestlik derecesinde F tablosundan elde edildi (%95 güven aralığında).

F değeri, F_{limit} değerinden düşük olduğunda kalibrasyon eğrisi doğrusal kabul edilir (80).

3.6.4. Doğruluk (Accuracy)

Madde 2.4.2’de anlatılan yöntemin doğruluğu; gün içi-günler arası tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmalarıyla sağlandı.

3.6.4.1. Kesinlik (Precision)

Kesinlik çalışmaları; düşük (500 ng/L), orta (5000 ng/L) ve yüksek (100000 ng/L) konsantrasyonlarda ve 10 tekrarlı ölçümle gerçekleştirildi (n=10).

Aynı laboratuvar, aynı cihaz ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında 3 farklı konsantrasyonda (500-5000-100000 ng/L) CAF standart çözeltisi hazırlanarak gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. Sapan veriler olup olmadığını anlamak için Grubbs testi yapıldı.

Aynı analist tarafından 500-5000-100000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standart çözeltisi farklı günlerde ölçüldü; ölçümlerin günler arası kıyaslaması (günler arası tekrarlanabilirlik çalışması) yapıldı. Sonuçlar, %RSD_{wr} (günler arası %RSD) üzerinden değerlendirildi.

Tekrarüretilebilirlik çalışmaları farklı laboratuvar, farklı analist ve farklı donanım gerektirdiğinden bu çalışmada yapılamadı.

Validasyon hesaplamalarında RSD değerlerinin < %20 olması, çalışmaların uygun olduğunu göstermektedir (82).

3.6.4.2. Gerçeklik

Gerçeklik çalışmaları, kesinlik çalışmaları üzerinden değerlendirildi. 500-5000-100000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standart çözeltisi farklı günlerde 10 tekrarlı olarak ölçüldü; çıkan sonuçlar ile geri kazanım hesaplamaları yapıldı.

Geri kazanım değerlerinin %70-120 aralığında olması, çalışmaların uygun olduğunu göstermektedir (82).

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (A_1 - A_2) / A_3 * 100$$

A₁: Analit eklenmiş örnek konsantrasyonu

A₂: Analit eklenmeden önceki konsantrasyon

A₃: Eklenen konsantrasyon

3.6.5. Sağlamlık (Robustness)

Madde 2.4.5'te anlatıldığı gibi yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için kolon sıcaklığı 50°C'den 40°C'ye düşürüldü. 5000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standart çözeltisinin 3 tekrarlı ölçümü yapıldı (n=3). Sonuçlara t-testi uygulandı.

Yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için farklı analist ile de çalışıldı. 5000 ng/L konsantrasyonunda bir başka analist tarafından hazırlanan CAF standart çözeltisinin 5 tekrarlı ölçümü yapıldı (n=5). Sonuçlara t-testi uygulandı.

Çözelti stabilite kontrolü için 10000 ng/L CAF standart çözeltisi; oda sıcaklığı (22±5 °C), -4°C ve -20°C'de bir hafta boyunca takip edildi. 4 farklı günde 3 tekrarlı yapılan ölçümlerdeki farklılık ANOVA ile değerlendirildi.

3.7. Ölçüm Belirsizliği

Madde 2.5'te anlatılan ölçüm belirsizliği için kesinlik, gerçeklik bileşenlerinden ve kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlikler hesaplandı. Her bir bileşenden gelen standart belirsizlik ve “relatif standart” belirsizlik hesaplandı. Tüm relatif standart belirsizlikler birleştirilerek “birleşik standart belirsizlik (u_c)” değeri hesaplandı (82).

- Kesinlik çalışmalarından (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik) gelen standart belirsizlik için RSD_{pool} değeri hesaplandı:

$$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times RSD_1^2 + (n_2-1) \times RSD_2^2 + \dots + (n_n-1) \times RSD_n^2}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots + (n_n-1)}}$$

$$\text{Relatif Standart Belirsizlik} = RSD_{pool} / 1 \quad (a)$$

- Geri Kazanım çalışmalarından gelen standart belirsizlik, Bias Belirsizliği (u_i) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (85):

$$u_i = \sqrt{\left(\frac{|1-R|}{k}\right)^2 + (u_x)^2} \quad u_x = S_{Xort} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

u_i : Bias Belirsizliği

R: Tüm çalışmalardaki ortalama % geri kazanım değeri

u_x : Standart Belirsizlik

k: Kapsam faktörü (%95 güven aralığı için k=2)

s: Tüm geri kazanım değerlerinin standart sapması

n: Tüm konsantrasyonlar için toplam tekrar sayısı

S_{Xort} : Ortalamanın standart sapması

.

%geri kazanımlar arasında anlamlı fark olup olmadığı t-testi ile değerlendirildi. (t değeri

formülü $t = \frac{|1-R|}{S_{Xort}}$ şeklindedir. $t < t_{kritik}$ ise bias belirsizliği s_x ya da u_x değeri, $t \geq t_{kritik}$ ise u_i değeri

alınır [85]).

$$\text{Relatif Standart Belirsizlik} = u_i / R \quad (b)$$

- Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$u(x_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{N} + \frac{(x_0 - \bar{x}_{hesaplanan})^2}{S_{xx}}}$$

$u(x_0)$: Kalibrasyon Standart Belirsizliği

X_0 : Kalibrasyon aralığının ortasına denk gelen bir konsantrasyon değeri

$\bar{x}_{hesaplanan}$: Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalaması

S: Residuel standart sapma (Her x değeri için tahmini y değerinin standart hatası)

b: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

p: Her bir konsantrasyon için okuma sayısı

N: Toplam okuma sayısı

S_{xx} : Hesaplanan konsantrasyon değerleri sapmalarının kareleri toplamı

Relatif Standart Belirsizlik = $u(x_0)/x_0$ (c)

Birleşik standart Belirsizlik (u_c) = $\sqrt{a^2 + b^2 + c^2}$

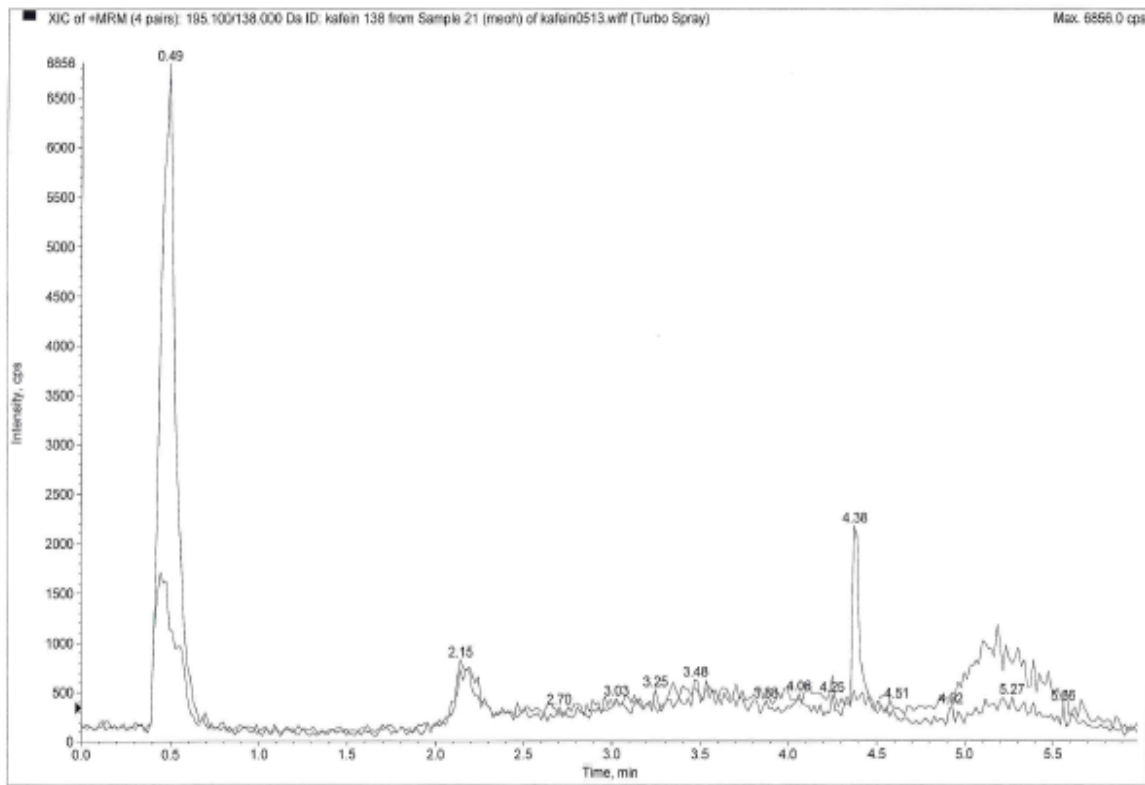
Belirsizliğin Ölçüm sonuçlarına etkisi;

*Analiz Sonucu ± 2 * Birleştirilmiş Bağlı Standart Belirsizlik*Analiz Sonucu* şeklindedir (83).

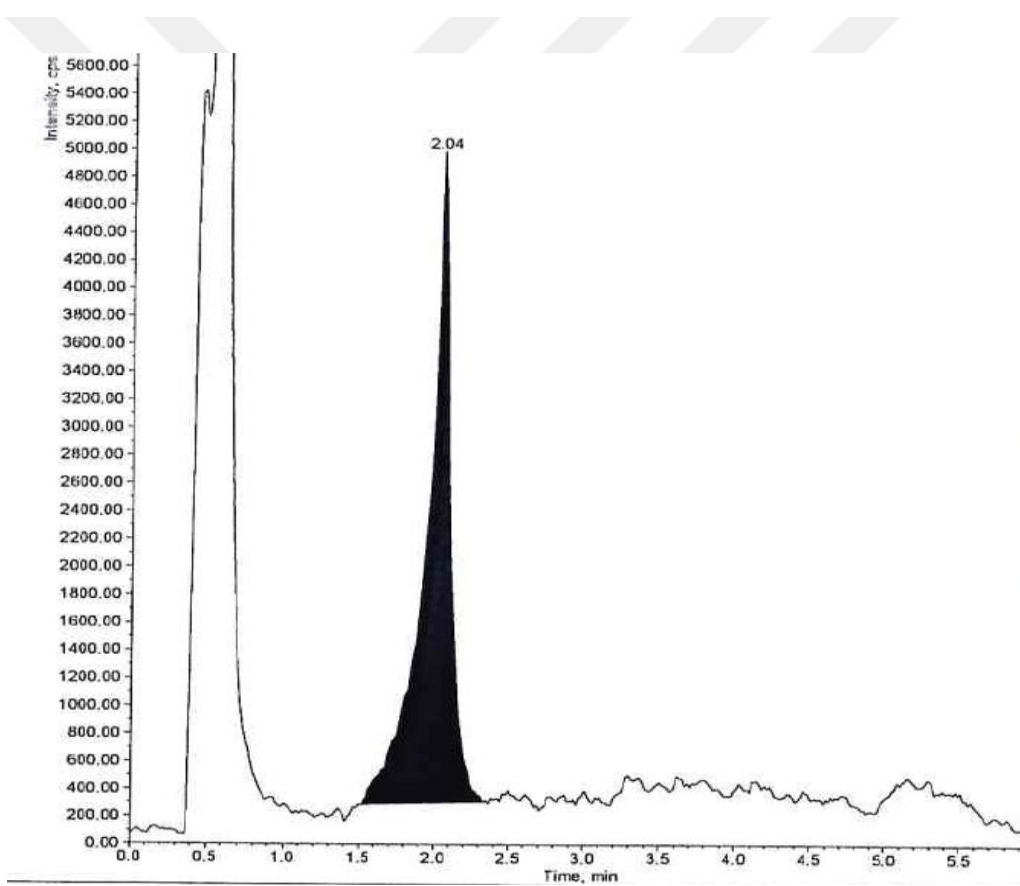
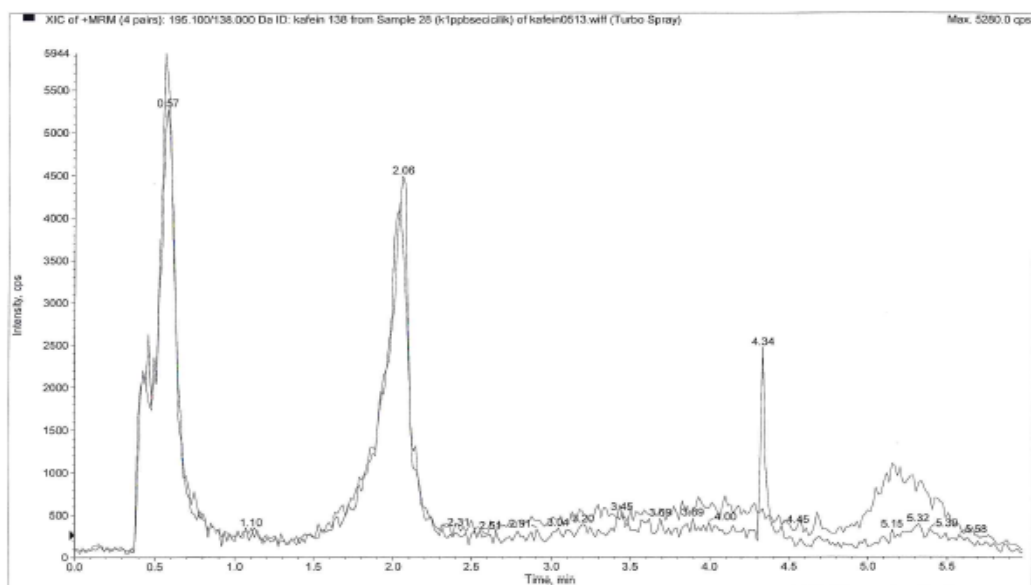
4.BULGULAR

4.1. Seçicilik

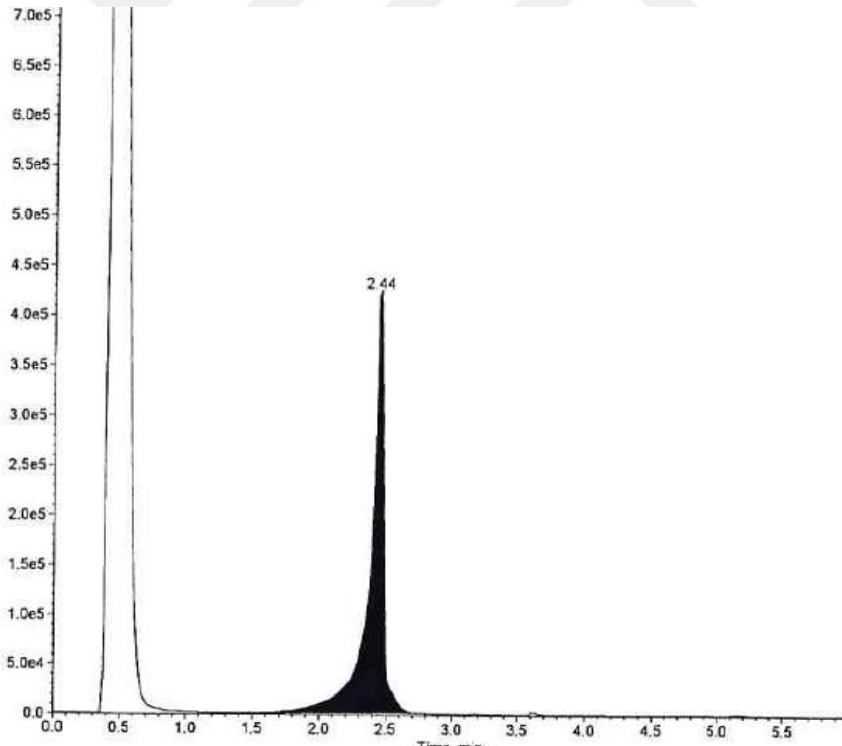
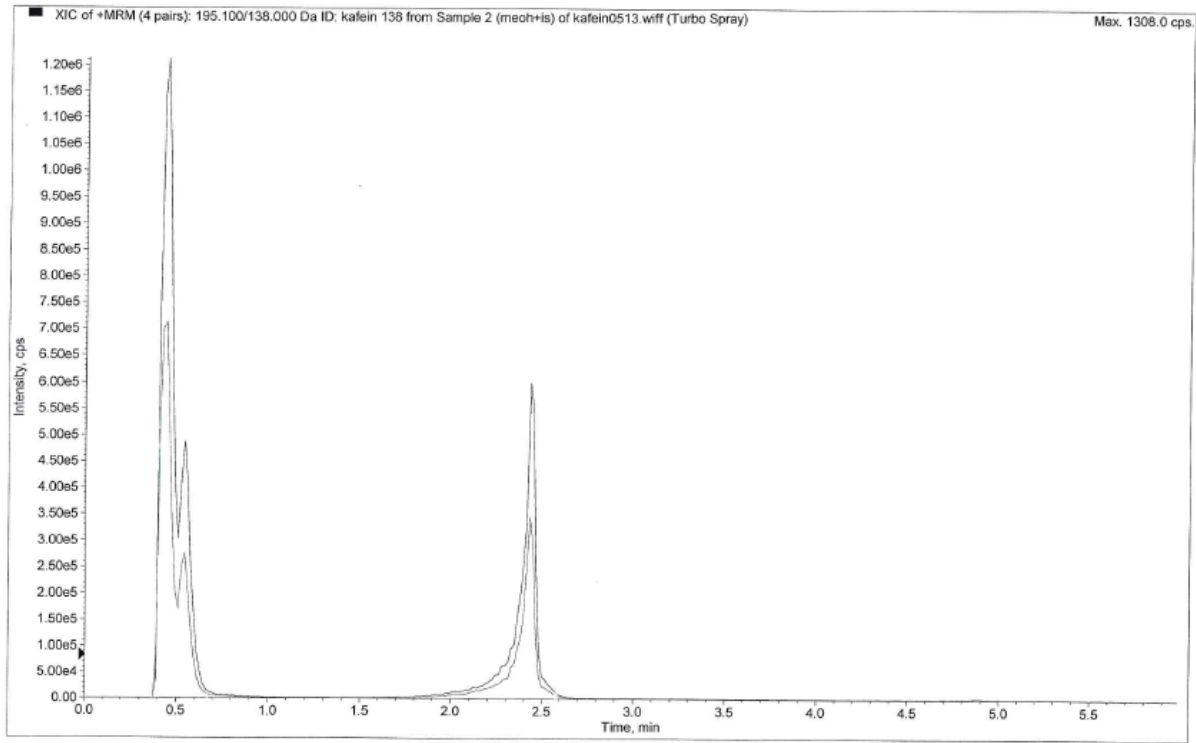
Madde 2.4.1. ve Madde 3.6.1’ de belirtildiği üzere analiz süresi boyunca içinde analit olmayan çözücü (MeOH) kromatogramı ile 1000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standardı pikleri karşılaştırıldı. Kafein alıkonma zamanında çözücünden kaynaklı herhangi bir girişime rastlanılmadığı Şekil 4.1’de gösterildi.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.1. (a) MeOH, (b) CAF piki-Alıkonma zamanı: 2.06 dk. (c) Kokain-d₃ piki-Alıkonma zamanı: 2.43 dk.

4.2.Tespit ve Tayin Limiti

Madde 3.6.2.'de anlatıldığı gibi 300 ng/L konsantrasyonda hazırlanan CAF çözeltisinin LC-MS/MS sisteminde 10 tekrarlı ölçümü yapıldı (n=10). Çalışmanın standart sapması hesaplanarak 3 katı LOD, 10 katı LOQ olarak hesaplandı ve Tablo XV'te gösterildi.

Tablo XV. CAF için LOD ve LOQ değerleri (n=10)

300 ng/L, n=10	SD	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
	54,32	162	543

Hesaplama ile elde edilen sonuçlar yuvarlanarak LOD 200 ng/L, LOQ 500 ng/L olarak kabul edildi.

Madde 3.6.2'de anlatıldığı gibi LOD ve LOQ doğrulaması yapıldı. Ölçüm sonucu ve hesaplamalar Tablo XVI ve Tablo XVII'de gösterildi.

Tablo XVI. Tespit Limiti Doğrulaması

	X ₁	X ₂	X ₃	X _{max}	X _{ort}
Kör çözelti	108	86,5	84,5	108	
300 ng/L CAF	389	413	334		378,7

Zenginleştirilmiş örnek ortalaması 378,7 ng/L, kör örneğin max değeri olan 108 ng/L'den büyük olduğu için tespit limiti (0,2 ng/mL) doğrulandı (80).

Tablo XVII. Tayin Limiti Doğrulaması (n=3, $t_{(n-1, \alpha=0,05)}=4,03$)

300 ng/L CAF	SD	s
	40,5	67,13

Zenginleştirilmiş örnek ile yapılan çalışmaların SD değeri; formüle göre hesaplanan, zenginleştirilen örneklerin kabul edilecek maksimum standart sapması (s) değerinden küçük olduğu için tayin limiti değeri (0,5 ng/mL) doğrulandı (80).

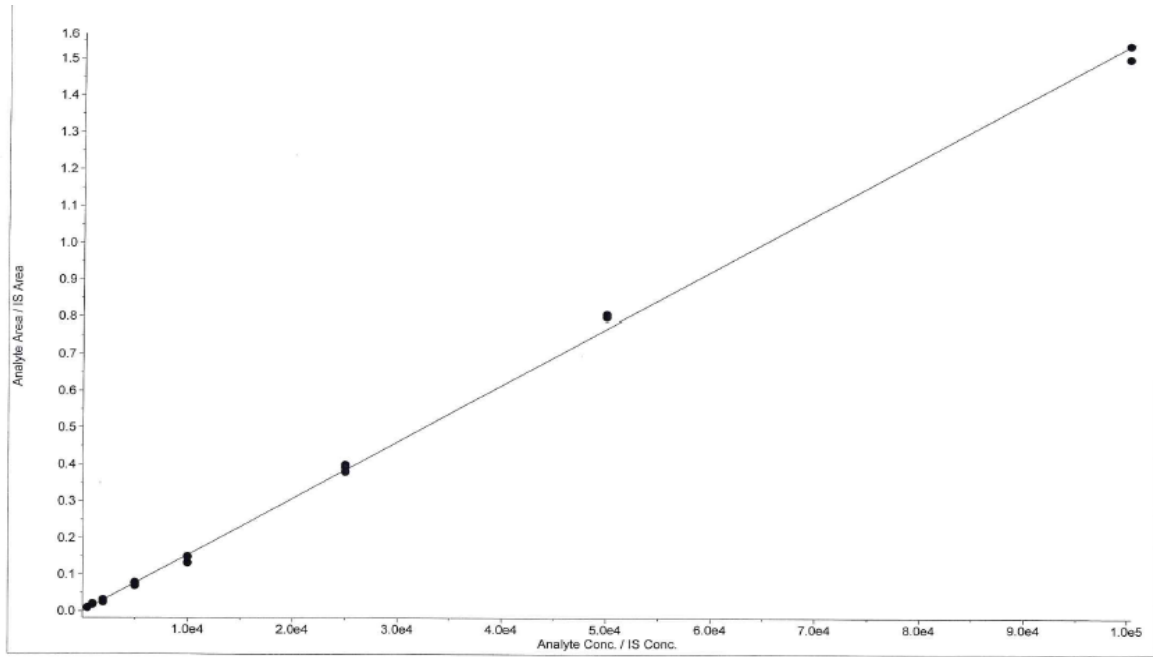
4.3.Doğrusallık

Madde 3.6.3'te belirtilen 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 25000, 50000 ve 100000 ng/L olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda hazırlanan CAF standart çözeltilerinin 3 tekrarlı olacak şekilde ölçümü yapıldı (p=3). Doğrunun eğimi, kesim noktası ve korelasyon katsayısı (r^2) hesaplandı. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı Madde 3.6.3'te ifade edilen formüle göre hesaplanan F değeri ve F_{limit} değeri ile onaylandı. Çalışmaların sonuçları Tablo XVIII'te gösterildi. Kalibrasyon eğrisinin görüntüsü Şekil 4.2'de gösterildi.

Tablo XVIII. 500-100000 ng/L aralığında çizilmiş kalibrasyon eğrisinin denklemi, korelasyon katsayısı, F değeri (N=24, p=3, m=8)

	Doğrusal aralık	Denklem	Korelasyon Katsayısı (r^2)	F değeri	F limit_(1-α) (N-2,2m) serbestlik derecesi
CAF	0,5-100 ng/mL	$y=46,587x+4521,9$	0,997	1,46	2,25

F değeri, F limit değerinden düşük olduğundan kalibrasyon eğrisi doğrusaldır.



Şekil 4.2. Kalibrasyon Eğrisi

4.4. Doğruluk Çalışmaları

Aynı laboratuvarında, aynı cihaz ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında 3 farklı konsantrasyonda (500-5000-100000 ng/L) CAF standart çözeltisi hazırlanarak gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirildi. 10 tekrarlı ölçüm yapıldı (n=10). Ölçüm sonuçları Tablo XIX'da gösterildi.

Tablo XIX. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin gün içi ölçüm sonuçları (n=10)

Gerçek Değer	500 ng/L	5000 ng/L	100000 ng/L
1.Ölçüm	512	4950	92600
2. Ölçüm	533	4660	91000
3. Ölçüm	564	3920	101000
4. Ölçüm	537	4270	96700
5. Ölçüm	573	4530	89300
6. Ölçüm	570	4410	88800
7. Ölçüm	570	3900	87000
8. Ölçüm	574	4710	101000
9. Ölçüm	487	4380	91400
10. Ölçüm	529	4480	94200

Ölçüm sonuçlarının %RSD değerleri, <20 olduğundan sonuçlar tekrarlanabilirlik açısından uygun bulundu. Sapan veriler olup olmadığını anlamak için Grubbs testi yapıldı; veriler de sapma olmadığı görüldü. Çalışma sonuçları Tablo XX’de gösterildi.

Tablo XX. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları
(n=10, Grubbs_{değer} ≤ Grubbs_{kritik} olmalı)

	500 ng/L	5000 ng/L	100000 ng/L
Ortalama	544,9	4421	93300
SD	30,1	330,5	4902,1
%RSD (CV)	5,52	7,47	5,25
Grubbs_{düşük}	1,92	1,58	1,29
Grubbs_{yüksek}	0,97	1,60	1,57
Grubbs_{kritik}	2,29	2,29	2,29
Uygunluk	Uygun	Uygun	Uygun

Aynı analist tarafından 500-5000-100000 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan CAF standart çözeltisi farklı günlerde 10 tekrarlı olarak ölçüldü (n=10). Ölçüm Sonuçları Tablo XXI'de gösterildi.

Tablo XXI. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin günler arası ölçüm sonuçları
(n=10)

Ölçüm	500 ng/L			5000 ng/L			100000 ng/L		
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	1.Gün	2.Gün	3.Gün	1.Gün	2.Gün	3.Gün
1	512	529	501	4950	4540	4630	92600	105000	98700
2	533	535	489	4660	4630	4150	91000	92500	93200
3	564	594	485	3920	4140	4830	101000	94200	101000
4	537	496	523	4270	4530	4530	96700	93800	96600
5	573	583	566	4530	4140	4790	89300	94900	104000
6	570	546	575	4410	4140	5240	88800	98700	93000
7	570	562	542	3900	4430	4680	87000	90700	91700
8	574	544	469	4710	4460	5090	101000	92800	96900
9	487	483	545	4380	4380	4080	91400	102000	95200
10	529	550	486	4480	4220	4240	94200	89300	95200

Ölçümlerin günler arası kıyaslaması yapıldı. Sonuçlar, %RSD_{wr} (günler arası %RSD) üzerinden değerlendirildi. 3 konsantrasyonda da %RSD_{wr} değeri <20 olduğundan günler arasında farklılık gözlemlenmedi. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarının sonuçları Tablo XXII'de gösterildi.

Tablo XXII. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin günler arasındaki tekrarlanabilirlik sonuçları (n=10, $\bar{X}$ =Tüm sonuçların ortalaması)

Derişim	500 ng/L			5000 ng/L			100000 ng/L		
	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
Ortalama	544,9	542,2	518,1	4421	4361	4626	93300	95390	96550
SD	30,1	34,45	37,31	330,47	186,87	386,82	4902,1	5003,6	3815,8
RSD	5,52	6,35	7,20	7,47	4,29	8,36	5,25	5,25	3,95
$\bar{X}$	535			4469,3			95080		
SDwr	35,32			322,35			4662,8		
%RSDwr	6,60			7,21			4,90		

Madde3.6.4.2’de anlatıldığı gibi tüm ölçümlerin geri kazanım değerleri hesaplandı. Geri Kazanım %87,2-109 arasında uygun bulundu. Sonuçlar Tablo XXIII’te gösterildi.

Tablo XXIII. 500-5000-100000 ng/L CAF standart çözeltisinin farklı günlerdeki Geri Kazanımları

Derişim	500 ng/L			5000 ng/L			100000 ng/L		
	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
Ortalama	544,9	542,2	518,1	4421	4361	4626	93300	95390	96550
%Geri Kazanım	109	108,44	103,62	88,42	87,22	92,52	93,30	95,39	96,55

4.5.Sağlamlık

Madde 3.6.5'te anlatıldığı gibi kolon sıcaklığı ve farklı analistin yöntem sağlamlığına etkisini değerlendirmek için çalışmalar yapıldı. Sonuçları karşılaştırmak için t testi uygulandı ve sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. Sonuçlar ve değerlendirmeler Tablo XXIV ve Tablo XXV'te gösterildi.

Tablo XXIV. Kolon sıcaklığı değişimi etkisi (n=3, N-2 serbestlik derecesi ile t değeri<t kritik olmalı)

	Ölçüm Ortalaması	t değeri	t kritik
Kolon Sıcaklığı 50°C	4926,6	0,07	2,77
Kolon sıcaklığı 40°C	4936,6		

Tablo XXV. Farklı analist çalışmasının yönetime etkisi (n=5, N-2 serbestlik derecesi ile t değeri<t kritik olmalı)

	Ölçüm Ortalaması	SD	RSD	t değeri	t kritik
Analist 1	4960	154,7	3,12	0,80	2,22
Analist 2	4876,6	239,5	4,91		

Standart çözelti stabilitesinin kontrolü için 10000 ng/L CAF standart çözeltisi; oda sıcaklığı (22±5 °C), -4°C ve -20°C'de bir hafta boyunca takip edildi. 4 farklı günde 3 tekrarlı yapılan ölçüm sonuçlarına ANOVA testi uygulandı ve $F_{\text{değeri}} < F_{\text{kritik}}$ olduğundan sonuçlar arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamadı. Değerlendirme Tablo XXVI'da gösterildi. 3 farklı sıcaklık, 4 farklı günde ölçüm yapıldığı için grup sayısı k=12, Toplam ölçüm N=36 olarak alındı.

Tablo XXVI. Oda sıcaklığı, -4°C ve -20°C’de CAF çözeltisi kararlılığı (n=3, k=12, N=36, ANOVA $F_{\text{değeri}} < F_{\text{ölçütü}}$ olmalı)

	Sıcaklık	Serbestlik Derecesi	p	F _{değeri}	F _{ölçütü}
Gruplar arası	Oda sıcaklığı -4 °C -20 °C	12-1=11 (k-1)	0,06	2,12	2,21
Grup içi	Oda sıcaklığı -4 °C -20 °C	36-12=24 (N-k)			

4.6.Ölçüm Belirsizliği

- Kesinlik bileşenlerinden gün içi tekrarlanabilirlikten gelen standart belirsizlik için Madde 3.7’de belirtilen formüle göre RSD_{pool} değeri 0,062 olarak hesaplandı.
- Kesinlik bileşenlerinden günler arası tekrarlanabilirlikten gelen standart belirsizlik için Madde 3.7’de belirtilen formüle göre $RSD_{\text{wr pool}}$ değeri 0,063 olarak hesaplandı.
- Madde 3.7’de belirtilen Bias Belirsizliği (u_i) formülü kullanılarak 3 farklı konsantrasyonda, farklı günlerde yapılan gerçeklik çalışmalarından elde edilen standart belirsizlik hesaplandı. %geri kazanımlar arasında anlamlı fark olup olmadığı t-testi ile değerlendirildi. $t < t_{\text{kritik}}$ ise bias belirsizliği olarak s_x (u_x) değeri alındı (82). Sonuçlar Tablo XXVII’de gösterildi.

Tablo XXVII. Bias Belirsizliği

Bias Belirsizliği	
%Ortalama	0,971
s	9,55
N	90
$S_x (u_x)$	1,007
$t_{\text{değeri}}$	0,028
$t_{\text{kritik}} (\%95 \text{ güven aralığı; } N-1)$	1,98

- Kalibrasyon eğrisi belirsizliği için; doğrusallık çalışmalarıyla elde edilen doğru denklemine göre hesaplanan x (analit konsantrasyonu) ve y (alan) değerleri kullanılarak Madde 3.7’de belirtilen $U(x_0)$ belirsizlik formülü kullanıldı. Kalibrasyon aralığının ortalarına denk gelen değer (x_0) 25000 ng/L seçildi. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo XXVIII’de gösterildi.

Tablo XXVIII. Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği

x değerlerinin ortalaması	24187,5
x_0	25000,00
S	114480,85
S_{xx}	25857755216,6
Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği / $u(x_0)$	1504,867
Kalibrasyon Eğrisi Relatif Belirsizlik	0,060

Validasyon bileşenlerinden elde edilen belirsizlik değerleri Tablo XXIX'da gösterildi.

Tablo XXIX. Belirsizlik Kaynakları ve Genişletilmiş Bağlı Standart Belirsizlik

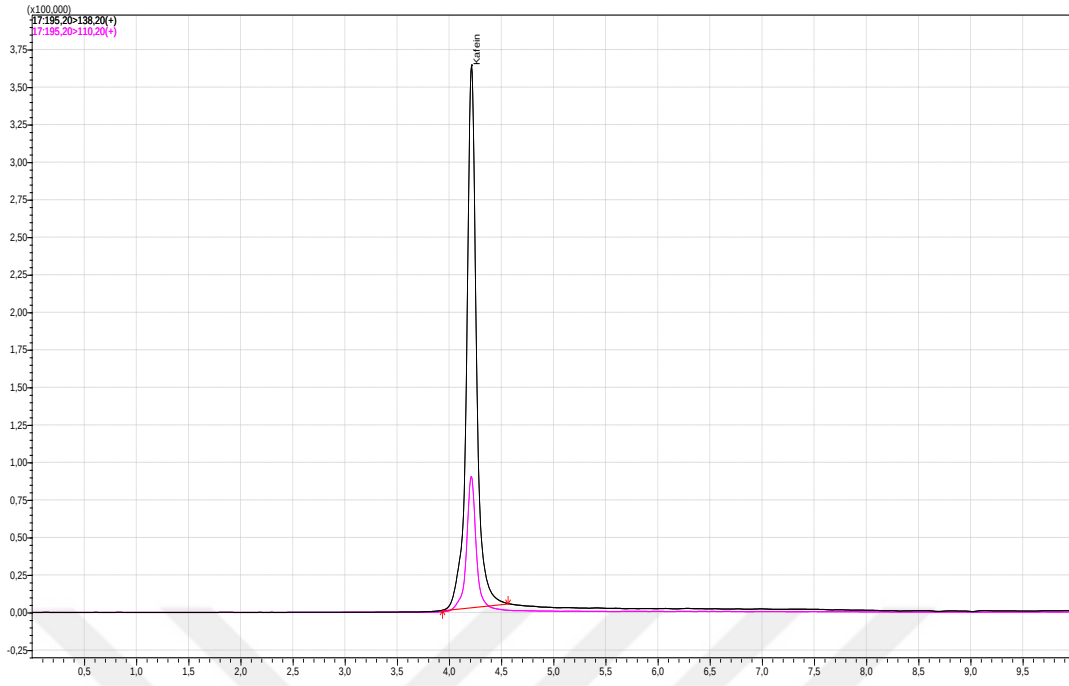
Belirsizlik Kaynakları	X değeri	Standart belirsizlik (u)	Bağlı Standart Belirsizlik
Günler arası	1	0,063	0,063
Gün içi	1	0,062	0,062
Gerçeklik=Bias	97,16	1,007	0,0103
Kalibrasyon eğrisi	25000	1504	0,060
Birleştirilmiş Bağlı Standart Belirsizlik (u_c)			0,107
Genişletilmiş Bağlı Standart Belirsizlik (U)			0,21

Çalışma sonunda yöntemin belirsizliğini etkileyecek tüm bileşenler değerlendirildiğinde Genişletilmiş Bağlı Standart Belirsizlik 0,21 olarak bulundu. Genişletilmiş bağlı standart belirsizlik %95 güven aralığında Birleştirilmiş bağlı standart belirsizliğin k faktörü ile (k=2) çarpılmasıyla elde edilir.

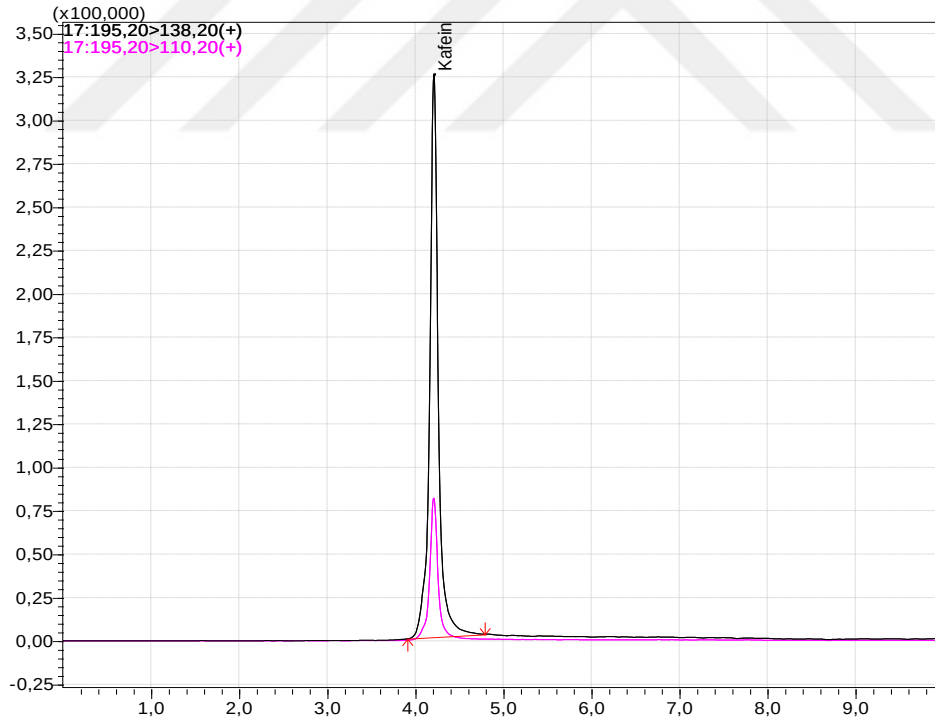
Hesaplamalar Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi ve Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberi kullanılarak yapılmıştır (82,83).

4.7.Çekitleme Verimliliği

Madde 3.4'te anlatıldığı gibi 50000 ng/L konsantrasyon ile zenginleştirilen 3 adet 50 mL çeşme suyu numunesi, çekitleme işlemi sonrası LC-MS/MS sisteminde 3 tekrarlı olarak ölçüldü. Çekitleme geri kazanımı %91,4; %92,2 ; %96,4 olarak bulundu ve ortalama geri kazanımı %93,3 olarak hesaplanarak CAF standart çözeltileri alanları Şekil 4.3'te gösterildi.



(a)



(b)

Şekil 4.3. (a) 50000 ng/L CAF standart çözeltisi alanı (b) 50000 ng/L CAF ile zenginleştirilen çeşme suyu numunesi çekitleme işlemi sonrası CAF alanı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Atık sular toplumun tükettiği ve maruz kaldığı her şeyi, yaşam tarzını, alışkanlıkları, sağlıkla ilgili bilgileri yansıtan önemli bir veri topluluğudur. 2001 yılında Daughton tarafından önerilen Atık Suya Dayalı Epidemiyolojik Yaklaşım, 2005 yılında Zuccato ve ark. tarafından kokainin; 2008 yılında da amfetamin, metamfetamin, ekstazi, kannabinoidlerin atık suda tespit edilip uyuşturucu kullanımına dair eş zamanlı, güncel ve doğru bilgilere ulaşılmasıyla başlanmış; atık sulardan bilgi edinme çeşitliliğine kadar ilerlemiştir. Günümüzde gelinen noktada atık sulardan biyo-belirteç elde etme çalışmaları ve toplumla ilgili daha fazla bilgi edinme üzerine yoğunlaşan çalışmalarla devam etmektedir.

Kafein etken maddesi, atık sudaki kararlılığı nedeniyle bu tür çalışmalarda dikkate alınarak metabolitleri ile birlikte araştırılmaya başlanmış ve günümüzde de araştırması halen devam etmektedir. Kafeinin sularda analizi, antropojenik bir belirteç olmasından kaynaklı kirlilik göstergesi olması ve belirlenen bölgede popülasyon dinamiği hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir.

Kafein, beşeri kaynaklı olduğundan kendisi ve metabolitlerinin yüzey sularında varlığı, yüzey sularının kirlendiğini gösteren bir belirteçtir. Atık suların iyi arıtılamaması nedeniyle yüzey sularına ya da yüzeyden yer altı sularına karışarak içme sularına kadar etki edebilecek potansiyeldedir. Suların kirletilmeye devam edilmesiyle şu an için insani tüketim amaçlı sularda bakılan pestisit, poliaromatik hidrokarbonlar, trihalometanlar gibi parametrelerin yanında ileride kafein gibi beşeri kaynaklı kirleticilerin eklenmesi muhtemeldir. Bu kirleticilerin oluşturabileceği tehdit göz önünde bulundurularak Türkiye'nin de içinde olduğu birçok ülkede yüzey sularında kafein tespit edilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (7,8,9,62).

Beşeri biyobelirteçler ve popülasyon büyüklüğü ve dinamiği arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda kafein ve diğer nüfus bilgisi veren parametreler kıyaslanmış; kafeinin popülasyon miktarına ulaşmada doğru sonuçlar verebileceği kanıtlanmıştır. Araştırmalar geliştirilerek kafein metabolitleri de dahil edilmiş; özellikle 1,7-dimetilürik asit metaboliti hem kararlılığı hem de farmakokinetik çalışmaları baz alınarak düzeltme faktörü geliştirilerek geri hesaplama ile doğru sonuca yaklaşılmıştır. Bu bakımından, özellikle nüfus hesaplamalarında kafeinin farmakokinetik çalışmaları da ayrı önem taşımaktadır.

Kafein için sıvı kromatografide daha önce yapılan çalışmaların daha çok yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarını ya da idrardaki metabolitlerini tespit etmeye yönelik olduğu görülmektedir. Bu çalışmaya atık suya dayalı epidemiyolojik yaklaşımın önemi göz önünde bulundurularak Senta ve ark., Rico ve ark., Gracia-Lor ve ark. çalışmaları esas alınarak başlanmıştır (1,5,19).

Çalışmada kafein için LC-MS/MS sistemi kullanılarak hızlı, kolay, özgün, düşük tayin limitli, tekrar edilebilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geliştirilmiş ve yöntemin geçerli kılınma parametreleri çalışılmıştır.

Analitik yöntem geliştirilmesi için literatür taraması yapılmış; LC-MS/MS'te kafein tespit ve tayini için uygun sıvı kromatografi analitik kolonu, mobil faz, mobil faz akış programı, uygun kolon sıcaklığı, parçalanma molekülleri ve enerjilerine dair elde edilen bilgiler laboratuvarda uygulanarak bir LC-MS/MS yöntemi optimize edilmiştir. Akış zamanı ve mobil faz oranları değiştirilerek analiz süresini kısa tutmaya, keskin ve net ayımla kafein piki elde edilmeye çalışılmıştır. Kafein için alıkonma zamanı tespit edilmiş ve yöntem akış programı ayarlandıktan sonra yöntemin geçerli kılınma parametrelerinin çalışılmasına geçilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda örnek enjeksiyonundan kaynaklı hataları bertaraf etmek, MS koşullarındaki

değişiklikleri standardize etmek ve kesin tekrarlanabilirlik sonuçları almak için iç standart olarak 10000 ng/L konsantrasyonunda Kokain-d₃ maddesi kullanılmıştır.

Seçicilik parametresi için, içerisinde CAF olmayan çözücü (metanol) ve 1 ppb konsantrasyonunda CAF standart çözeltisi analiz edilmiş; çözücünden kaynaklı herhangi bir girişim olmadığı gözlemlenmiştir. Belirli konsantrasyonlarda CAF standart çözeltisinin LC-MS/MS'te analizi yapılarak kafeinin pik alanlarının da bu oranda doğrusal olarak arttığı görülmüştür. Oluşturulan bu yöntemin, kafein tespit ve tayininde özgül ve hassas olduğuna karar verilmiştir.

Düşük analit konsantrasyonu üzerinden LOD ve LOQ tespit edilmesi yönteminden yola çıkarak 300 ng/L konsantrasyonda hazırlanan CAF standart çözeltisinin standart sapması 54,3 bulunmuştur. $LOD=3*SD$ ve $LOQ=10*SD$ formülü üzerinden yürütülen hesaplamalarla sonuçlar yuvarlanarak LOD 200 ng/L, LOQ 500 ng/L bulunmuştur. LOD ve LOQ doğrulaması TURKLAB Rehber 01'de belirtilen hesaplamalarla doğrulanmış; çizilen kalibrasyon eğrisindeki konsantrasyonların pik alanları üzerinden de kontrol edilmiştir (80).

Doğrusallık parametresi için elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (r^2) 0,997 bulunmuştur. Ayrıca kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı, yapılan F testinin uygun sonuç vermesiyle de kanıtlanmıştır. Çalışmada doğrusal aralık 500-100000 ng/L 'dir.

Doğruluk çalışmaları; gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik ve geri kazanım ile yapılmıştır. Farklı bir laboratuvar kullanılmadığından tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılamamıştır. Gün için tekrarlanabilirlik çalışmaları 500-5000-100000 ng/L olmak üzere düşük, orta ve yüksek 3 farklı konsantrasyonda 10 tekrarlı ölçümle gerçekleştirilmiştir. Bu konsantrasyonlarda %RSD değerleri sırasıyla 5,52 , 7,47 , 5,25 bulunmuş olup tüm değerler <20 olduğundan sonuçlar uygun kabul edilmiştir. Grubbs testi ile de yüksek ve düşük alanda sapan ölçüm sonuçları kontrol edilmiş herhangi bir sapan veri bulunamamıştır. Günler arası

tekrarlanabilirlik çalışmaları için 3 farklı konsantrasyon (500-5000-100000 ng/L) farklı günlerde çalışılmıştır. Sonuçlar %RSDwr üzerinden hesaplanmış; tüm sonuçlar %10'dan küçük bulunmuştur. Bu çalışmalar üzerinden yürütülen geri kazanım hesaplamalarında, geri kazanım değerleri tüm günler için %87-109 arasında bulunmuştur.

Yöntemin sağlamlığının kontrolü kolon sıcaklığı ve farklı analist çalışmasıyla yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 50°C'den 40°C'ye düşürülmüştür. 5000 ng/L üzerinden yapılan 3 tekrarlı ölçümlerle sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu *student t-testi* ile kanıtlanmıştır. Analist farklılığı çalışmasında ise, geliştirilen bu yöntem ile 5000 ng/L konsantrasyon için 6 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Grubbs testi ile sapan verilerin olmadığı görülerek, *student t-testi* uygulanmış, her iki analistin çalışmalarından elde edilen bulgular arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Atık suda kafein tayin ve tespiti için geliştirilen bu yöntemde, cihaz kirliliğini önlemek ve daha doğru sonuç almak için numunelerin ön işleminden geçmesi gerekmektedir. Uygun kartuş seçimi ile yapılan çekitleme işleminde, atık su numunesi alternatifi olarak çeşme suyu numunesi kullanılmıştır. Kafein standart çözeltisi ile zenginleştirilen 50000 ng/L konsantrasyonundaki çeşme suyu numunelerinin çekitleme sonrası geri kazanımı %93,34 olarak bulunmuştur. He ve ark. arıtma tesisi giriş ve çıkışlarından aldıkları numuneler ile farklı özellikte çekitleme kartuşları kullanarak LC-MS/MS'te kafein ve metabolitlerinin tespiti için bir çalışma yürütmüş, çekitleme geri kazanımını %60,3-83,2 olarak hesaplamışlardır (84).

Kafein için LC-MS/MS'te yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda atık suda ve yüzey sularındaki kafein ve metabolitlerinin analiz edilmesinin yanı sıra gıdalardaki kafein ya da insan plazması ve ya idrardaki metabolitlerinin analiz sonuçlarına da rastlanmaktadır.

Gören İ. ve Dağlıoğlu N. piyasadaki enerji içeceklerinde kafein miktarı için LC-MS/MS'te geliştirdikleri yöntemde r^2 0,99 lineer doğrulukta LOD 1600 ng/L, LOQ 2500 ng/L olarak hesaplanmıştır. Doğruluk % 89-116 arasındadır (85).

Chen ve ark. insan plazmasında kafein ve metabolitlerinin LC-/MSMS'te ölçülmesi çalışmasında, $r^2 > 0,99$ lineer doğrulukta ve 4100-3000000 ng/L çalışma aralığında kafein için LOD 4100 ng/L, gün içi %97,7 doğruluk ile %RSD 5,69 , günler arası %98,2 doğruluk ile %RSD 5,94 olarak hesaplanmıştır (86).

Senta ve ark. atık sularında kafein, nikotin ve metabolitlerinin LC-MS/MS'te tespit edilmesi çalışmasında r^2 0,998 lineer doğrulukta, 0-600 000 ng/L çalışma aralığında kafein için metot tayin limiti 3,6 ng/L, geri kazanım %88, %RSD 12 olarak bulunmuştur (5).

Rico ve ark. kafein ve başka belirteçlerin popülasyon değerlendirmesinde kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirildiği çalışmasında LC-MS/MS yöntemi ile r^2 0,999 lineer doğrulukta ve 2000-2000 000 ng/L çalışma aralığında, kafein için %38 geri kazanım ile LOD 22 ng/L, LOQ 73 ng/L, gün içi %RSD 4,1 , günler arası %RSD 5,9 olarak hesaplanmıştır (1).

Ayman Z. ve Işık M.'nin yüzey sularında farmasötik olarak aktif maddelerin tespit edilmesi çalışmalarına baktığımızda LC-MS/MS'te kafein r^2 0,997 lineer doğrulukta ve 1000-500000 ng/L çalışma aralığında LOD 183 ng/L, LOQ 610 ng/L olarak bulunmuştur (9).

Adana'da yüzey sularında farmasötik olarak aktif maddelerin tespiti çalışmasında LC-MS/MS'te kafein $r^2 > 0,997$ lineer doğrulukta ve 0,01-100 ng/L çalışma aralığında LOD 0,2 ng/L, LOQ 0,6 ng/L olarak bulunmuş; çalışma düşük konsantrasyonda tutulmuştur (8).

Haidong Z. ve ark. yaptığı atık su arıtma tesisinde bazı farmasötik ve kafein tespiti çalışmasında $r^2 > 0,99$ lineer doğrulukta, 2000-1000000 ng/L çalışma aralığında kafein için %105,6 ve %88,5 geri kazanım ile LOQ 29 ng/L, %RSD 3,2 olarak hesaplanmıştır (87).

Laboratuvardaki çalışmalarımız sonucunda elde edilen geçerli kılma parametreleri, literatürdeki bu çalışmalarla uyumludur.

Bu çalışmaya, WBE temelli çalışmalarda biyobelirteçlerin önemi dikkate alınarak başlanmıştır. Bir beşeri biyobelirteç olan kafeinin atık sularda tespit edilebilmesi için geliştirilip geçerli kılma çalışmalarının kapsamlı bir şekilde ele alındığı ilk çalışmadır. Düşük tayin limitli, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip, doğrusal aralığı geniş, geri kazanımı ve çekitleme verimliliği yüksek, analiz süresi kısadır.

Geliştirilen bu yönteme, ileride kafein metabolitlerinin de dahil olması atık suda kafein üzerinden yürütülen çalışmaları daha verimli hale getirecektir. Kafein metabolitlerinin kararlılıkları ve geri hesaplamada daha doğru sonuçlara ulaştıracak metabolitlerin dikkate alınması, doğru popülasyon değerlendirmesine imkan verecektir. Böylece belirlenen bölgede gerçek nüfus hareketi izlenerek yasa dışı madde kullanım değerlendirmelerinin doğru yapılmasını sağlayacaktır. Ayrıca geliştirilen bu yöntem ile kafeinin yüzey sularında tespit ve tayin edilmesi suların kirlilik düzeyi hakkında bilgi verecek; tehlike boyutunu ortaya koyacak ve konuyla ilgili sağlık kuruluşlarına önlem alma imkanı verecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Rico, M., Andrés-Costa, M. J., & Picó, Y. Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. *Journal of hazardous materials* 2017; 323:156-165.
2. Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Bade, R., Been, F., Castrignanò, E., Covaci, A. ve ark. Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. *Environment international* 2017; 99:131-150.
3. Daughton, C. G. (2001). Illicit drugs in municipal sewage. *Pharmaceutical and Personal Care Products in the Environment*. ACS Symposium Series 2001; 791(20): 348-364
4. Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., & Fanelli, R. (2005). Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health* 2005, 4(1), 14.
5. Senta, I., Gracia-Lor, E., Borsotti, A., Zuccato, E., & Castiglioni, S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water research* 2015; 74:23-33.
6. Walter, Y. , Bowdler, P. and Honeychurch, K. C. Determination of caffeine and paracetamol in Bristol harbour water by LC/MS/MS. In: RSC Twitter Conference; 2017 20 - 21 Mart; Twitter,2017. Available from: <http://eprints.uwe.ac.uk/31342>
7. Rodríguez-Gil, J. L., Cáceres, N., Dafouz, R., & Valcárcel, Y. Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment. *Science of the Total Environment* 2018; 612:1058-1071.
8. Guzel, E. Y., Cevik, F., & Daglioglu, N. Determination of pharmaceutical active compounds in Ceyhan River, Turkey: Seasonal, spatial variations and environmental risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2018; 1-16.

9. Ayman, Z., & Işık, M. Pharmaceutically active compounds in water, Aksaray, Turkey. CLEAN–Soil, Air, Water 2015; 43(10):1381-1388.
10. Dafouz, R., Cáceres, N., Rodríguez-Gil, J. L., Mastroianni, N., de Alda, M. L., Barceló, D. ve ark. Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk? A regional and global study. Science of the Total Environment 2018; 615:632-642.
11. Mercan, S., Kuloglu, M., Tekin, T., Turkmen, Z., Dogru, A. O., Safran, A. N., ve ark. Wastewater-based monitoring of illicit drug consumption in Istanbul: Preliminary results from two districts. Science of The Total Environment 2019; 656:231-238.
12. Daglioglu, N., Guzel, E. Y., & Kilercioglu, S. Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey. Forensic science international 2019; 294:132-139.
13. Heckman, M. A., Weil, J., & De Mejia, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. Journal of food science 2010; 75(3): R77-R87.
14. Keleş, F. (2011). Kafein. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2011; 16:(1-4).
15. Vatan, Ö., Hasdemir, İ. M., İnci, İ., Bilgin, M., & Aydın, A. Kafeinin su ve etil asetat/kloroform karışımı arasındaki dağılma katsayılarının ortam asitliğine bağlı olarak değişimi. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen Ve Mühendislik Dergisi 2000; 2(3):1-6.
16. Alyakut, Ö., Küçükkömürler, S. Türk Mutfak Kültüründe Kafein (2018) [Word Belgesi]. Alıntı: https://www.researchgate.net/publication/324783982_Turk_Mutfak_Kulturunde_Kafein
17. Hasdemir, İ. M., İnci İ., Bilgin, M., Önder, M., & Aydın, A. Kafeinin su ve bazı organik çözücüler arasındaki dağılma katsayılarının sıcaklığa bağlı olarak değişiminin incelenmesi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi 2011; 6(3):255-258.
18. Yılmaz E., Kafein alımının metabolik hız ve enerji harcanışına etkileri, Gıda mühendisliği Dergisi 2001 Aralık; 30-34

19. Gracia-Lor, E., Rousis, N. I., Zuccato, E., Bade, R., Baz-Lomba, J. A., Castrignanò, E. ve ark. Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater. *Science of the Total Environment* 2017; 609:1582-1588.
20. <https://coffee.digital/kultur-detay/kahve-bitkisi-turlerinin-60i-tukenme-riski-altinda> (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
21. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Camellia_sinensis_flower_tea.JPG (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
22. <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Cola+acuminata> (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
23. <https://kahvecekirdekleri.com/kakao-cekirdegi-blog> (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
24. <https://bebrainfit.com/yerba-mate-benefits/> (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
25. <https://www.wisegeek.com/what-is-the-difference-between-guarana-and-caffeine.htm#guarana-berries-on-branch> (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
26. Barone, J. J.& Roberts, H. R. Caffeine consumption. *Food and chemical toxicology* 1996; 34(1): 119-129.
27. Hancı, M., Bakırcı, S., Bayram, S., Karahan, S., & Kaya, E. Türk Kahvesi ve Türkiye'de Satılan Bazı İçeceklerdeki Kafein Miktarları. *Duzce Medical Journal* 2013; 15(3):34-38
28. Frary, C. D., Johnson, R. K., & Wang, M. Q. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association* 2005; 105(1):110-113.
29. Mahoney, C. R., Giles, G. E., Marriott, B. P., Judelson, D. A., Glickman, E. L., Geiselman, P. J. ve ark. Intake of caffeine from all sources and reasons for use by college students. *Clinical Nutrition* 2019; 38(2): 668-675.

30. Küçükkömürler, S., & Kurt N. Adölesanlarda Kafein Tüketimi (Caffeine Consumption in Adolescents). *Journal of Tourism and Gastronomy Studies* 2018; 6/Special issue3:111-124.
31. Küçer N. The relationship between daily caffeine consumption and withdrawal symptoms: a questionnaire-based study. *Turk J Med Sci* 2010; 40 (1): 105-108
32. Akça, F., Aras, D., & Arslan, E. Kafein, etki mekanizmaları ve fiziksel performansa etkileri. *Spormetre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi* 2018;16(1):1-12.
33. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=182.1180&SearchTerm=caffeine> (Erişim Tarihi: 05.06.2019)
34. Türk Gıda Kodeksi Enerji İçecekleri Tebliği (2017, 30 Haziran). Resmi Gazete (Sayı:30110).
35. Gören, İ.E., Dağlıoğlu, N. Enerji İçeceklerinde Yüksek Risk: Kafein. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences* 2019 Ocak; doi: 10.5336/forensic.2018-63828
36. Afifi, S., Rahahleh, W. A., & Hadidi, K. A. Caffeine content in Turkish coffee: A question of concern in sport community. *Dirasat: Educational Sciences* 2008; 35:730-738.
37. Dökmeci, A. H. Bazı farmasötik ilaç kalıntılarının sulardaki toksik etkileri [Doktora tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009
38. Trevitt, J., Kawa, K., Jalali, A., & Larsen, C. Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2009; 94(1): 24-29.
39. Abel, E. L., Hendrix, S. O., McNeeley, S. G., Johnson, K. C., Rosenberg, C. A., Mossavar-Rahmani, Y. ve ark. Daily coffee consumption and prevalence of nonmelanoma skin cancer in Caucasian women. *European Journal of Cancer Prevention* 2007; 16(5): 446-452.
40. CARE Study Group. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *The BMJ* 2008, 337:a2332–40.

41. Lopez-Garcia, E., van Dam, R. M., Rajpathak, S., Willett, W. C., Manson, J. E., & Hu, F. B. Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. *The American journal of clinical nutrition* 2006; 83(3):674-680.
42. Van Dam, R. M., & Hu, F. B. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Jama* 2005; 294(1): 97-104.
43. Mukamal, K. J., Maclure, M., Muller, J. E., Sherwood, J. B., & Mittleman, M. A. Caffeinated coffee consumption and mortality after acute myocardial infarction. *American heart journal* 2004; 147(6):999-1004.
44. Kawachi, I., Colditz, G. A., & Stone, C. B. Does coffee drinking increase the risk of coronary heart disease? Results from a meta-analysis. *Heart* 1994; 72(3):269-275.
45. Atık Suların Kanalizasyon Şebekesine Deşarj Yönetmeliği (1984, 13 Mart). Resmi Gazete (Sayı:18340).
46. Kasprzyk-Hordern, B., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E. ve ark. Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. *Water and Sewerage Journal* 2014; 4:25-26.
47. Ort, C., Banta-Green, C. J., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Emke, E., Gartner, C. ve ark. Sewage-based epidemiology requires a truly transdisciplinary approach. *GAIA-Ecological Perspectives for Science and Society* 2014; 23(3):266-268.
48. Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R., Estimating community drug abuse by wastewater analysis, *Environ Health Perspect.* 2008 Ağustos; 116(8).
49. Causanilles, A., Ruepert, C., Ibáñez, M., Emke, E., Hernández, F., & de Voogt, P. Occurrence and fate of illicit drugs and pharmaceuticals in wastewater from two wastewater treatment plants in Costa Rica. *Science of the Total Environment* 2017; 599:98-107.

50. Bijlsma, L., Botero-Coy, A. M., Rincón, R. J., Peñuela, G. A., & Hernández, F. (2016). Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Science of The Total Environment* 2016; 565:984-993.
51. Kankaanpää, A., Ariniemi, K., Heinonen, M., Kuoppasalmi, K., & Gunnar, T. Use of illicit stimulant drugs in Finland: a wastewater study in ten major cities. *Science of the Total Environment* 2014; 487:696-702.
52. Metcalfe, C., Tindale, K., Li, H., Rodayan, A., & Yargeau, V. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environmental pollution* 2010; 158(10):3179-3185.
53. Thomas, K. V., & Reid, M. J. (2011). What else can the analysis of sewage for urinary biomarkers reveal about communities?. *Environmental Science Technology* 2011 Agosto; 45(18):7611-7612.
54. Katsoyiannis A., Jones K. C. An antidoping sampling strategy utilizing the sewerage systems of sports villages. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45:362–363.
55. Daughton, C. G. Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. *Science of the Total Environment* 2012; 414:6-21.
56. Chiaia, A. C., Banta-Green, C., & Field, J. Eliminating solid phase extraction with large-volume injection LC/MS/MS: analysis of illicit and legal drugs and human urine indicators in US wastewaters. *Environmental Science & Technology* 2008; 42(23):8841-8848.
57. Gao, J., O'Brien, J., Du, P., Li, X., Ort, C., Mueller, J. F., & Thai, P. K. Measuring selected PPCPs in wastewater to estimate the population in different cities in China. *Science of the Total Environment* 2016; 568:164-170.
58. Rousis, N. I., Gracia-Lor, E., Zuccato, E., Bade, R., Baz-Lomba, J. A., Castrignanò, E. ve ark. Wastewater-based epidemiology to assess pan-European pesticide exposure. *Water research* 2017, 121:270-279.

59. Yüzeysel Sular Ve Yeraltı Sularının İzlenmesine Dair Yönetmelik (2014, 11 Şubat). Resmi Gazete (Sayı:28910)
60. Günay, G. Türkiye'nin yüzey suları ve yeraltı suları potansiyeli. Bilim Aklın Aydınlığında Eğitim 2011 Şubat; 132:56-60.
61. Daughton, C. G., & Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. Environmental health perspectives 1999, 107(suppl 6), 907-938.
62. Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., & Mazumder, A. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. Ecological Indicators 2012; 23:501-508.
63. Gheorghe, S., Petre, J., Lucaciu, I., Stoica, C., & Nita-Lazar, M. Risk screening of pharmaceutical compounds in Romanian aquatic environment. Environmental monitoring and assessment 2016; 188(6):379.
64. Valcárcel, Y., Alonso, S. G., Rodríguez-Gil, J. L., Gil, A., & Catalá, M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. Chemosphere 2011; 84(10):1336-1348.
65. Kukul, Y. S., Çalışkan, A. D. Ü., & Anaç S. Arıtılmış atık suların tarımda kullanılması ve insan sağlığı yönünden riskler. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2007; 44(3):101-116.
66. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği (2004, 31 Aralık). Resmi Gazete (Sayı:25687).
67. Eser B., Sepici Dinçel A. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi, 2(2), 51-57.
68. Okuroğlu E. Sporcu besin destek ürünlerinin toksikolojik açıdan incelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü, 2018

69. Türkan T., Laboratuvar Cihazları [Powerpoint Sunumu]. Alıntı :
<https://docplayer.biz.tr/18056163-Laboratuvar-cihazlari-taner-turkan-sem-a-s.html>
70. http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_783.html (Erişim Tarihi:17.05.2019)
71. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51394/mod_resource/content/0/MASS%20spektr%20oskopsi%20-%20Pratik.pdf (Erişim Tarihi:17.05.2019)
72. Göl E. GC/FID cihazında kokain metot validasyonu [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2013
73. <https://eskisite.agri.edu.tr/UserFiles/CKUpload/Upload/LC-MS%20Cihaz%20Raporu.pdf>
 (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
74. <http://lab-training.com/2016/02/16/how-lc-msms-scores-over-lc-ms/>
 (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
75. İşlekel H. LC-TANDEM MS-MRM temel araştırma ve klinik laboratuvarında kullanımı (2011)
 [Power Point Sunumu] Alıntı: <https://docplayer.biz.tr/1287824-Lc-tandem-ms-mrm-temel-arastirma-ve-klinik-laboratuvarinda-kullanimi.html>
76. ThermoFinnigan. Mass Spectrometer Scan Types [Power Point Sunumu]
 Alıntı: https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan_types.pdf
77. Öztürk S. JWH-073 ve metabolitlerinin LC-MS/MS ile kan ve idrarda tayinleri [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015
78. Akdağ İ. Metot Validasyonu, Ölçüm Belirsizliği ve Önemi (2004) [Power Point Sunumu].
 Tübitak UME
79. Eurachem. Analitik Metotların Amaca Uygunluğu, Metodun Geçerli Kılınması ve İlgili Konular için Laboratuvar Kılavuzu 2.baskı (Türkçe Çeviri), 2018

80. Yılmaz A., TURKLAB Rehber 01: Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu (2013) 2. Revizyon, Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği, İstanbul
81. Zazoğlu S. İmmünolojik analiz (CEDIA) pozitif Sonuçlarının LC/MS/MS yöntemi ile teyidi ve yöntemin validasyonu [Doktora Tezi]. Trabzon: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2011
82. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı. Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi, 2013
83. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberi (Erişim Tarihi: 17.05.2019)
84. He, K., Echigo, S., Asada, Y., & Itoh, S. Determination of caffeine and its metabolites in wastewater treatment plants using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences* 2018; 34(3):349-354.
85. Gören, İ.E., Dağlıoğlu, N. Enerji İçeceklerinde Yüksek Risk: Kafein. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences* 2019 Ocak; doi: 10.5336/forensic.2018-63828
86. Chen, F., Hu, Z. Y., Parker, R. B., & Laizure, S. C. (2017). Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS and clinical application. *Biomedical Chromatography* 2017; 31(6): e3900.
87. Zhou, H., Wu, C., Huang, X., Gao, M., Wen, X., Tsuno, H., & Tanaka, H. Occurrence of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage treatment plants and receiving rivers in Beijing, China. *Water Environment Research* 2010; 82(11):2239-2248.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı: Yeliz ARPACIK
 Doğum yeri ve tarihi: Şişli-İstanbul, 17.06.1988
 e-posta: yelizarpacik@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: İstanbul Üniversitesi–Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri, 2016-2019
 Lisans: İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, 2006-2010
 Lise: Şişli Kurtuluş Lisesi (YDA), 2002-2006
 İlköğretim: Beyoğlu İhsan Şerif İlköğretim Okulu, 1994-2002

Mesleki Deneyim

2015-...: Sağlık Bakanlığı, İstanbul 1 No’lu Halk Sağlığı Laboratuvarı
 2011-2015: Tekstil ve Sağlık Özel sektöründe Laboratuvar Analisti

Yabancı Dil

İngilizce

Katılmış Olduğu Eğitimler ve Seminerler

ISO 19011:2018 Yönetim Sistemlerinin Denetimi ve İç Tetkikçi
 TS EN ISO/IEC 17025:2017 Uygunluk Değerlendirme-Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar
 Kaliteye Yönelik Problem Çözme Teknikleri
 ISO 13528 LAK Yeterlilik Deneyinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler
 14.Adli Bilimler Kongresi
 Macherey-Nagel Kromatografi Semineri
 Kimyasal Analizlere Yönelik Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi
 Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma ve Yeterlilik Testleri
 TS EN ISO/IEC 17043 Uygunluk değerlendirmesi - Yeterlilik deneyi için genel kurallar
 Shimadzu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı/LC-20A Kullanıcı Eğitimi
 İç Tetkik Eğitimi
 TS EN ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi
 GLP (İyi Laboratuvar Uygulamaları) ve GMP (İyi Üretim Uygulamaları)