TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEKONYUM ÖRNEKLERİNDE ÇEŞİTLİ TOKSİK MADDELERİN ARAŞTIRILMASI

Kenan Can TOK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ

ANKARA
2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEKONYUM ÖRNEKLERİNDE ÇEŞİTLİ TOKSİK MADDELERİN ARAŞTIRILMASI

Kenan Can TOK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 21L0217001 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kenan Can TOK
Tarih:
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Doktora Programında
Kenan Can TOK tarafından hazırlanan
"Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması" adlı tez
çalışması aşağıdaki jüri tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31.08.2022

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Saadet ARSAN
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Onur ERDEM
Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane Eczacılık Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Ü. Eczacılık Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN **ii**
KABUL VE ONAY **iii**
İÇİNDEKİLER **iv**
ÖNSÖZ **vi**
SİMGELER VE KISALTMALAR **viii**
ŞEKİLLER **x**
ÇİZELGELER **xii**

1. GİRİŞ **1**
1.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar 2
1.1.1. Bisfenol A ve Diğer Bisfenol Analogları 4
1.1.2. Ftalat Esterleri 8
1.1.3. Triklosan 11
1.2. Mekonyum 12
1.3. Gaz Kromatografisi 17
1.4. Kütle Spektrometresi 20
1.5. Örnek Hazırlama 21
1.5.1. Protein Çöktürme 21
1.5.2. Sıvı-sıvı Özütleme 22
1.5.3. Türevleme 23
1.6. Validasyon 28

2. GEREÇ VE YÖNTEM **29**
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 29
2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 30
2.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 31
2.4. Çalışmada Kullanılan Yazılımlar 32
2.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması 32
2.6. Mekonyum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması 34
2.7. En Uygun Kromatografik Yöntemin Geliştirilmesi 34
2.8. En Uygun Örnek Hazırlama Yönteminin Geliştirilmesi 35
2.8.1. Protein Çöktürme 35
2.8.2. Sıvı-sıvı Özütleme 36
2.9. En Uygun Türevleme Yönteminin Geliştirilmesi 37
2.10. Matriks Uyumlu Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması 37
2.11. Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu 39
2.11.1. Seçicilik 39
2.11.2. Doğruluk 39

2.11.3. Kesinlik 40
2.11.4. Doğrusallık 40
2.11.5. Çalışma Aralığı 41
2.11.6. Tespit ve Tayin Sınırları 41

3. BULGULAR 42
3.1. En Uygun Gaz Kromatografisi Değişkenleri 42
3.2. En Uygun Kütle Seçici Dedektör Değişkenleri 42
3.3. En Uygun Özütleme Yöntemi 46
3.4. Katılımcılara Ait Veriler 48
3.5. Yöntem Validasyonu 49
3.5.1. Seçicilik 49
3.5.2. Doğruluk 52
3.5.3. Kesinlik 52
3.5.4. Doğrusallık 54
3.5.5. Çalışma Aralığı 59
3.5.6. Tespit ve Tayin Sınırları 59
3.6. Analiz Sonuçları 60

4. TARTIŞMA 61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
ÖZET 66
SUMMARY 67
KAYNAKLAR 68
EKLER 75
ÖZGEÇMİŞ 79

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, mekonyum örneklerinden bazı endokrin bozucu kimyasalların hızlı ve etkili tespiti ve tayini için özütleme ve analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, rehberlere uygun bir şekilde valide edilerek analitik ve toksikolojik çalışmalarda kullanılması planlanmıştır. Yaşadığımız dünyada fetüsler de dahil olmak üzere her canlı çevresel kirleticilere maruz kalmaktadır. Bu bağlamda geliştirilen yöntemin yeni doğan ve halk sağlığı açısından faydalı olması hedeflenmiştir.

Tez sürecimin en başından beri yanımda olan, hiçbir yardımı esirgemeyen, çalışacağım biyolojik örnek konusunda bana yön göstererek tez çalışmam süresince çok şey öğrenmemi sağlayan danışmanım Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ'e

Akademik hayata başlamamı sağlayan, çalışmamın yürütülmesinde her türlü desteği veren, maddi ve manevi desteğini her daim hissettiğim, Adli Bilimler Enstitüsü Müdürümüz Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN'e,

Biyolojik örneklere rahatlıkla erişmem konusunda her tür kolaylığı sağlayan hocam Prof. Dr. Saadet ARSAN'a,

Analitik kimya ve enstrümantal analiz konusunda bütün bilgi birikimini benimle paylaşan, karşılaştığım her soruna çözüm üreten, gece gündüz demeden her zaman ulaşabildiğim hocam Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a,

Lisansüstü eğitimimin en başından beri beni tanıyan, doktora eğitimim sırasında da desteklerini esirgemeyen, yüksek lisans danışmanım Prof. Dr. Onur ERDEM'e,

Doktora sırası yurtdışı eğitimim sırasında destekleri için Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a ve proje eş danışmanı Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE'ye,

Gaz kromatografisi ve örnek hazırlama konusunda yıllarca sürede kazanılmış deneyimini bir ay gibi kısa bir sürede benimle paylaşan Doç. Dr. Khaled Masoud MUHAMED'e,

Çalışmamda, özellikle madde ve malzeme konusunda her tür desteği veren, arkadaşım Dr. Neslihan BOZKURT'a,

Numunelerin hazırlanması sırasında laboratuvarda yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencimiz H. Ceren BOZMAOĞLU'na ve stajyer kimya lisans öğrencimiz Kardelen AVCI'ya,

Örneklerin toplanması sırasında yoğunluklarına rağmen destek olan yeni doğan bölümü asistanlarına ve hemşire,

Tüm hayatımı borçlu olduğum annem Nurgün TOK'a ve babam Ali Ertan TOK'a,

Varlığı ve tez yazımı sırasındaki maddi ve manevi destekleri için Sezgi YÜCEL'e,

Son olarak "Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması" başlıklı tez çalışmamı doktora projesi olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

% BSS	Yüzde Bağıl Standart Sapma
µL	mikrolitre
µg	mikrogram
ACN	Asetonitril
ANOVA	Analysis of variance
BİAS	Ölçümün sistematik hatası
BPA	Bisfenol A
BPA-d_{16}	Döteryumlu Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
dk	dakika
EMA	Avrupa İlaç Kurumu
eV	elektrovolt
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
g	gram
GC	Gaz kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
h/h	hacim/hacim
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği
k/h	kütle/hacim
L	Litre
LOD	Tespit Limiti (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Limiti (Limit of Quantitation)
m	eğim

m/z	kütle/yük
mL	mililitre
MMP	monometil ftalat
MEP	monoetil ftalat
MiBP	monobütil ftalat
MEHP	monoetilhekzil ftalat
n	kesim noktası
ng	nanogram
^{o}C	derece Santigrat
pH	Hidrojen iyonu derişimi
psi	pounds per square inch
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
s	saniye
S/N	Sinyal/Gürültü
TRK	Triklosan
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları (Sosa-Ferrera ve ark., 2013'den düzenlenerek alıntılanmıştır). 3
Şekil 1.2. Östradiol ve Bisfenol analoglarının molekül yapıları ve benzerlikleri..... 5
Şekil 1.3. Mekonyum..... 12
Şekil 1.4. Gaz kromatografisinin şeması. 18
Şekil 1.5. Dört kutuplu kütle seçici dedektörün şeması..... 21
Şekil 1.6. Nernst'in dağılma katsayısı denklemi. 22
Şekil 1.7. Henderson-Hasselbalch eşitliği. 23
Şekil 1.8. Aynı maddenin farklı alıkonma mekanizmaları sonucunda oluşan iki farklı Gauss pikinin birleşimi ile meydana gelen güçlü bir kuyruklanma örneği (S. Moldoveanu ve David, 2015'den düzenlenerek alıntılanmıştır)..... 25
Şekil 1.9. Genel sililleme reaksiyonu. 26
Şekil 2.1. Özütleme yöntemi. 38
Şekil 2.2. Yüzde doğruluk denklemi. 40
Şekil 2.3. Yüzde bağıl standart sapma denklemi. 40
Şekil 2.4. Tespit ve tayin limiti denklemi. 41
Şekil 3.1. Optimize GK/KS yöntemi ile elde edilmiş standart karışımına ait kromatogram (10 ng/mL). 44
Şekil 3.2. Optimize GK/KS yöntemi ile elde edilmiş özütlemiş örneğine ait kromatogram (10 ng/mL). 45
Şekil 3.3. Çözücülerin özütleme başarımı. 47
Şekil 3.4. DKM ile denenen farklı yöntemlerin özütleme başarımı. 47
Şekil 3.5. MMP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 49
Şekil 3.6. MEP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 49
Şekil 3.7. MiBP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 50
Şekil 3.8. BPAF'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 50

Şekil 3.9. BPF'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 50
Şekil 3.10. TRK'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 51
Şekil 3.11. BPA'ya ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 51
Şekil 3.12. BPS'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL). 51
Şekil 3.13. BPA kalibrasyon eğrisi. 54
Şekil 3.14. BPS kalibrasyon eğrisi. 55
Şekil 3.15. BPF kalibrasyon eğrisi. 55
Şekil 3.16. BPAF kalibrasyon eğrisi. 56
Şekil 3.17. TRK kalibrasyon eğrisi. 56
Şekil 3.18. MMP kalibrasyon eğrisi. 57
Şekil 3.19. MEP kalibrasyon eğrisi. 57
Şekil 3.20. MiBF kalibrasyon eğrisi. 58

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mekonyum örneklerinde yapılan çalışmalarda tespit edilen bazı bileşikler. 14
Çizelge 1.2. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek maternal örnekler. 15
Çizelge 1.3. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek fetal örnekler. 15
Çizelge 1.4. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek yenidoğan örnekleri. 16
Çizelge 1.5. Aktif hidrojen atomu içeren bileşikleri türevleme seçenekleri. 25
Çizelge 1.6. Türevleme için kullanılan bazı sililleme reaktifleri. 27
Çizelge 1.7. ICH tarafından yayınlanan validasyon parametreleri. 28
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar listesi. 29
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar listesi. 30
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi. 31
Çizelge 2.4. Analitik referans standartların hazırlanması. 32
Çizelge 2.5. İç standardın (İS) hazırlanması. 33
Çizelge 2.6. NaOH ve HCl çözeltilerin hazırlanması. 33
Çizelge 2.7. Kalibrasyon noktaları için kullanılan derişimler ve hazırlanma hacimleri. 38
Çizelge 3.1. En uygun gaz kromatografisi yönteminin değişkenleri. 42
Çizelge 3.2. En uygun (SIM) parametreleri. 43
Çizelge 3.3. En uygun MS parametreleri 43
Çizelge 3.4. Annelere ve yeni doğanlara ait bilgiler. 48
Çizelge 3.5. Optimize edilen gaz kromatografisi yönteminin parametreleri 48
Çizelge 3.6. Çalışmamızın doğruluk ve kesinlik ile ilgili verileri. 52

Çizelge 3.7. Kalibrasyon örneklerinin GK/KS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=5). 58
Çizelge 3.8. Kalibrasyon örneklerinin GK/KS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=5). 59
Çizelge 3.9. Hedef analitlerin geometrik ortalaması, çeyreklik ve seçilmiş yüzdelik değerleri (ng/g). 60
Çizelge 3.10. Yenidoğan cinsiyeti ve tayin edilen ortalama miktarlar (ng/g) arasındaki ilişki. 60

1. GİRİŞ

Organik ve inorganik kontaminantlara maruz kalmak insan sağlığı ve çevre için büyük bir endişe yaratmaktadır (Cassoulet ve ark., 2019). Teknolojideki ilerlemeyle birlikte, kütle spektrometrisi kullanılarak, doğanın her kısmında bulunan sayısız miktardaki insan kaynaklı organik kirleticilerin belirlenmesi sağlanmıştır (Alder ve ark., 2006). Endişe yaratan bu kontaminantlara doğada pek çok canlıda rastlanmıştır. Bu ksenobiyotiklerin pek çoğunun plasenta bariyerini aşabiliyor olmasından dolayı fetüs pek çok kontaminanta maruz kalabilmekte ve bu kontaminantların prenatal ve postnatal dönemdeki olası etkileri henüz yeteri kadar bilinmemektedir. Fetüsün maruz kaldığı kontaminantların daha iyi değerlendirilmesi önemli olmasına karşın çalışılması oldukça zorludur.

Ksenobiyotiklerin organizmaya birden fazla yolla zarar verme ihtimali bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi ksenobiyotiklerin endokrin bozucu etkisidir. Endokrin bozucu kimyasallar (EBK) olarak da adlandırılan bu grup, hormon etki mekanizmasına müdahale eden ve böylece kanser, üreme bozukluğu, bilişsel eksiklikler ve obezite dahil olmak üzere olumsuz sağlık sonuçları riskini artıran eksojen kimyasalları içerisinde barındıran bir gruptur (La Merrill ve ark., 2020).

Bisfenol analogları, dioksinler, perfloroalkil ve polifloroalkil bileşikler, ftalat esterleri, fitoöstrojenler, polibromlu difenil eterler ve poliklorlu bifeniller bu grubun en bilinen örneklerindendir.

Organizmadaki ömrü görece kısa olan bu maddeler (Arbuckle ve ark., 2016) çoğunlukla idrar yoluyla atılmaktadırlar. Dolayısıyla vücuttan kısa sürede atılan bu maddelerin idrardaki tespiti, bizlere ancak bireyin kısa süre içerinde ne kadar maruz

kaldığı hakkında bilgi verecektir. Hayatının ilk dokuz ayını ana rahminde geçiren bu nedenle annenin maruz kaldığı kimyasallara dolaylı olarak maruz kalan fetüsün, maruz kaldığı maddelerin miktarının belirlenmesi için fetüs ile birlikte oluşan bir örneğin kullanımı çok daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Gebelik süresince biriken/oluşan ve doğum sonrasında atılan bir biyolojik numunenin kullanımı, uzun süreli maruz kalmayı aydınlatmak için daha kullanışlı olacaktır. Bu açıdan bakıldığında mekonyum, amniyon sıvısı ve göbek bağı geriye dönük maruz kalınan maddeleri ve miktarlarını gösterebilecek önemli biyolojik örneklerdir.

Bu tez çalışması kapsamında, pek çok tüketim ürünü vasıtasıyla sıklıkla karşılaşılan ve EBK sınıfında bulunan triklosanın, bisfenol analoglarının ve ftalat esterlerinin, mekonyum örneklerinden tespit ve tayini için örnek hazırlama tekniği geliştirilmesi, hazırlanan örneklerin analizi için gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi tekniği geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemlerin validasyonu planlanmıştır. Geliştirilen yöntem 100 sağlıklı yeni doğana ait mekonyum örneği üzerinde denenerek yöntemin uygulanabilirliği test edilecek ve yeni doğanların maruz kaldığı bu kimyasallar hakkında genel bilgi edinilecektir.

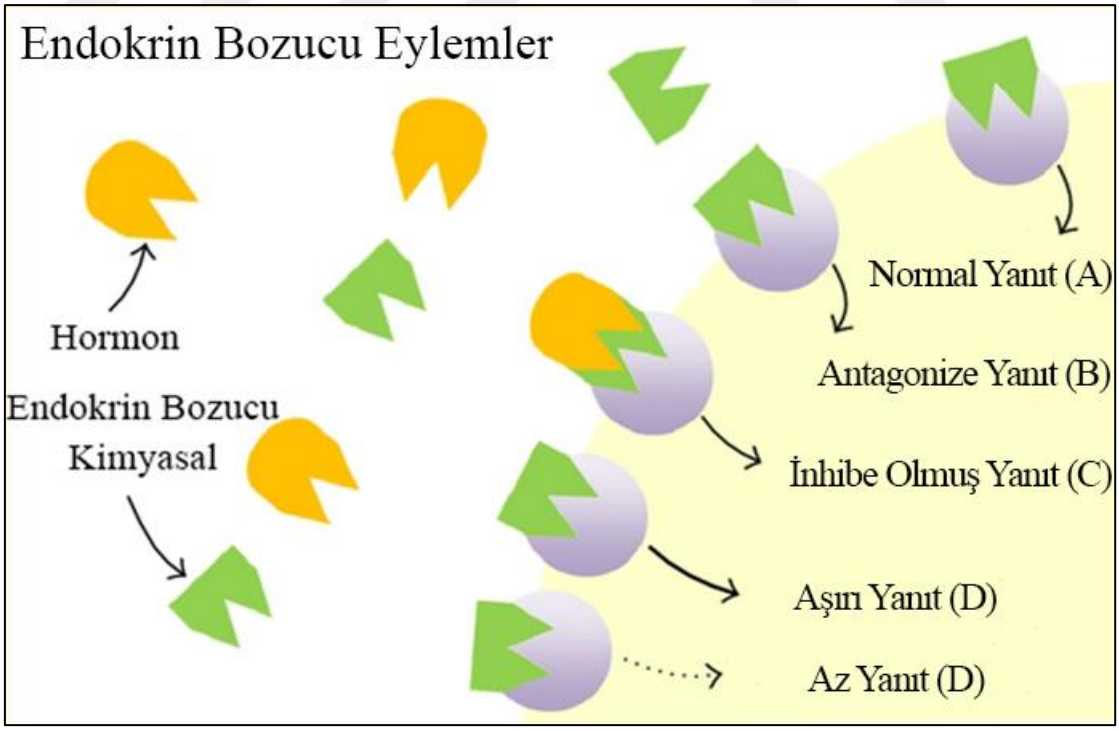
1.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar

Doğada bulunan veya insan tarafından sentetik olarak üretilen pek çok kimyasal organizmanın endokrin sistemini oluşturan hormonları taklit edebilir veya bunların çalışmasını engelleyebilir. Endokrin bozucular (EB) olarak da adlandırılan bu kimyasallar, üreme başta olmak üzere, bağışıklık, sinir ve diğer sistemlerde sorunlara yol açabilir ve gelişimin bozulmasına neden olabilir.

Bu kimyasallar gündelik olarak kullandığımız pek çok üründe bulunabilmektedir. Bu maddelerin bir kısmı doğada birikebilmekte ve besin zincirinin alt basamaklarında bulunan diğer canlıları da etkilemektedir.

Temel olarak bu kimyasallara beslenme, hava, cilt ve su yoluyla temas gerçekleşebilir. EB, günlük kabul edilebilir alım miktarının (GKEAM) çok altında değerlerde bile olumsuz sonuçlara neden olabilmektedirler çünkü vücudumuzun endokrin sistemi işleyişi, hormonlarımızdaki küçük değişikliklerle gerçekleşmektedir.

EBK'ın temel olarak dört farklı yolla endokrin sistemi değiştirdiği bilinmektedir; a. Vücutta doğal olarak bulunan hormonları taklit ederek, b. Hormonların eylemlerini antagonize ederek, c. Sentez ve metabolizma yolaklarını değiştirerek, d. Belirli reseptörlerin ifadelerini değiştirerek (Sosa-Ferrera ve ark., 2013).

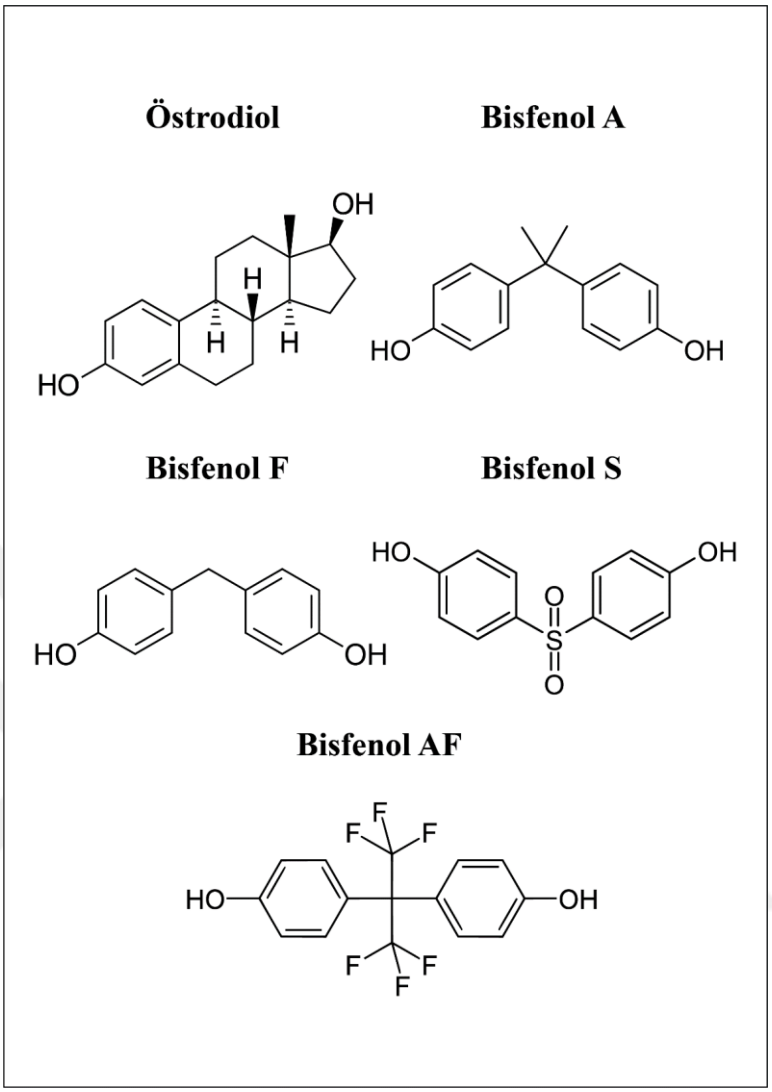


Şekil 1.1. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları (Sosa-Ferrera ve ark., 2013'den düzenlenerek alıntılanmıştır).

1.1.1. Bisfenol A ve Diğer Bisfenol Analogları

Bisfenol A (BPA), pek çok çeşitli polikarbonat plastik üretiminde, diş dolgusu reçinelerinde, gıda paketlerinde, fişlerde kullanılan ve yüksek miktarlarda üretilen bir monomerdir. Tamamlanmamış polimerizasyon, yüksek sıcaklık ve kimyasal bozulma nedeniyle BPA, gıda ve içecek ambalajlarından sızıntı yapabilmektedir. Beyaz renkli katı haldeki bu madde organik çözücülerde çözünmesine karşın sudaki çözünürlüğü düşüktür. 2015 yılında tahmini olarak 4 milyon ton üretilen BPA'nın, 2022 yılında dünya çapında 10 milyon tona üretime ulaşması beklenmektedir (Abraham ve Chakraborty, 2020). Amerika'da 50 ug/kg/gün, Avrupa Birliğinde 10 ug/kg /gün olarak belirlenen GKEAM'nın, günlük maruz kalınan miktarın (yaklaşık <1 ug/kg/gün) oldukça üzerinde olduğu düşünülmektedir. Buna karşın günlük kabul edilebilir alım sınırları, BPA'nın prenatal ve neonatal gelişim sürecini kapsayacak şekilde belirlenmemiştir. Hayvan modelleri üzerinde mevcut tolere edilebilir günlük alım (TDI) limitleri altında yapılan araştırmalarda kayda değer etkilere rastlanmıştır (Rezg ve ark., 2014).

BPA'nın sağlık etkileri, resmi kuruluşların ve bilimsel çevrelerin sıklıkla gündeminde olmuştur ve hala güncelliğini korumaktadır. Vücuttaki östrojenin etkilerini taklit eden bir yapıya sahip olması ve kullanımındaki yaygınlık endişeleri arttırmaktadır. BPA'nın doğal östrojenin etkilerini taklit etme yeteneği, fenol gruplarının hem BPA hem de östradiol üzerindeki benzerliğinden kaynaklanmaktadır (Kwon ve ark., 2007). BPA içeren pek çok ürün açık bir şekilde etiketlenmemiş olmasına karşın yaygın şekilde bulunmaktadır. Bazı ülkelerde çeşitli ürünlerde, özellikle bebek ürünlerinde, yasaklanması ve/veya kısıtlanması ile maruz kalmanın azaldığı raporlansa bile, bu sefer de BPA'ya alternatif olarak kullanılmaya başlanan Bisfenol S (BPS) ve Bisfenol F (BPF) gibi monomerlerin güvenilirliği konusunda tartışmalar başlamıştır (Rochester ve Bolden, 2015; Thoene ve ark., 2020).



Şekil 1.2. Östradiol ve Bisfenol analoglarının molekül yapıları ve benzerlikleri.

BPA'nın insanlarda hayvanlarda bir çok hormon reseptörü ile etkileşime girdiği çalışmalarla gösterilmiştir (Mackay ve Abizaid, 2018). Östrojen reseptörü (ER) olan ERα ve ERβ'nın her ikisine de bağlanabilen BPA östrojeni taklit edebildiği gibi antagonize de edebilmektedir (Kuiper ve ark., 1997; Hiroi ve ark., 1999). Yüksek derişimlerde androjen reseptörü (AR) antagonisti olarak davranabilmektedir. Bununla birlikte G proteinine bağlı östrojen reseptörü 30'un (GPER/GPR30) agonisti olarak davrandığı da gözlemlenmiştir (Dong ve ark., 2011; Chevalier ve ark., 2012; Pupo ve ark., 2012; Sheng ve ark., 2013). Ayrıca BPA, östrojenle ilişkili reseptör γ (ERR-γ) ile de etkileşime girebilmektedir (Matsushima ve ark., 2007). ERR-γ vücudumuzun farklı

bölgelerinde farklı miktarlarda ifade edilmektedir. Yüksek miktarda ifade edildiği yerlerden birisi de plasentadır (Takeda ve ark., 2009).

BPA'nın yapılan çalışmalarda vücudumuzdan hızla metabolize edilerek atıldığı, doğada hızla biyodegredasyona uğradığı ve biyobirikim yapmadığı (Staples ve ark., 1998) gösterilse bile, yıllık üretimin fazlalığı ve çevreye sürekli salınımı düşük dozlarda sürekli maruz kalmaya sebep olmaktadır.

BPA'nın prenatal ve perinatal maruz kalma sonrası, uzun dönemde davranışsal olarak; a- anksiyete ve sorgulama b- öğrenme ve hafıza c- sosyoseksüel davranışlar üzerinde bozulmalara neden olduğu oldukça somut delillerle desteklenmektedir (Palanza ve ark., 2016).

BPA'ya maternal yolla maruz kalma, gelişen fetal ovaryumda, oogenezin erken dönemlerine etki etmektedir ve mayotik defektlere neden olarak yetişkinlik döneminde yüksek olasılıkla kromozomal anomalilere neden olmaktadır (Mallozzi ve ark., 2016).

Prenatal maruz kalmanın gebelik üzerine olan etkilerini araştırmak için yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonucunda, genellikle belirgin bir etki gözlemlenmemiş veya toplam BPA ve fetal büyüme durumunda çelişkili sonuçlar çıkmıştır. Benzer şekilde, bazı çalışmalarda prenatal dönemde BPA'ya maruz kalmanın çocuk davranışı üzerine olumsuz etkisi gözlemlenmemişken, bazılarında kayda değer etkiler gözlemlemişlerdir (Arbuckle, Weiss, ve ark., 2015).

Yukarıda bahsedildiği üzere bazı ülkelerin çeşitli ürünlerde BPA kullanımını kısıtlaması ve halkın endişeleri nedeniyle bazı üreticiler BPA'nın alternatiflerine yönelmeye başlamışlardır. Bu alternatifler başta BPS olmak üzere, BPF, BFAF'dir.

BPS'nin BPA'dan farkı, bağlayıcı grup olarak dimetilmetilen ($C(CH_3)_2$) grubu yerine sülfon (SO_2) grubu bulundurmasıdır. Günümüzde kullanımı hızla artmakla birlikte pek çok tüketici ürününde bulunmaktadır. Özellikle plastik kaplarda "BPA içermez" olarak etiketlenmesi için BPA yerine BPS tercih edilebilmektedir. Buna karşın BPS, BPA ile kıyaslanabilecek östrojenik etkilere sahiptir (Grignard ve ark., 2012). Yapılan güncel bir çalışmada BPS'ye fetal dönemde maruz kalmanın fetüsün gelişimsel programını bozduğu belirtilmiştir. Koyunlarla yapılan bir çalışmada, BPA'da olduğu gibi, BPS'nin de plasentaya geçtiği ve plasentanın endokrin fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (Basak ve ark., 2020).

BPF, iki fenol grubunun bir metilen grubu ile bağlanmasıyla oluşan bir moleküldür. BPA ile ilgili endişelerin artmasıyla kullanımı artan bir diğer bisfenol analoğudur. Östrojenik, anti androjenik ve tiroidojenik etkileri bulunmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda sitotoksik etkiler, hücresel disfonksiyon, DNA hasarı ve kromozomal abrazyon etkileri göstermiştir (Rochester ve Bolden, 2015). Yapılan bazı sistematik incelemelerde, BPF'nin BPA gibi östrojenik ve anti androjenik etkilerle endokrin bozucu etkisi olduğundan bahsedilmektedir (Rochester ve Bolden, 2015; Chen ve ark., 2016).

BPAF, BPA'nın iki metil grubunun triflorometil ile değiştirilmesiyle oluşturulmuş bir bisfenol analoğudur. Elektronik, kozmetik, kimya, metal ve kauçuk endüstrisinde kullanılmaktadır. BPA'nın aksine ERR-γ ile etkileşime girmemektedir. Fakat ERR-α'yı aktive ederken, ERR-β'ya bağlanarak devre dışı bırakır.

1.1.2. Ftalat Esterleri

Ftalatlar oldukça yaygın olan, gebeler de dâhil olmak üzere tüm insan popülasyonunu etkileyen, ortoftalik asitlerin (1,2-dikarboksilik asit) dialkilester veya alkil ve aril esterleridir. Genellikle sert plastiğin yumuşak ve esnek hale getirilmesi için kullanılmaktadır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip olan ftalatlar tesisatlarda, vinil zeminlerde ve duvar kaplamalarında bulunabilir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olan ftalarlar çoğunlukla kişisel bakım ürünlerinde (parfümler, şampuanlar, kozmetikler ve tırnak parlatıcıları gibi) bulunmaktadır. Ftalatlar ayrıca etkisiz veya aktif bileşen olarak bazı pestisitlerin içerisine eklenmektedir (Engel ve ark., 2010). Potansiyel maruz kalma yolları, gıda, kapalı alanda toza maruz kalma, solunum, dermal absorbsiyon ve direkt dermal tutulum şeklindedir (Arbuckle ve ark., 2016).

Avrupa'da, maruz kalınan dimetil (DMP), dietil (DEP), bütilbenzil (BBzP), diizononil (DiNP) ve diizodesil (DiDP) ftalatın kaynağı genel olarak tüketim malları ve kapalı alan kaynakları olmakla birlikte, diizobütil (DiBP), di-n-bütil (DnBP) ve di-2-etilhekzil (DEHP) ftalatın genel kaynağı gıdalardır (Wormuth ve ark., 2006).

Ftalat diesterleri absorbe olduklarında hızlı bir şekilde monoesterlerine metabolize olurlar. Biyolojik olarak aktif olan bu maddeler yine hızlı bir şekilde idrar yoluyla atılırlar (Bloom ve ark., 2015).

Ftalat esterlerine devamlı ve günlük olarak maruz kalınması oldukça kritik bir konudur. Çünkü toksikolojik çalışmalar bu bileşiklerin ve metabolitlerinin insan üzerindeki önemli yan etkilerini göstermiştir. Tüm ftalat esterleri olmasa bile bazılarının gelişim, üreme ve tiroit sinyali ve metabolik homeostaz gibi diğer fonksiyon ve sistemleri etkileyen endokrin bozucu kimyasallar grubunda oldukları

konusunda ciddi şüpheler bulunmaktadır (Arbuckle, Marro, ve ark., 2015; Marie ve ark., 2015).

Bu bileşiklerin gebelik esnasındaki etki mekanizmaları; östrojenik ve androjenik aktiviteleri, over steroidonegenezi bozması, tiroit bezlerine antagonist etki oluşturması, rahim içi yangıyı (enflamasyonu) tetiklemesi ve plasental fonksiyonları bozması şeklindedir (Marie ve ark., 2015).

Prenatal dönemde maruz kalınan bazı ftalat esterlerinin, nörogelişime ters etki oluşturmasıyla ilgili de şüpheler bulunmaktadır. Beyin gelişimi gebeliğin ilk üç ayında başlamaktadır ve çevresel kirleticilerden en fazla bu dönemde zarar görmektedir. Androjen her iki cinsiyetin beyin gelişimi için de kilit bir rol oynamaktadır. Bazı ftalat esterlerinin anti-androjenisitesinin ve fetal leydig hücre fonksiyonunu ve testosteron üretimini etkileme kapasitelerinin ve estradiole dönüşümünün genital anomalilerde olduğu gibi fetal nörogelişim bozukluklarında da etiyolojik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Engel ve ark., 2010; Whyatt ve ark., 2012).

Yüksek molekül ağırlığına sahip ftalat esteri metabolitlerinin prenatal maternal derişimleri ile bozulmuş yeni doğan davranışları arasındaki ilişki yapılan bazı çalışmalarda belirtilmiştir. Özellikle doğumdan sonraki 5 gün içerisinde muayene edilen kız çocuklarında, oryantasyonda, motor becerilerde ve ortalama atiklik kalitesinde aksaklıklar tespit edilmiştir (Engel ve ark., 2009). Daha sonra aynı yazar tarafından yapılan başka bir çalışmada, prenatal dönemde maruz kalınan düşük moleküler ağırlığa sahip ftalat esterleri ile düşük agresyon skoru, dikkat problemleri, davranış problemleri, depresyon ve problem çözme becerileri arasında ilişki bulunmuştur (Engel ve ark., 2010).

Prenatal dönemde ftalat esterlerine maruz kalan çocuklara yönelik yapılan bir prospektif çalışmada, maruz kalınan DnBP ve DiBP ile 7 yaşında yapılan IQ ölçümü arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Factor-Litvak ve ark., 2014).

Özel olarak, ftalat esterlerinin yumurtalık ve oosit gelişimini değiştirerek folikülogenezi en başında bozduğu ve büyük olasılıkla oosit ölümüne ve anormal yumurtalık mimarisine yol açtığı gösterilmiştir (Hannon ve Flaws, 2015).

Yapılan bir başka çalışmada, maruz kalınan ftalat esterleri ile düşük doğum ağırlığı ve konjenital kalp defekti riski arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, güncel literatür, gündelik bir ilişki kurmak için yeterli kanıt sağlamamaktadır (Marie ve ark., 2015).

Doğum öncesinde DEHP'a yüksek oranda maruz kalma, azalmış anogenital mesafe, kısa penis ve artan oranda artiküler testis yetersizliği gibi yavruda oluşan çeşitli fiziksel değişiklikler ile ilişkili bulunmuştur (Swan, 2008).

Toksikoloji literatürünün sistematik incelemesi sonrasında, günlük kabul edilebilir alım miktarları, maruz kalınan miktarların üzerinde de olsa ftalat esterlerinin üreme ve gelişim üzerine toksik etkileri olduğu konusunda yeterli miktarda kanıt olduğu görülmektedir (Kay ve ark., 2013).

Bu etkiler nedeniyle Avrupa Birliği 2015 yılında DEHP, DnBP, DiBP ve BBzP'yi üreme toksikanı olarak sınıflandırmıştır.

1.1.3. Triklosan

Triklosan (TKS), tekstilendüstrisinde, deri, kâğıt, plastik ve kauçuk gibi malzemelerde koruyucu olarak ve reçetesiz ilaçlar ve doğal sağlık ürünleri de dâhil olmak üzere bir dizi kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde anti-bakteriyel ve anti-fungal bir ajan olarak kullanılmaktadır (Health Canada and Environment Canada, 2012). ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı, TKS içeren ürünler veri tabanında bir dizi ürün listelemektedir. TKS, antibakteriyel el sabunları, bulaşık deterjanı, diş macunu, tıraş jeli, antiperspirant, deodorant, yüz ve vücut yıkama losyonu, el losyonu, rujlar ve antibakteriyel köpek şampuanında bulunabilir.

Ergenlerde kişisel bakım ürünleri kullanımının, üriner TKS derişimlerinde önemli bir etken olduğu gösterilmiştir (Den Hond ve ark., 2013). Yalnızca yapılan iki epidemiyolojik çalışmada prenatal dönemde maruz kalınan TKS'nin potansiyel sağlık etkileri araştırılmış ve doğum ağırlığı, boy veya baş çevresi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bildirilmiştir (Wolff ve ark., 2008; Philippat ve ark., 2014; Philippat ve ark., 2015). Ancak, bu çalışmalardan birinde, daha yüksek düzeydeki TKS'a prenatal dönemde maruz kalındığında, erkek bebeklerin anlamlı olarak daha kısa olduğunu bildirilmiştir (Wolff ve ark., 2008).

Bu maddelerin mekonyum örneklerinde yapılan analizi ile ilgili literatür oldukça kısıtlıdır. Kato ve arkadaşları (2006) geliştirdikleri GK-MS/MS yöntemi ile mekonyum ve semende ftalat tayini yapmışlardır. Zang ve arkadaşları 2009 yılında maternal kan, kordon kanı ve mekonyum ftalat düzeyleri ve düşük doğum ağırlığı üzerine bir çalışma yapmışlardır. 2013 yılında Li ve arkadaşları yine ftalatların tayini ile ilgili bir çalışma yapmıştır ve mekonyumda bulunan ftalat miktarının kordon kanına göre yüksek olduğunu bulmuşlardır. Xie ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada ftalata maruz kalma miktarını ve gen polimorfizmi araştırmaları için ftalat tayinini mekonyumdan yapmışlardır. Arbuckle ve arkadaşları 2015 ve 2016 yıllarında

mekonyumda dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik matrikslerde GK-MS/MS ve SK-MS/MS ile ftalat ve bisfenol tayini yapmıştır.

1.2. Mekonyum

Mekonyum bir yenidoğanın doğum sonrasındaki ilk 48 saat içerisinde yapmış olduğu dışkıya verilen isimdir. Yenidoğanın bu ilk dışkısı, sarı renkli ve sulu olan bebek dışkılarının aksine, koyu yeşil-siyah renkli ve oldukça yoğun ve yapışkan karakteristiktedir. Mekonyum, yutulan amniyotik sıvıyı, epitel hücreleri, lanugoyu ve bağırsak salgılarından türetilen suyu, lipitleri, proteinleri, sterolleri ve kolesterol öncülerini içerir. 12./14. gebelik haftasında rahimdeyken oluşmaya başlar ve birikir.



Şekil 1.3. Mekonyum.

Yapılan çalışmalarda mekonyumda pek çok kimyasal ve ilaç tespit edilmiştir. Genellikle fetüsün maruz kaldığı maddelerin tespiti için yenidoğanın veya annenin

idrarına ya da kordon kanı analizine odaklanılmaktadır. Fakat bu biyolojik örneklerden alınan sonuçlar, yalnızca doğumdan öncesindeki kısa süre boyunca (3-5 gün) maruz kalınan bazı maddeleri gösterebilmektedir. Yeni doğan idrarı toplanması oldukça zor, kordon kanı ise hem tek sefer alınabilen hem de farklı sağlık amaçlarıyla kullanılabilen değerli bir örnektir. Bununla birlikte mekonyum fetüsün içerisinde oluşmakta dolayısıyla fetüsünsün maruz kaldığı maddeleri, anne kanı, idrarı veya saçından daha doğru gösterebilecek bir örnektir (Bearer, 2003).

Kimyasallar ve bunların metabolitleri, çeşitli yollarla mekonyuma geçebilir; bunlar kan yoluyla taşınan kimyasalların difüzyonu, fetal idrarın atıldığı amniyotik sıvının fetüs tarafından yutulması veya kimyasalın metabolizmadan sonra fetal karaciğerden safra yoluyla veya diğer bağırsak salgılarından gastrointestinal sisteme atılması yoluyla gerçekleşebilir.

Mekonyum, kolaylıkla ve invaziv olmayan bir şekilde, 48 saat içerisinde kümülatif olarak toplanabilir. Aynı mekonyum örneği üzerinden birden fazla kimyasal analiz edilebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda mekonyumun inert bir matriks olduğu ve maternal örneklere göre bu özelliğinden ötürü daha doğru sonuç verebileceği belirtilmiştir (Browne ve ark., 1994; Nair ve ark., 1994; Ostrea EM, Jr., Romero, ve ark., 1994; Ostrea EM, Jr., 1999).

Mekonyum örnekleri üzerinde yapılan pek çok çalışma olmasına karşın, bisfenol analogları ve ftatlatlarla ilgili çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Çizelge 1.1.'de mekonyum örneklerinde yapılmış bazı çalışmalar tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 1.1. Mekonyum örneklerinde yapılan çalışmalarda tespit edilen bazı bileşikler.

Hedef Bileşik Grubu	Hedef Bileşikler	Kaynak
Pestisitler	Lindan	
	Pentaklorofenol	
	Klorpirifos	
	Malathion	(Whitehall, 2000)
	Klordan	
	DDT	
	Parathion	
	Organofosfat metabolitleri	(Whyatt ve Barr, 2001)
Ağır Metaller	Kurşun	
	Kadmiyum	(Ostrea EM ve ark., 2002)
	Cıva	
	Arsenik	
EBK	PCB'ler	(Whitehall, 2000)
	BPA	(Arbuckle, Marro, ve ark., 2015; Arbuckle, Weiss, ve ark., 2015; Arbuckle ve ark., 2016)
	Triklosan	
	Ftalat metabolitleri	
Alkol ve Tütün Ürünleri	Alkol metabolitleri	(Bearer ve ark., 1999; Bearer ve ark., 2003; Bearer ve ark., 2005)
	Kotinin	(Ostrea EM, Jr., Knapp, ve ark., 1994)
Terapötikler	Antihistaminikler	
	Antidepresanlar	
	Adrenerjikler	
	Antikonvulsanlar	
	Analjezikler	
	Lokal Anestetikler	
	Gıda katkıları	(Ostrea EM, Jr. ve ark., 1998)
	Balgam söktürücüler	
	Antibakteriyaller	
	Antiülser	
	Kardiyotonik	
	NSAID'ler	
Yasadışı ilaçlar	Kannabinoidler	(Whitehall, 2000)
	Opiyatlar	(Whitehall, 2000)
	Kokain	(Ostrea EM, Jr. ve ark., 1989; Callahan ve ark., 1992)
	Amfetamin	(Ostrea EM, Jr. ve ark., 1998)

Çizelge 1.2., 1.3 ve 1.4'te prenatal dönemde fetüsün maruz kaldığı kimyasalların analiz edilebileceği biyolojik örnekler ve bunların avantajları/dezavantajları özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek maternal örnekler.

Örnekler	Avantajlar	Dezavantajlar
Maternal örnekler		
İdrar	Bol miktarda örnek	İş birliği gerektirir Örneğe dış müdehale mümkündür Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Saç	Maruz kalma zamanını işaret edebilir	İş birliği gerektirir Özel analitik teknik gerektirir
Kan	Pek çok biyobelirteci barındırır	İnvaziv işlem gerektirir Acı verici olabilir Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Nefes	Bol miktarda örnek Toplaması kolay	Özel ekipman gerektirir Bu alandaki teknoloji kısıtlıdır İş birliği gerektirir Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Salya	Toplanması kolaydır	İş birliği gerektirir Örnek miktarı kısıtlıdır Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Transdermal	Toplanması kolaydır	Özel ekipman gerektirir Bu alandaki teknoloji kısıtlıdır İş birliği gerektirir

Çizelge 1.3. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek fetal örnekler.

Fetal örnekler		
Kan	Çok yakın dönemi yansıtır	İş birliği gerektirir Örnek miktarı kısıtlıdır Aşırı invaziv Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Koryonik villus	Çok erken dönemi yansıtır	İş birliği gerektirir Örnek miktarı kısıtlıdır Aşırı invaziv
Amniyotik sıvı	18. haftadan itibaren örneklenebilir	İş birliği gerektirir Örnek miktarı kısıtlıdır Aşırı invaziv
Foliküler sıvı	Gebelik öncesi dönemi yansıtır	İş birliği gerektirir Örnek miktarı kısıtlıdır Aşırı invaziv

Çizelge 1.4. Prenatal dönemde maruz kalınan kimyasalların analizinde kullanılabilecek yenidoğan örnekleri.

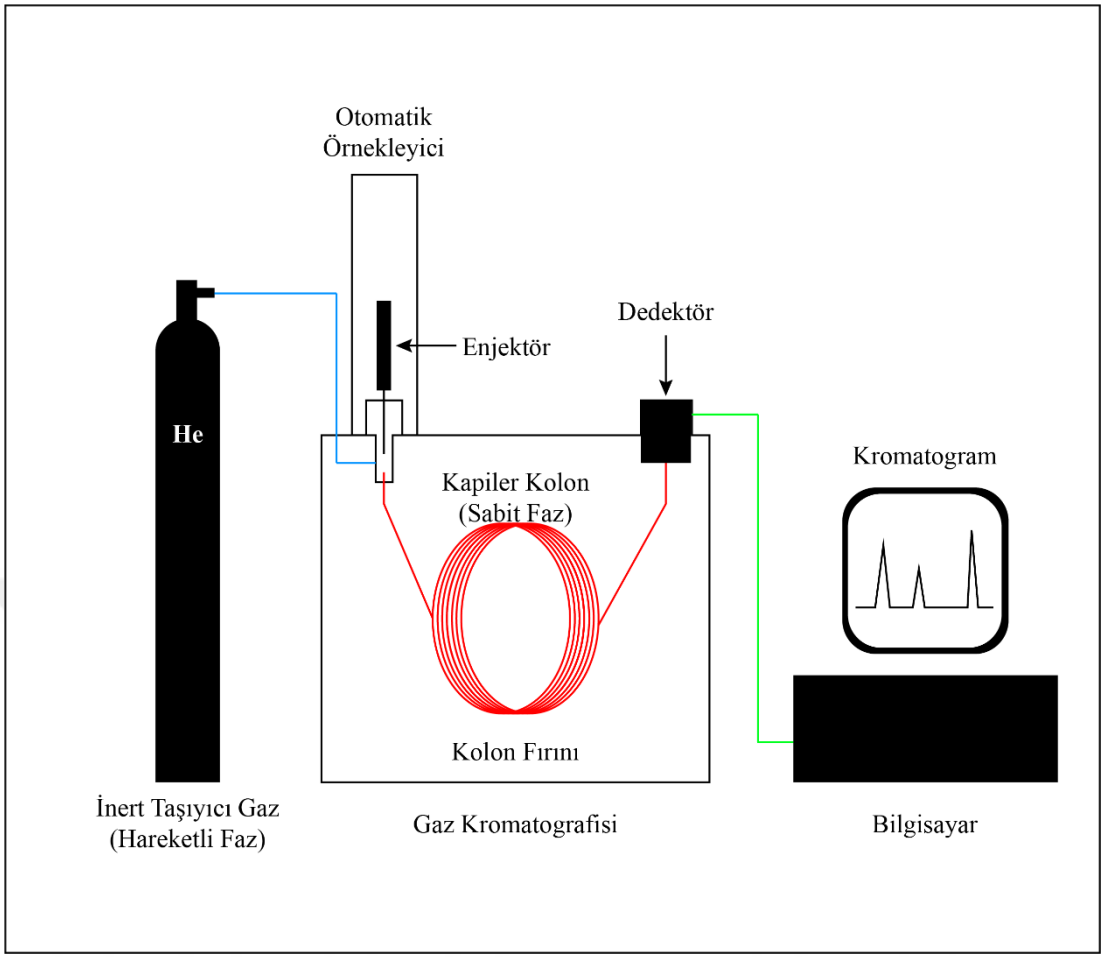
Yenidoğan örnekleri		
Kordon kanı	Bol miktarda örnek Pek çok biyobelirteci barındırır	Toplamak için kısıtlı süre Tek bir zamanı yansıtır Tıbbi değeri olan örnek Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Plasenta	Bol miktarda örnek Atılan örnek	Toplamak için kısıtlı süre
Göbek bağı	Bol miktarda örnek Atılan örnek†	Toplamak için kısıtlı süre Aile tarafından verilmeyebilir†
Amniyotik sıvı	Bol miktarda örnek Atılan örnek	Toplanması zordur Toplamak için kısıtlı süre
İdrar	Metabolitleri barındırır Atılan örnek	Toplanması zordur Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Saç	Maruz kalma zamanını işaret edebilir	Her yenidoğanda bulunmayabilir Aile tarafından verilmeyebilir
Nefes	Toplanması kolaydır	Özel ekipman gerektirir Bu alandaki teknoloji kısıtlıdır Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Salya	Toplanması kolaydır	Örnek miktarı kısıtlıdır Geriye dönük kısıtlı bilgi verir
Transdermal	Toplanması kolaydır	Özel ekipman gerektirir Bu alandaki teknoloji kısıtlıdır
Mekonyum	Toplanması kolaydır Maruz kalma zamanını işaret edebilir Atılan örnek	12/14. hafta ve sonrasını yansıtır

1.3. Gaz Kromatografisi

Ayırma işlemi, bir kimyasal madde karışımını iki veya daha fazla farklı ürün karışımına dönüştüren bir yöntemdir. Bazen ayırma işlemi bir maddeyi saflaştırmak veya zenginleştirmek için yapılabilir. Ayırma işlemi için maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin farklılıklarından faydalanılır. Günümüzde bunun için en sık kullanılan yöntem kromatografidir.

Kromatografi yöntemi, bir karışımın sabit faz adı verilen bir malzeme içerisinden hareketli faz denilen akışkan bir madde (sıvı veya gaz) yardımıyla geçirilerek ayrıştırılması yöntemidir. Bu yöntemde, karışım içerisindeki farklı maddelerin sabit faza olan ilgisinin birbirinden farklı olması nedeniyle moleküllerin sabit faz üzerinde farklı sürelerle tutulmaları ve dolayısıyla birbirlerinden ayrılmaları sağlanır. Kromatografinin pek çok çeşidi olmasına karşın hareketli fazın çeşidine göre sıvı ve gaz kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Her iki tekniğin de uygulama alanına göre birbirinden üstün olduğu durumlar mevcuttur.

Modern gaz kromatografisi (GK) 1952 yılında Martin ve James tarafından icat edilmiştir (James ve Martin, 1952). Ortaya çıkışından sonra, özellikle kolon ve detektör teknolojisinin gelişmesiyle, hızla modern kimyanın en önemli ve oldukça geniş bir alanda kullanılan bir analitik yöntemi olmuştur. GK, özellikle petrokimya ve ilaç endüstrileri başta olmak üzere birçok endüstride, çevre ve gıda analizlerinde ve adli bilimlerde, altın standart bir analitik yöntem haline gelmiştir (Bartle ve Myers, 2002).



Şekil 1.4. Gaz kromatografisinin şeması.

Gaz kromatografisi temel olarak bir enjektör, kapiler kolon, kolon fırını ve detektörden oluşmaktadır (Şekil 1.4.). Bu teknik ile analiz edilecek örneklerin uçucu ya da yarı uçucu olması gerekmektedir. Termal kararlılıklarına ve kromatografik davranışlarına bağlı olarak hedef analitlerin örnek hazırlığı sırasında türevlenmesi gerekebilir.

Gaz kromatografisinde analitlerin ayırımını etkileyen bazı parametreler mevcuttur. Bunlar buhar basıncı, bileşiklerin ve sabit fazın polaritesi, kolon sıcaklığı, hareketli fazın (taşıyıcı gazın) akış hızı, kolon uzunluğu ve enjekte edilen örnek miktarıdır.

Buhar basıncı: Bir bileşiğin kaynama noktası çoğunlukla polaritesiyle ilişkilidir. Kaynama noktasının düşük olması, buhar basıncının yüksek olacağı anlamına gelmektedir ve bu durum maddenin çoğunlukla gaz fazında kalmasına sebep olacağı için alıkonma süresinin kısa olması anlamına gelmektedir.

Bileşiğin ve kolonun polaritesi: Eğer sabit faz ile analiz edilen bileşiğin polaritesi birbirlerine yakın ise bileşik sabit faz ile daha güçlü bir etkileşim kuracaktır. Dolayısıyla alıkonma süresi uzayacaktır.

Kolon sıcaklığı: Aşırı yüksek kolon sıcaklığı, bileşiklerin çoğunlukla gaz fazında kalmasına sebep olacağı için alıkonma süresi kısalır ve zayıf bir ayırıma neden olabilir. Başarılı bir ayırımın gerçekleşmesi için bileşiklerin sabit faz ile yeterince etkileşime girmesi gerekmektedir.

Taşıyıcı gazın akış hızı: Yüksek akış hızı gaz fazındaki maddeleri hızlı bir şekilde iteceği için alıkonma süresi kısalır ve zayıf bir ayırıma neden olabilir.

Kolon uzunluğu: Uzun kolonlar genellikle ayırımın artmasını sağlarlar. Bununla birlikte kolonun uzamasıyla doğru orantılı olarak bileşiğin kolon içerindeki difüzyonu artar ve pik şekillerinin genişlemesine sebep olur.

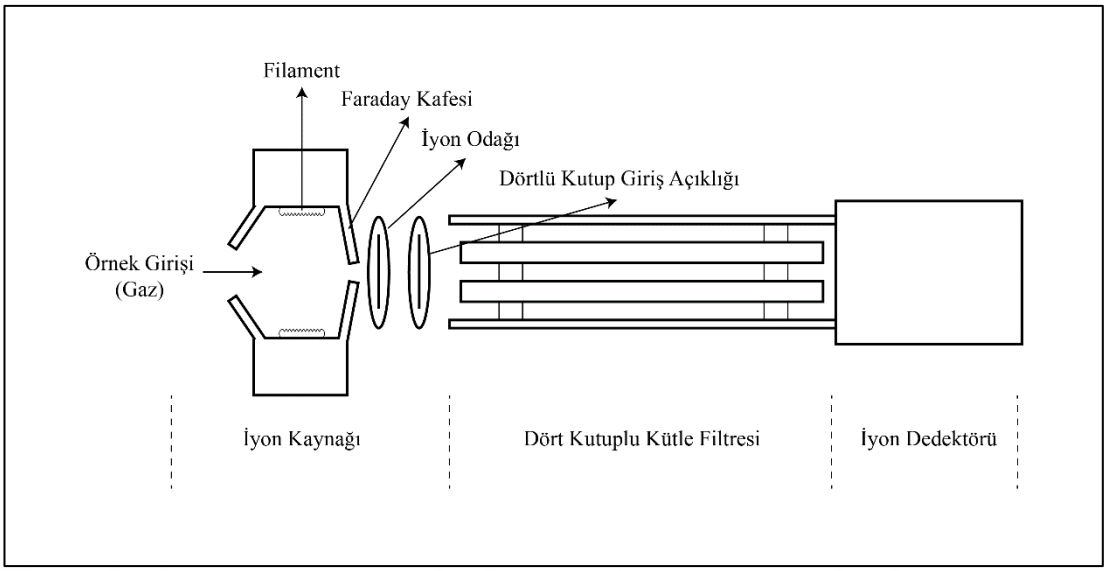
Enjekte edilen örnek miktarı: Kromatogramdaki pik şekilleri ideal koşullarda simetrik olmalıdır (Gauss eğrisi). Çok fazla miktarda örnek enjekte edildiğinde kromatogramdaki piklerde kayda değer miktarda kuyruk oluşumu gözlenebilir ve bu da zayıf bir ayırıma sebep olur.

1.4. Kütle Spektrometresi

Gaz kromatografisinde kullanılan pek çok dedektör bulunmakla birlikte en sık kullanılan dedektörler; kütle seçici dedektör (kütle spektrometresi), alev iyonizasyon dedektörü ve elektron yakalama dedektörüdür.

Kütle spektrometrisi (KS), iyonların kütle/yük (m/z) oranını ölçen bir tekniktir. Geniş bir uygulama alanına sahip olan bu yöntem, saf örneklere uygulanabildiği gibi karmaşık örneklere de uygulanabilmektedir. Analiz sırasında ölçülen m/z oranı kütle spektrumu olarak görsel haline getirilir. Bu spektrumlar, partiküllerin ve moleküllerin kütlelerini belirlemek ve moleküllerin ve diğer kimyasal bileşiklerin kimyasal kimliğini veya yapısını aydınlatmak için kullanılır.

Tipik bir KS prosedüründe, katı, sıvı veya gaz halindeki numuneler, elektron bombardımanı ile iyonize edilir. Bunun sonucunda örneğin bazı moleküllerinin yüklü iyonlara ayrılmasına veya parçalanmadan sadece yüklü hale gelmesine neden olabilir. Bu iyonlar (parçalar) daha sonra m/z oranlarına göre, bir elektrik veya manyetik alana tabi tutulurlar ve aynı m/z oranına sahip iyonlar aynı miktarda sapmaya uğrayacakları için ayrılırlar. .İyonlar, elektron çoğaltıcı gibi yüklü parçacıkları algılayabilen bir mekanizma tarafından algılanır. Sonuçlar, m/z oranının bir fonksiyonu olarak tespit edilen iyonların sinyal yoğunluğunun spektrumları olarak grafik haline getirilir. Numunedeki atomlar veya moleküller, bilinen kütleler ve tanımlanan kütlelerle ilişkilendirilerek veya karakteristik bir parçalanma modelleri tahmin edilerek tanımlanabilir.



Şekil 1.5. Dört kutuplu kütle seçici dedektörün şeması.

1.5. Örnek Hazırlama

Analitik kimyada bir örneğin analizinden önce, numuneyi analize hazırlamak için gerçekleştirilen, çözme, özütleme, filtreleme, türevleme, deriştirme veya seyreltme gibi işlemlere örnek hazırlama denir. Bu işlemler örnek içerisinde aranan bileşiğin daha doğru bir şekilde analizini sağlamak ve yeterli hassasiyete ulaşabilmek için önemlidir.

1.5.1. Protein Çöktürme

Protein çöktürme, biyolojik örneklerde sıklıkla kullanılan, eklenen reaktifin çözünen maddenin çözünürlüğü azaltarak çözücüden uzaklaştırılması prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde reaktif olarak sıklıkla amonyum sülfat

($(NH_4)_2SO_4$), sodyum klorür (NaCl) gibi çeşitli tuzlar ve su ile karışabilen metanol, asetonitril, aseton gibi çözücüler kullanılmaktadır.

1.5.2. Sıvı-sıvı Özütleme

Sıvı-sıvı özütleme, karışmayan veya sadece kısmen karışabilen iki çözücü arasında (sulu faz ve organik faz) belirli bileşiklerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözücüler arası yer değiştirmesi prensibiyle çalışan bir özütleme yöntemidir. Bu yöntemin asit-baz özütlemesi, sıvı-sıvı mikroözütleme, dipersiv sıvı-sıvı mikroözütleme gibi pek çok farklı kullanımı mevcuttur.

Sıvı-sıvı özütlemede iki temel teori bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Nernst'in dağılma yasasına göre bir maddenin birbiri ile karışmayan iki sıvı arasında dağılması sırasında sabit bir sıcaklıkta ve denge durumunda her iki fazdaki derişimlerinin oranı sabittir. Bu orana dağılma katsayısı (K_d) denir.

$$K_d = \frac{Organik\ Fazın\ Molaritesi}{Sulu\ Fazın\ Molaritesi}$$

Şekil 1.6. Nernst'in dağılma katsayısı denklemi.

K_d arttıkça sulu fazdan organik faza geçiş artmaktadır. Dolayısıyla sıvı-sıvı özütleme çalışmalarında birden fazla organik çözücü denenerek maddelerin hangi organik çözücüye daha fazla ilgi gösterdiği tespit edilmelidir.

İkinci teori ise Henderson-Hasselbalch eşitliğidir. Özellikle asidik veya bazik özellik gösteren bileşiklerin özütlenmesinde bu eşitlik önem kazanmaktadır. pKa, bir

kimyasal molekülün bir proton bağışlaması veya kabul etmesi için ortam pH'nin ne olması gerektiğini gösterir.

$$\text{pH} = pKa + log\left(\frac{[konjuge\ baz]}{[zayıf\ asit]}\right)$$

Şekil 1.7. Henderson-Hasselbalch eşitliği.

Asidik bir maddenin;

- Sulu fazda kalması isteniyorsa bazik ortamda çalışılmalıdır.
- Organik faza geçmesi isteniyorsa nötr halde bulunduğu asidik ortamda çalışılmalıdır.

Bazik bir maddenin;

- Sulu fazda kalması için asidik ortamda çalışılmalıdır.
- Organik faza geçmesi isteniyorsa nötr halde bulunduğu bazik ortamda çalışılmalıdır.

Sonuç olarak;

- Zayıf asitler asidik ortamda nötrdür, organik çözücü ile özütlenebilir.
- Zayıf bazlar bazik ortamda nötrdür, organik çözücü ile özütlenebilir.

1.5.3. Türevleme

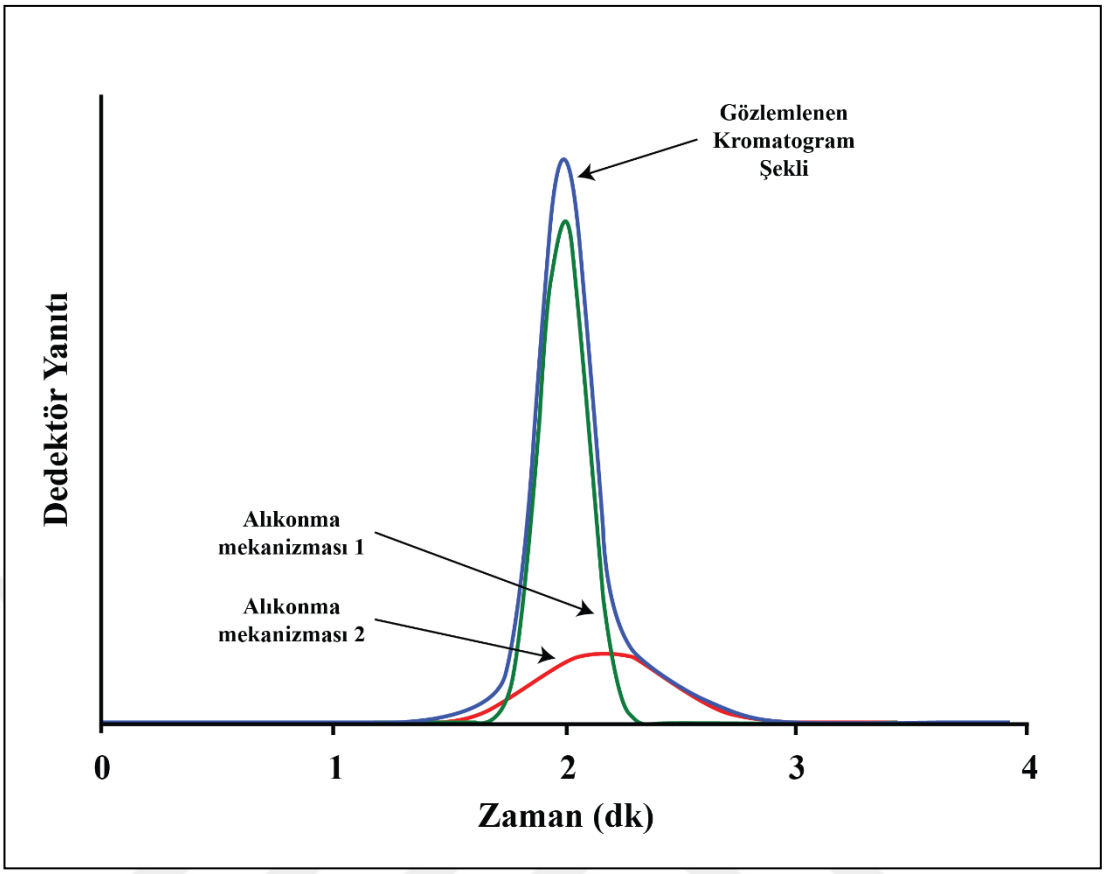
Türevleme, daha iyi bir ayırım ve yöntem hassasiyetini arttırmak için analit üzerinde yapılan değişikliklerdir. Türevleme özellikle GK/KS tekniği kullanılırken, bileşiklerin tespit ve tayin kapasitesini arttırabilmektedir.

Türevleme işleminin başlıca amaçları analitin polaritesini azaltmak, kararlılığını arttırmak ve gaz kromatografisindeki cevabını daha iyi hale getirmektir.

Bileşiğin GK'nin enjeksiyon portunda yüksek sıcaklıkta kararlılığını kaybettiği durumlarda, türevlendirme işlemi bileşiğin kararlılığını arttırabilmektedir. Bunu iki yolla elde edilebilir: birincisi türetilmiş bileşik daha kararlı bir yapıdadır ve ikincisi türetilmiş bileşik daha uçucudur ve enjeksiyon portunun sıcaklığı düşürülebilir.

Bununla birlikte aktif hidrojenin değiştirilmesi ve hidrojen bağının ortadan kaldırılması ile analitin polaritesinde yapılan değişiklik analitin kolondaki ayılma karakteristiğini de değiştirecektir. Dipol momentinin azaltılarak polaritenin düşürülmesi bileşiğin alıkonma karakteri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Dolayısıyla ayırılamayan iki analit veya girişim (interferans) türevleme sayesinde birbirlerinden ayrılabilir.

Kromatografik bir pikin ideal şekli Gauss eğrisi şeklindedir. Bununla birlikte, kromatografik piklerin bu şekilden sapmalar göstermesi de nadir bir durum değildir. Bu sapma, pik asimetrisi (As) ve kuyruklanma faktörü (T_f) ile karakterize edilir. Gauss eğrisinden sapmanın farklı nedenleri vardır. Bu sapmanın yaygın nedenlerden biri, hedef moleküldeki, farklı mekanizmalar yoluyla kromatografik kolon ile etkileşime girebilen aktif hidrojenlerin varlığıdır. Şekil 1.6.' da bu etkileşimler sonucu oluşan pikler görselleştirilmiştir.



Şekil 1.8. Aynı maddenin farklı alıkonma mekanizmaları sonucunda oluşan iki farklı Gauss pikinin birleşimi ile meydana gelen güçlü bir kuyruklanma örneği (S. Moldoveanu ve David, 2015'den düzenlenerek alıntılanmıştır).

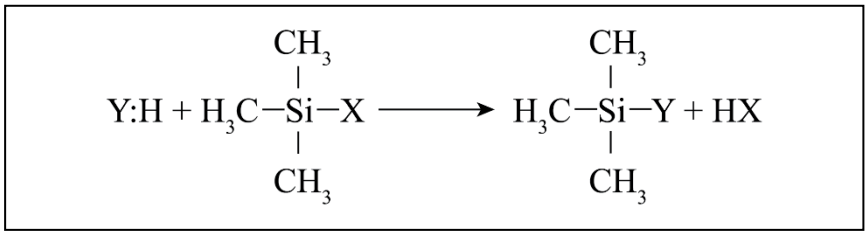
Analitik uygulamalar esnasında sililleme, alkilleme ve açilleme (asilleme) başta olmak üzere birden fazla türevleme yöntemi uygulanmaktadır. Çizelge 1.5.'de aktif hidrojen atomu içeren bileşikler için bir türevleme ajanı seçimine yönelik seçeneklerin basitleştirilmiş bir özeti verilmiştir (Moldoveanu S ve David, 2015b, 2015a).

Çizelge 1.5. Aktif hidrojen atomu içeren bileşikleri türevleme seçenekleri.

Özellik	Artan asidik karakter → / Artan nükleofilik karakter ←				
Bileşik	**Amin**	**Amid**	**Alkol**	**Fenol**	**Asit**
Öncelikli Türevleme Tercihi	Açilleme	Açilleme	Sililleme	Sililleme	Alkilleme
Alternatif Türevleme Tercihi	Alkilleme	Alkilleme	Alkilleme	Alkilleme	Sililleme

Çalışmaya dahil edilen analitlerin kimyasal yapılarını incelediğimizde tamamının türevlenmesi için sililleme yönteminin uygun olduğunu görülmüş ve ayrıca yaptığımız literatür taraması hem fitalat metabolitleri (Kondo ve ark., 2010; Kim ve ark., 2014; Ait Bamai ve ark., 2015; Fernandez ve ark., 2017) hem de bisfenoller (Li D ve ark., 2001; Kuo ve Ding, 2004; Chang ve ark., 2005; Viñas ve ark., 2010; Fernandez ve ark., 2017; Pérez ve ark., 2017; Caban ve Stepnowski, 2020) için bunu destekleyen sonuçlar vermiştir.

Sililleme, protik bölgeleri bloke ederek ve böylece dipol-dipol etkileşimlerini azaltıp, uçuculuğu artırarak GK performansını artırmak için kullanılan mevcut en esnek yöntemdir (Blau ve Halket, 1993). Reaksiyon OH, COOH, SH, NH, NH_2 CONH, POH, BOH, NOH ve SOH gruplarındaki aktif hidrojen atomunun bir silil grubu ile yer değiştirmesiyle gerçekleşir (Blau ve Halket, 1993; Moldoveanu S ve David, 2018). Bu işlem çoğunlukla trimetilsil (TMS) yardımıyla gerçekleştirilir. Oldukça fazla sayıda molekül grubuna bu yöntemle türevleme işlemi yapılabilmektedir. Bunlardan bazıları; karbonhidratlar (Sweeley ve ark., 1963), fenoller (Moldoveanu SC ve Kiser, 2007), aminler (Kataoka, 1996), sterollerdir (Wells ve Makita, 1962). Şekil 1.9.'da verilen reaksiyonda TMS (73.191 akb) ile gerçekleştirilen sililleme işleminin genel formülü görülmektedir.



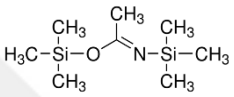
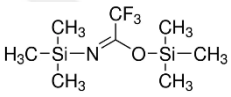
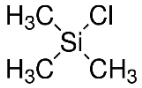
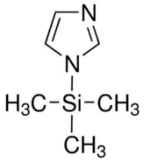
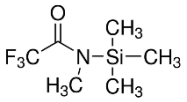
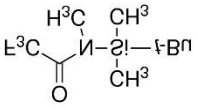
Şekil 1.9. Genel sililleme reaksiyonu.

Bütün sililleme reaktiflerinin ve türevlerinin, nemin hidrolitik etkilerine karşı hassas olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (Blau ve Halket, 1993). Dolayısıyla reaksiyonlar tercihen teflon kapaklı viallerde gerçekleştirilmelidir. Özellikle iz analizi yapıldığı durumlarda bu viallerin kullan-at olması analizin doğruluğu açısından önem taşımaktadır. Sililleme ajanının pek çok durumda yeterli bir çözücü olmasına karşın

bazı durumlarda analitlerin seyreltilmesi ve reaksiyona uygun ortam oluşturulması için ekstra çözücüye ihtiyaç duyulabilir. Katalitik özelliklerinden ötürü piridin bu görev için uygundur. Piridin haricinde sıklıkla kullanılan çözücüler; dimetilformamid, dimetil sülfoksid, tetrahidrofuran ve asetonitrildir.

TMS grubu ile sililleme işleminin gerçekleştirilmesi için ticari olarak pek çok sililleme reaktifi satılmaktadır. Bunlardan bazıları Çizelge 1.6.'da tablo haline getirilmiştir. Uygulamaya göre her türevleme reaktifinin farklı avantajları olmasına karşın en sık kullanılan türevleme reaktifi BSTFA'dır. Reaksiyonun etkinliğinin arttırılması için bazı reaktifler belirli oranlarda karıştırılarak kullanılabilmektedirler.

Çizelge 1.6. Türevleme için kullanılan bazı sililleme reaktifleri.

Türevleme Reaktifi	Adı	Kütlesi	Molekül Yapısı
BSA	N,O-Bis(trimetilsil)asetamid	203.43	
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsil)trifloroasetamid	257.4	
TMCS	Trimetilklorosilan	108.64	
TMSI	N-Trimetilsililimidazol	140.26	
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsil)trifloroasetamid	199.25	
MTBSTFA	N-tert-Butildimetilsilil-Nmetiltrifloroasetamid	241.33	

1.6. Validasyon

Validasyon işlemi, geliştirilen bir analitik yöntemin kesinliğinin, güvenilirliğinin ve belirli örnek ve koşullara uygunluğunun gösterilmesi için gerçekleştirilen bir prosedürdür. Bu prosedür belirli parametreler üzerinden değerlendirilir. Bu parametreler ve yeterlilik kriterleri Uluslararası Uyum Konseyi (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu (US FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi kurumlar ve organizasyonlar tarafından belirlenmektedirler. ICH tarafından benimsenen parametreler Çizelge 1.7.'de tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 1.7. ICH tarafından yayınlanan validasyon parametreleri.

Validasyon Parametreleri	Açıklaması
Doğruluk	Bir analitik yöntemin doğruluğu, kabul edilen referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder.
Kesinlik	Analitik bir prosedürün kesinliği, aynı homojen numunenin öngörülen koşullar altında çoklu örneklenmesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlığı (dağılım derecesi) ifade eder.
Seçicilik	Özgüllük, mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneğidir. Bunlar tipik olarak, safsızlıkları, bozunma ürünlerini, matrisi vb. içerebilir.
Tespit Limiti	Bir analitik prosedürün tespit limiti, bir numunedeki tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak tayin gerekmeyen en düşük analit miktarıdır.
Tayin Limiti	Bir analitik prosedürün kantitasyon limiti, yeterli kesinlik ve doğrulukla bir numunedeki tayin edilebilen en düşük analit miktarıdır.
Doğrusallık	Bir analitik prosedürün doğrusallığı, belirli bir aralık içerisinde numunedeki analitin derişimi ile doğru orantılı olan sonuçları elde etme yeteneğidir.
Tespit Aralığı	Bir analitik prosedürün aralığı, analitik prosedürün uygun bir kesinlik, doğruluk ve doğrusallık seviyesine sahip olduğu gösterilen numunedeki analitin üst ve alt derişimi arasındaki aralıktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Özütleme çalışması sırasında organik çözücü olarak Metanol, Asetonitril, Aseton, Metil tert-bütil eter, Dietil eter, Diklorometan, Etil asetat kullanılmıştır. Asit baz özütlemesi sırasında pH ayarlamaları için sodyum hidroksit ve hidroklorik asit tercih edilmiştir.

Analitik referans standart olarak Triklosan, Bisfenol A, Bisfenol AF, Bisfenol F, Bisfenol S, mono metil fitalat, mono etil fitalat, mono bütil fitalat, mono etilhekzil fitalat, mono benzil fitalat ve iç standart olarak döteryumlu Bisfenol A (BPA-d16) temin edilmiştir.

Örnekleri türevleme işlemi için BSTFA %1 TMCS, BSTFA, MSTFA %1 TMCS, MSA, MTBSTFA kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların tam listesi Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar listesi.

Kimyasalın Adı	**Markası**
Metanol (Analitik Kalite)	Sigma Aldrich
Asetonitril (Kromatografik Kalite)	Merck
Aseton (Kromatografik Kalite)	Merck
Sonyum Klorür	Merck
Amonyum Sülfat	Merck
Çinko Sülfat	Merck
Metil tert-bütil eter (HPLC Kalite)	Sigma Aldrich
Dietil eter (Analitik Kalite)	Riedel-de Haen

Çizelge 2.1 (Devam) Çalışmada kullanılan kimyasallar listesi.

Kimyasalın Adı	Markası
Etil asetat (HPLC Kalite)	LAB-SCAN Analytical Sience
Diklorometan (Analitik Kalite)	Sigma Aldrich
Hekzan (HPLC Kalite)	Sigma Aldrich
Piridin (Analitik Kalite)	Merck
Sodyum Hidroksit (Analitik Kalite)	Riedel-de Haen
MSTFA %1 TMCS	Thermo Scientific
MTBSTFA	Sigma Aldrich
MSA	AppliChem
Bisfenol A	AccuStandard
Bisfenol AF	AccuStandard
Bisfenol F	AccuStandard
Bisfenol S	AccuStandard
Bisfenol A-d16	AccuStandard
Triklosan	AccuStandard
mono metil fitalat	AccuStandard
mono etil fitalat	AccuStandard
mono bütil fitalat	AccuStandard
mono etilhekzil fitalat	AccuStandard
mono benzil fitalat	AccuStandard

2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihazların tam listesi Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar listesi.

Cihazın Adı	Markası
pH Metre	Mettler Toledo Seven Multi
Hassas Terazi	Mettler Toledo XS204 Delta Range
Ultra Derin Dondurucu	Panasonic MDF U5386S
Vorteks Karıştırıcı	Biosan Multi Vortex V-32
Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	Mirak Thermolyne
Santrifüj	Heraeus Labofuge 200

Çizelge 2.2. (Devam) Çalışmada kullanılan cihazlar listesi.

Cihazın Adı	Markası
Saf Su Cihazı	Nüve ND8
Gaz Kromatografi Cihazı	Agilent 6890 Plus
Dedektör	Agilent MSD 5973N
Otomatik Örnekleyici	Agilent 7683B
Ultra Saf Su Cihazı	Human Up 900 Scholar-UV
Azotlu Uçurucu/Termoblok	Techne DB-3
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex TK 100H
Homojenizatör	İKA
Otomatik Pipet (2 – 20 µL)	Brand
Otomatik Pipet (20 – 200 µL)	Brand
Otomatik Pipet (100 – 1000 µL)	Brand

2.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf malzemelerin tam listesi Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Sarf Adı	Markası
Otomatik Örnekleyici Enjeksiyon Şırıngası	Agilent
GK Kolonu ((5%-fenil)-metilpolisiloksan)	RESTEK
GK Inlet Liner	RESTEK
2 mL N9 Kromatografi Viali	ISOLAB
2 mL N9 Kromatografi Vial Kapağı	ISOLAB
150 µL Yaylı Insert	ISOLAB
75x12 mm Cam Deney Tüpü	SUBER Cam
Deney Tüpü Kapağı	ISOLAB
3 mL Pastör Pipeti	SUBER Cam
200 µL Otomatik Pipet Ucu	Jet Biofil
1000 µL Otomatik Pipet Ucu	Jet Biofil
pH Test Strip	Macherey-Nagel
Sızdırmazlık Filmi	Parafilm

2.4. Çalışmada Kullanılan Yazılımlar

Örneklerin analizi sırasında Agilent 6890 GK'nin ve Agilent 5973N KSD'nün kullanılabilmesi için "MassHunter GC/MS Acquisition" yazılımı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin nitel analizi için "MassHunter Qualitative Analysis (B.07.00)", nicel analizi için ise "MassHunter MS Quantitative Analysis (B.07.00)" yazılımı kullanılmıştır. Nitel analizler sırasında alınan sonuçları doğrulamak için "National Institute of Standards and Technology (NIST, 2014) Mass Spectral" kütüphanesi referans alınmıştır. Ayrıca kalibrasyon eğrileri "Microsoft Excel 365" yardımıyla çizilmiş ve yine aynı yazılım ile ANOVA ve regresyon analizleri yapılmıştır.

2.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik referans standartların, iç standartın, sodyum hidroksitin (NaOH) ve hidroklorik asitin (HCl) stokları çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır ve günlük olarak seyreltilmiştir. Standartların bozunmalarının takibi için her gün saf örnek GK/KS ile analiz edilmiştir. Çizelge 2.4., Çizelge 2.5. ve Çizelge 2.6.'da ana ve ara stokların nasıl hazırlandığı detaylıca açıklanmıştır.

Çizelge 2.4. Analitik referans standartların hazırlanması.

Analitik Referans Standartların Hazırlanması	
Ana Stoklar (1 mg/mL)	Hassas terazide, cam tartım küveti kullanılarak her bir analitik standarttan 10 mg tartılmıştır. Maddeler 10 mL balon jojelere MeOH ile yıkanarak aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.
Ana Karışım Stoğu (10 µg/mL)	Her bir ana stoklardan 100 µL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.
I. Ara Stok (1 µg/mL)	Ana Karışım Stoğundan 1 mL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.

Çizelge 2.4. (Devam) Analitik referans standartların hazırlanması.

Analitik Referans Standartların Hazırlanması	
II. Ara Stok (0.1 µg/mL)	I. Ara Stoktan 1 mL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.
III. Ara Stok (0.01 µg/mL)	II. Ara Stoktan 1 mL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.

Çizelge 2.5. İç standardın (İS) hazırlanması.

İç Standardın Hazırlanması	
Ana Stok (1 mg/mL)	10 mg olarak satın alınan iç standart (BPA-d16) kendi şişesi içerisinde 3 kez 3 mL MeOH ile yıkanarak 10 mL balon jojeye aktarılmıştır ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.
I. Ara Stok (10 µg/mL)	Ana Karışım Stoğundan 100 µL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.
II. Ara Stok (0.5 µg/mL)	I. Ara Stoktan 500 µL pipetlenerek yeni bir 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 10 mL çizgisine kadar MeOH eklenmiştir.

Çizelge 2.6. NaOH ve HCl çözeltilerin hazırlanması.

Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	
0.3 Molar NaOH Çözeltisi	Hassas terazide 1,26 gr NaOH tartıldıktan sonra 100 mL cam şişeye aktarılmıştır. Daha sonra 100 mL çizgisine kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır ve çözülmesi için ultrasonik banyoda bir süre bekletilmiştir.
0.5 Molar HCl Çözeltisi	İçerisinde bir miktar ultra saf su bulunan 100 mL cam şişeye, 12 Molar (%37'lik) HCl stoğundan 4.17 mL pipetlenerek aktarılmıştır. Daha sonra 100 mL çizgisine kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır ve bir süre vortekslenmiştir.

Analitik referans standartların ve iç standartın ana ve ara stokları kullanım sonrasında -20 °C'ta saklanmıştır.

2.6. Mekonyum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Mekonyum örnekleri Ankara Üniversitesi Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı doğum ünitesinde dünyaya gelen yeni doğanlardan, Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (EK-1) ve Anabilim Dalı'nın (EK-2, EK-3) izniyle toplanmıştır.

Çalışmaya normal doğum (NSD) veya sezaryen (SCA) ile ve zamanında komplikasyonsuz olarak dünyaya gelen, konjenital anomalisi olmayan ve ilk 48 saatte herhangi bir nedenden hastaneye yatışı gerçekleşmemiş olan ebeveynlerinin onay verdiği (EK-4) 100 farklı yeni doğan dahil edilmiştir.

Kontaminasyonu en aza indirgemek için mekonyum örnekleri yeni doğanların ölçümlerinin yapıldığı esnada mekonyum çıkışı olan bebeklerden, 50 mL'lik polipropilen tüplere, abeslang yardımıyla aktarılmıştır.

Toplanan örnekler kısa süre içerisinde -20 °C derin dondurucuya kaldırılmış daha sonra analiz edilene kadar -80 °C'ta saklanmıştır.

2.7. En Uygun Kromatografik Yöntemin Geliştirilmesi

Çalışmanın yapılabilmesi ve özütleme yönteminin geliştirilmesi için öncelikli olarak analizin gerçekleştirileceği kromatografik yöntemin geliştirilmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak temin edilmiş olan analitik referans standartları ön ayarlı olarak mevcut olan GK yöntemi ile tek tek enjekte

edilerek maddelerin alıkonma süreleri tespit edilmiştir. Alıkonma sürelerinin tespiti sırasında kütle dedektörü tarama yöntemiyle çalıştırılmış ve maddelerin tam spektrumu taranmıştır.

Kromatogramda görüntülenen referans standartlara ait pikler ve spektrumlar NIST 2014 kütle kütüphanesinde doğrulandıktan sonra, seçici iyon gözlem yöntemiyle gerçekleştirilecek optimizasyon için spektrumdan aday parçalanma iyonları belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda maddelerin çözünürlüğü, ayrım gücü, pik şekilleri ile birlikte analiz süresi de göz önünde bulundurularak GK üzerinde optimizasyon işlemi tamamlanmıştır. Optimizasyon işlemi sırasında inlet sıcaklığı, transfer köprüsü sıcaklığı, fırın sıcaklığı ve gaz akış hızı üzerinde değişiklikler yapılarak farklı kombinasyonlar denenmiştir.

2.8. En Uygun Örnek Hazırlama Yönteminin Geliştirilmesi

Örneğin kompleks yapısı sebebiyle özütleme işlemi birkaç farklı teknikle farklı kimyasallar aracılığıyla gerçekleştirilmiş ve bu sırada farklı kimyasal kombinasyonları denenmiştir. Protein çöktürme ve sıvı-sıvı özütleme, asit baz özütlemesi denenmiştir.

2.8.1. Protein Çöktürme

Protein çöktürme işlemi için aseton, asetonitril ve metanolün yanı sıra amonyum sülfat, çinko sülfat ve sodyum klorür gibi tuzlar çöktürme için denenmiştir.

Tuzla çöktürme işlemi için mekonyum örnekleri 4 kat hacimde asetat tamponu ile homojenize edilmiş ve değişen miktarlarda (50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg) tuz eklenerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sulu faz yeni bir tüpe aktarılarak organik faz ile özütleme gerçekleştirilmiştir.

Aseton, asetonitril ve metanol ile yapılan çöktürme işleminde çözücüler mekonyuma doğrudan eklenerek mekonyumun hem homojen hale getirilmesi planlanmış hem de çöktürme işlemi sağlanmıştır. Bu işlem sırasında farklı hacimlerde (1:2,5, 1:5 ve 1:10 k:h) çözücü kullanılmıştır. Daha sonra organik faz yeni bir tüpe aktarılmış ve uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüpte kalan özüt tekrar sıvı sıvı özütlemede kullanılan çözücüler ile seyreltilerek HCl ve NaOH yardımıyla geri özütleme ve asit baz özütlemesi gerçekleştirilmiştir.

2.8.2. Sıvı-sıvı Özütleme

Protein çöktürme işlemi sonrasında sıvı-sıvı özütleme için hekzan (HXN), metil tert bütil eter (MTBE), diklorometan (DKM), dietil eter (DEE) ve etil asetat (EA) denenmiştir. Bu çözücüler denenirken 3:1 çözücü numune oranı ile başlanmıştır. Hedeflenen bileşiklerin asidik özellik gösterdiği ve pKa değerleri bilindiği için Henderson-Hasselbalch eşitliği kullanılarak özütleme için en uygun pH değerinin 1 olduğu bulunmuştur. Martiks etkisini en aza indirmek adına geri özütleme tekniği uygulanmıştır. Özütleme sırasında geri kazanım miktarının en yüksek seviyede olması ve girişimin en aza indirgenmesi göz önünde bulundurularak çalışmalar sürdürülmüş ve optimizasyon yapılmıştır.

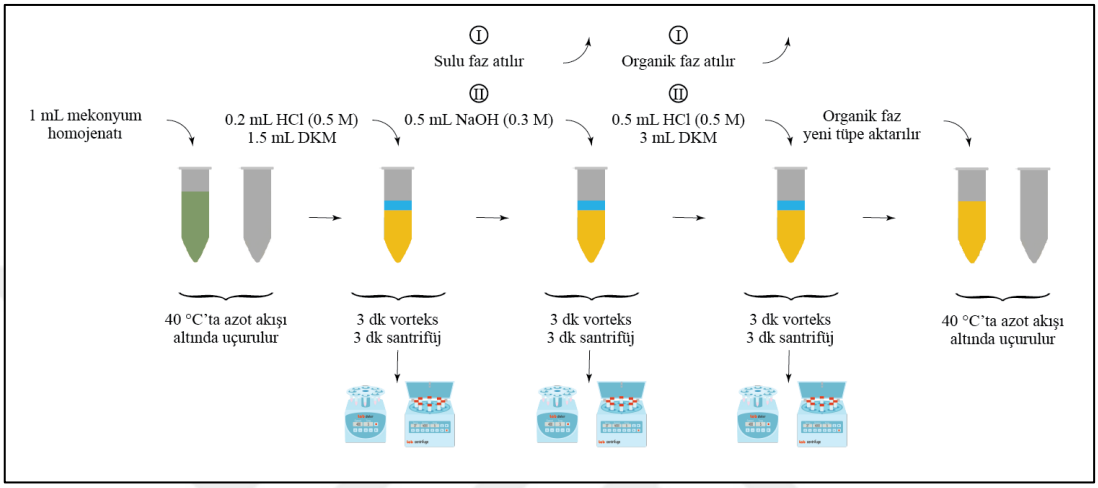
2.9. En Uygun Türevleme Yönteminin Geliştirilmesi

Analitik referans standartlar kullanılarak elimizde bulunan MSA, MSTFA, BSTFA, MSTFA-%1 TMCS ve BSTFA-%1 TMCS türevleme reaktifleri ile denemeler yapılarak en uygun türevleme reaktifi tespit edilmiştir. Bununla birlikte seçilen türevleme reaktifi ile türevleme süresi (30, 45, 60, 90 dk) ve türevleme sıcaklığı (40, 50, 60, 70, 80 °C) çalışmaları yapılmıştır.

2.10. Matriks Uyumlu Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Analizi yapılacak hedef bileşikler örneklerin doğası gereği mekonyum içerisinde bulunduğundan kalibrasyon eğrileri hazırlanırken standart ekleme (Standard addition) ve zemin çıkarma (Background subtraction) yöntemi kullanılmıştır. 100 mg mekonyum 1 mL MeOH içerisinde vorteks yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Ardından 30 dk 5200 rpm hızda santrifüjlenmiş ve üst faz yeni tüpe aktarılarak bu işlem tekrarlanmıştır. Cam tüp içerisinde gerçekleştirilen bu işlem sonrasında herhangi bir kontaminasyona neden olmamak ve madde kaybı yaşamamak için filtreleme yapılmamıştır. Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması sırasında MeOH içerisinde hazırlanmış olan 1 mL mekonyum homojenatı (~100 mg mekonyuma eş değer) üzerine standart ara stoklarından farklı hacimlerde ilave edilmiş ve her bir kalibrasyon noktasına 20 µL İS (0.5 µg/mL) eklenmiştir. Karışım 30 sn vortekslendikten sonra bir süre oda sıcaklığında dinlendirilmiş ve azotlu uçurucu üzerinde 40 °C sıcaklıkta ve hafif azot akışı altında kurutulmuştur. Daha sonra geliştirilen ve optimize edilen özütleme yöntemi ile özütlendikten sonra türevlenerek GK/KS ile analiz edilmiştir. Kurutulmuş örnekler 1.5 mL diklorometan ile tekrar seyreltilerek 30 sn daha vortekslenmiştir, 0.5 M HCl eklenerek vortekslendikten sonra 3500 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Sulu faz (üst faz) uzaklaştırıldıktan sonra 0.3 M NaOH eklenmiştir. Vortekslendikten sonra 3500 rpm hızda santrifüjlenmiştir ve sulu faz yeni tüpe

aktarılmıştır. Sulu faza 0.5 M HCl eklenerek asidik kale getirildikten sonra ikinci kez diklorometan ile özütlenmiştir. Organik faz (alt faz) kromatografi şişesine alınarak uçurulmuş ve BSTFA %1 TMCS ile 70 °C türevlenerek GK/KS ile analiz edilmiştir. Şekil 2.1.'de uygulanan yöntem görselleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Özütleme yöntemi.

Çizelge 2.7. Kalibrasyon noktaları için kullanılan derişimler ve hazırlanma hacimleri.

Kalibrasyon Noktası	Mekonyum Homojenatı (µL)[1]	Ara Stok Derişimi (µg/mL)	Eklenen Ara Stok Hacmi (µL)	Eklenen İS Hacmi (0.5 µg/mL) (µL)	Mekonyum Homojenatına Eklenen İS Miktarı (ng)	Mekonyum Homojenatına Eklenen Analit Miktarı (ng)
1	900	0.01	10	20	10	0.1
2	900	0.01	25	20	10	0.25
3	900	0.01	50	20	10	0.5
4	900	0.01	100	20	10	1
5	900	0.1	25	20	10	2.5
6	900	0.1	50	20	10	5
7	900	0.1	100	20	10	10
8	900	1	25	20	10	25
9	900	1	50	20	10	50

[1] Örnekler daha sonra MeOH ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

2.11. Geliştirilen Analitik Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen GK/KS yönteminin validasyon çalışmasında doğruluk, kesinlik, özgüllük, tespit limiti, tayin limiti, doğrusallık ve çalışma aralığı değişkenleri ICH rehberlerinde belirtilen validasyon kriterlerine göre test edilmiştir.

2.11.1. Seçicilik

Analitik strandart karışımları geliştirilen GK/KS yöntemiyle hem matriks bileşenlerinin varlığında ve hem de doğrudan tekrarlı şekilde analiz edilerek elde edilen kromatogramlar incelenmiştir. Hedef bileşiğe ait olan standardın alıkonma süresindeki değişim ve de niceleme için seçilen kütle/yük değerine diğer bileşiklerin ve de matriks elamanlarının girişimlerinin varlığı incelenerek seçicilik belirlenmiştir.

2.11.2. Doğruluk

Doğruluk, bilinen bir miktardaki analitik referans standartın matrikse eklenmesi ve geliştirilen yöntem ile analiz edilmesiyle ölçülür. Bunun için son derişimi 1.2, 2.4, 3.6 ve 7.2 ng/mL olacak şekilde 4 farklı kalite kontrol (KK) örneği hazırlanmış, analiz edilmiş ve bulunan derişimlerin, beklenen derişimlere oranı doğruluk yüzdesi (%) olarak belirlenmiştir.

$$\%Doğruluk = \frac{Bulunan\ Konsantrasyon}{Beklenen\ Konsantrasyon} x100$$

Şekil 2.2. Yüzde doğruluk denklemi.

2.11.3. Kesinlik

Kesinlik, geliştirilen yöntemin birbirinden bağımsız örneklere tekrar tekrar uygulandığında, her bir örneğin bireysel sonuçları arasındaki uyum derecesidir. Bunun için Bölüm 2.9.3.'de belirtilen, son derişimi 1.2, 2.4, 3.6 ve 7.2 ng/mL olacak şekilde hazırlanan 4 farklı kalite kontrol (KK) örneği 3 farklı gün ayrı ayrı hazırlanarak geliştirilmiş olan GK/KS yöntemiyle analiz edilmiş ve gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik bireysel sonuçların standart sapmaları (SS) ve bağıl standart sapmaları (BSS) yüzde (%) olarak belirlenmiş.

$$\%BSS = \frac{SS}{Ortalama} x100$$

Şekil 2.3. Yüzde bağıl standart sapma denklemi.

2.11.4. Doğrusallık

Hazırlanan standart karışım çözeltilerinden son derişimi 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50 ng/mL olacak şekilde matrikse eklenerek kalibrasyon örnekleri hazırlanmış ve geliştirilen GK/KS yöntemiyle analiz edilmiştir. Dedektörün bileşiklere

ait niceleme iyonlarına vermiş olduğu alanlar, İS'ye ait niceleme iyonuna vermiş olduğu alana bölünmesiyle elde edilen değerlerin derişime karşı grafik oluşturulmasıyla kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Eğrilerin doğru denklemi ve korelasyon katsayılarının hesaplamaları yapılmıştır.

2.11.5. Çalışma Aralığı

Geliştirilen yöntemin çalışma aralığı, kesinlik, doğruluk ve doğrusallıkla gösterilen üst ve alt seviyeler arasındaki aralıktır. Bu aralık, doğrusallık çalışmasının yapıldığı derişim aralığı olacaktır.

2.11.6. Tespit ve Tayin Sınırları

Tespit sınırı (LOD) terimi, cihazın algılayabildiği ancak ölçemediği en düşük derişim olarak tanımlanır ve LOD için gürültü/sinyal oranı 1:3 olmalıdır. Tayin sınırı (LOQ) terimi, cihazın algılayabildiği ve ölçebildiği en düşük derişim olarak tanımlanır. LOQ için gürültü sinyal oranı 1:10 olmalıdır.

Geliştirdiğimiz yöntemde LOD ve LOQ, eğimin (S) standart sapmasına (σ) dayalı olarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3.3\ x\ \sigma}{S}, LOQ = \frac{10\ x\ \sigma}{S}$$

Şekil 2.4. Tespit ve tayin limiti denklemi.

3. BULGULAR

3.1. En Uygun Gaz Kromatografisi Değişkenleri

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda BPF ve TRK haricindeki hedeflenen tüm maddeler başarıyla kromatografik olarak birbirlerinden ayrılmıştır. Seçilmiş iyon izleme tekniğinin BPF'ye ve TRK'a ait olan niceleyici iyonlarını ayrı ayrı izleyebilmesi sayesinde bu iki bileşik kromatografik olarak ayrılmasa da tespit ve tayinleri yapılabilmiştir. Çizelge 3.1.'de geliştirilmiş olan gaz kromatografisi yönteminin parametreleri bulunmaktadır.

Çizelge 3.1. En uygun gaz kromatografisi yönteminin değişkenleri.

Gaz Kromatografisi Parametreleri	
Kolon:	➢ Restek Rtx-5MS (%5-fenil)-metilpolisiloksan ➢ (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm)
Inlet	➢ 280˚C
Gaz Akış Hızı:	➢ 1 mL/dk (Helyum)
Fırın Sıcaklığı:	➢ 100˚C - 3 dk bekleme, ➢ 280˚C'a kadar 20˚C/dk sıcaklık artışı, ➢ 280˚C - 5 dk bekleme, ➢ Toplam analiz süresi 20 ➢ 290˚C - 5 dk analiz sonrası boşta bekleme.

3.2. En Uygun Kütle Seçici Dedektör Değişkenleri

Çizelge 3.2.'de seçilmiş iyon izleme (SIM) için kullanılan parametreler mevcuttur.

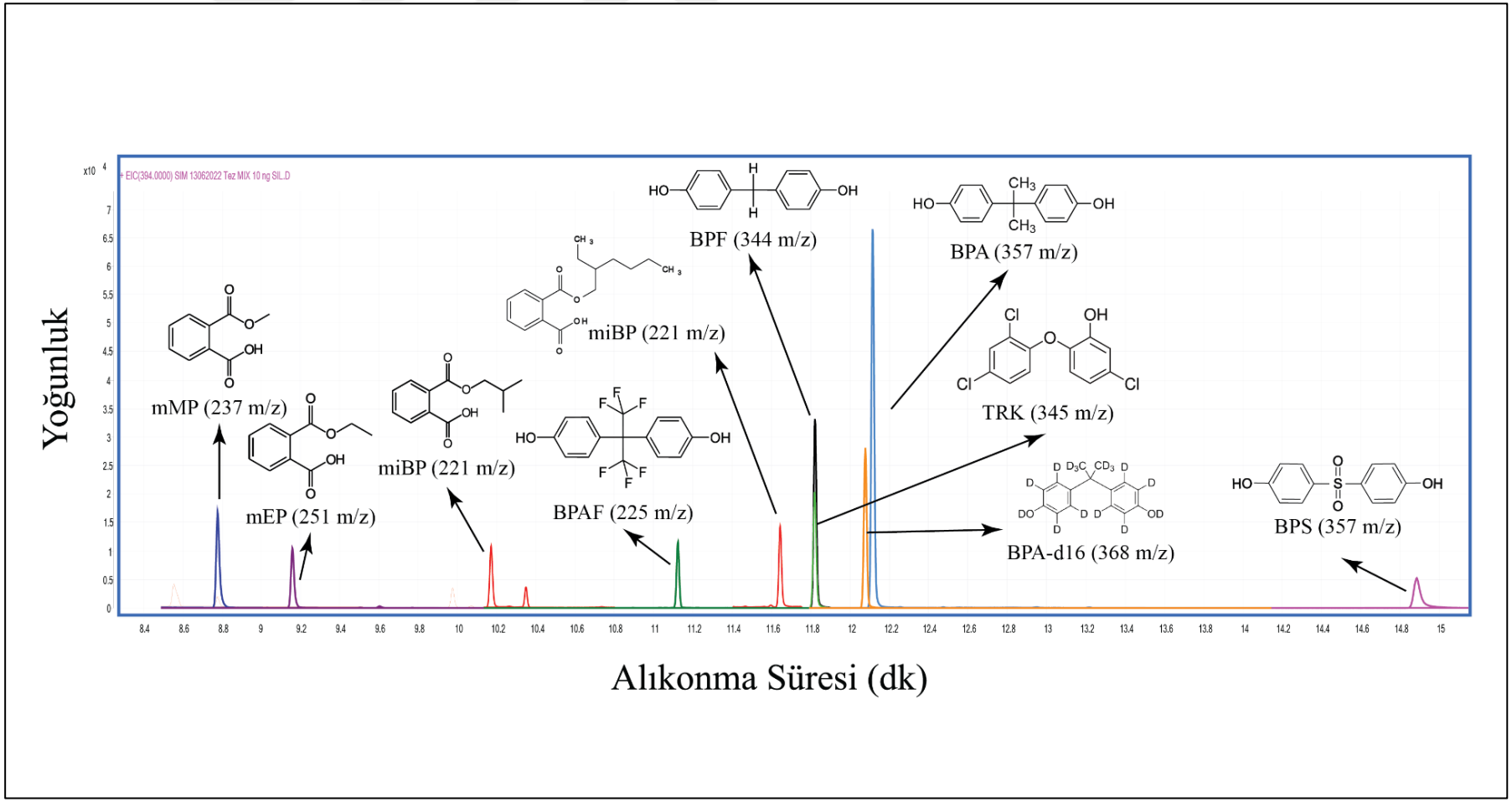
Çizelge 3.2. En uygun (SIM) parametreleri.

Bileşik	Molekül Ağırlığı	Türevli Molekül Ağırlığı	Segment	Alıkonma Süresi (dk)	Niceleme İyonu (m/z)	Niteleme İyonları (m/z)
MMP	180	252	1	8.78	237	163, 221
MEP	194	266	2	9.16	251	149, 223
MiBP	222	294	3	10.172	223	221, 149
BPAF	336	480	4	11.123	225	315, 190
MeHP	278	350	5	11.643	221	149, 239
BPF	200	344	6	11.82	344	179, 157
TRK	288	360		11.84	345	347, 362
BPA-d16	244	388	7	12.077	368	369, 386
BPA	228	372		12.114	357	207, 358
BPS	250	394	8	14.885	394	379, 135

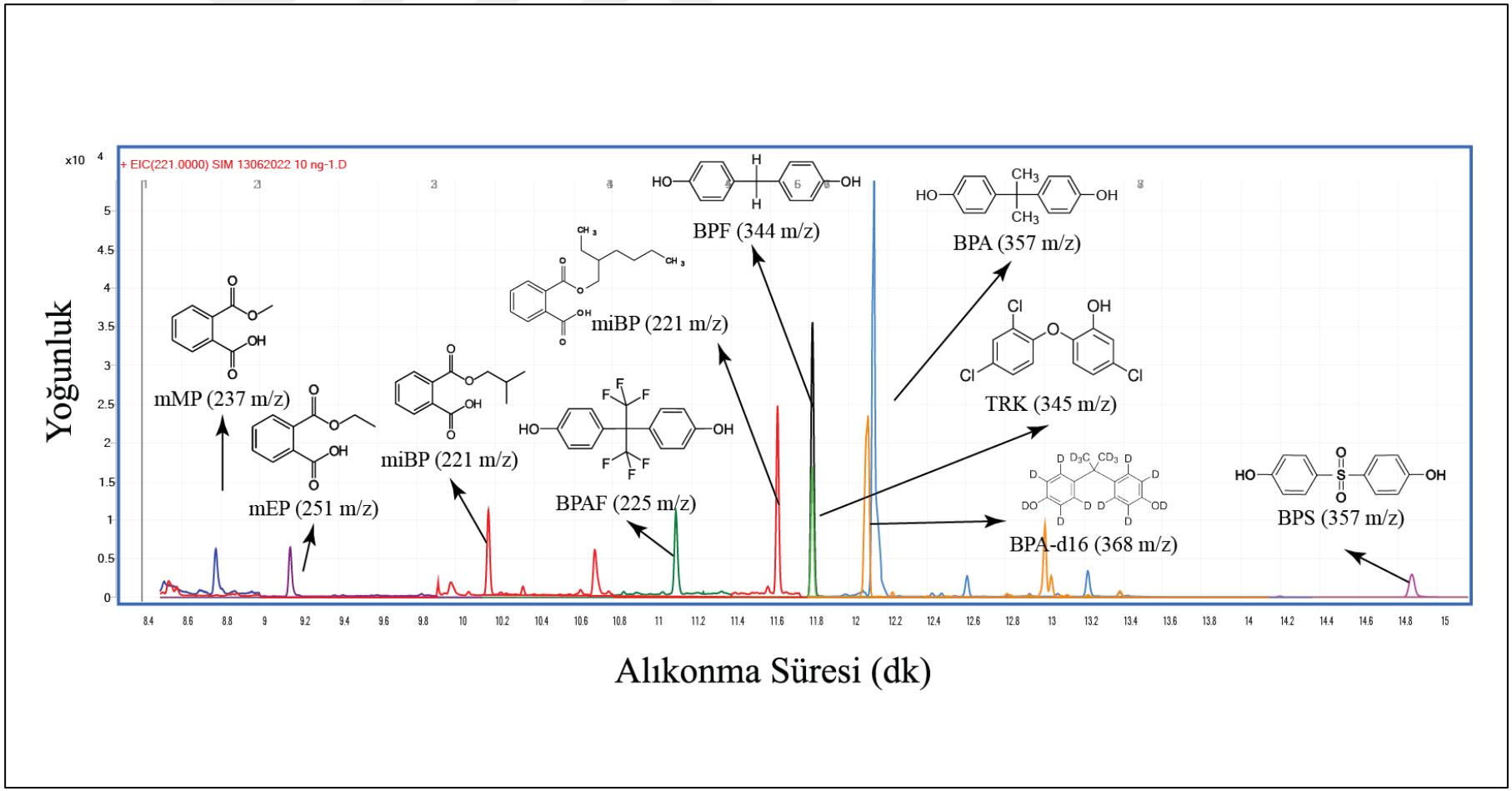
Çizelge 3.3.'de geliştirilmiş olan gaz kromatografisi yönteminin parametreleri bulunmaktadır.

Çizelge 3.3. En uygun MS parametreleri

Kütle Seçici Dedektör Parametreleri	
AUX Sıcaklığı:	➢ 280˚C
İyon Kaynağı Sıcaklığı	➢ 150˚C
Dörtlü Kutup Sıcaklığı	➢ 230˚C



Şekil 3.1. Optimize GK/KS yöntemi ile elde edilmiş standart karışımına ait kromatogram (10 ng/mL).



Şekil 3.2. Optimize GK/KS yöntemi ile elde edilmiş özütlemiş örneğine ait kromatogram (10 ng/mL).

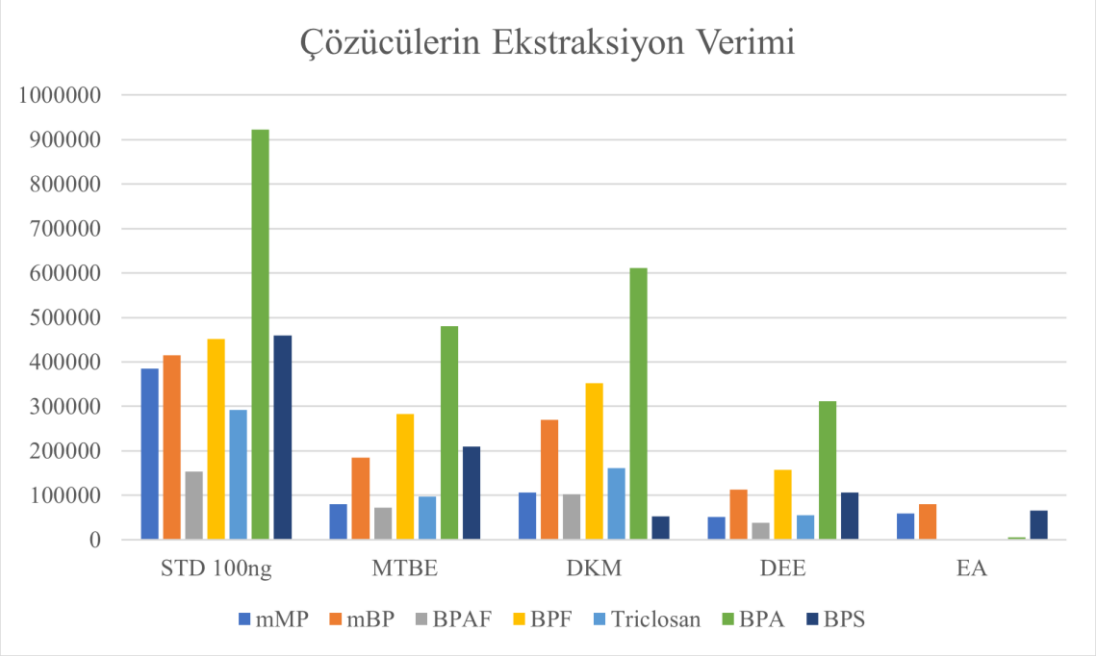
Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere optimize edilen GK/KS yöntemi ile temin edilen analitik referans standartların karışımının ayırımı başarı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2.'de gerçek mekonyuma 10 ng standart karışım eklendikten sonra, özütlenen örneğin kromatogramı görülmektedir. Yaklaşık 15dk süre içerisinde hedeflenen maddelerin tamamı tespit ve tayin edilebilmiştir.

3.3. En Uygun Özütleme Yöntemi

Mekonyum doğası gereği içerisinde su barındıran bir örnektir fakat doğrudan tuz eklenerek homojenizasyon ve çöktürme işlemi yapmak oldukça zordur. Dolayısıyla işlem öncesi mekonyumun bir tampon veya distile su yardımıyla sıvılaştırılması ya da tuzun çözelti şeklinde yüksek hacimde eklenerek homojenizasyonun sağlanması gerekmektedir. Fakat sulu faz hacminin artması doğru orantılı olarak özütleme sırasında kullanılacak organik fazın hacmini arttırmaktadır. Ayrıca suyun buharlaştırmasının uzun sürmesi ve pratik olmaması nedeniyle tuzla çöktürme yöntemi örnek hazırlama stratejimize uygun bulunmamıştır.

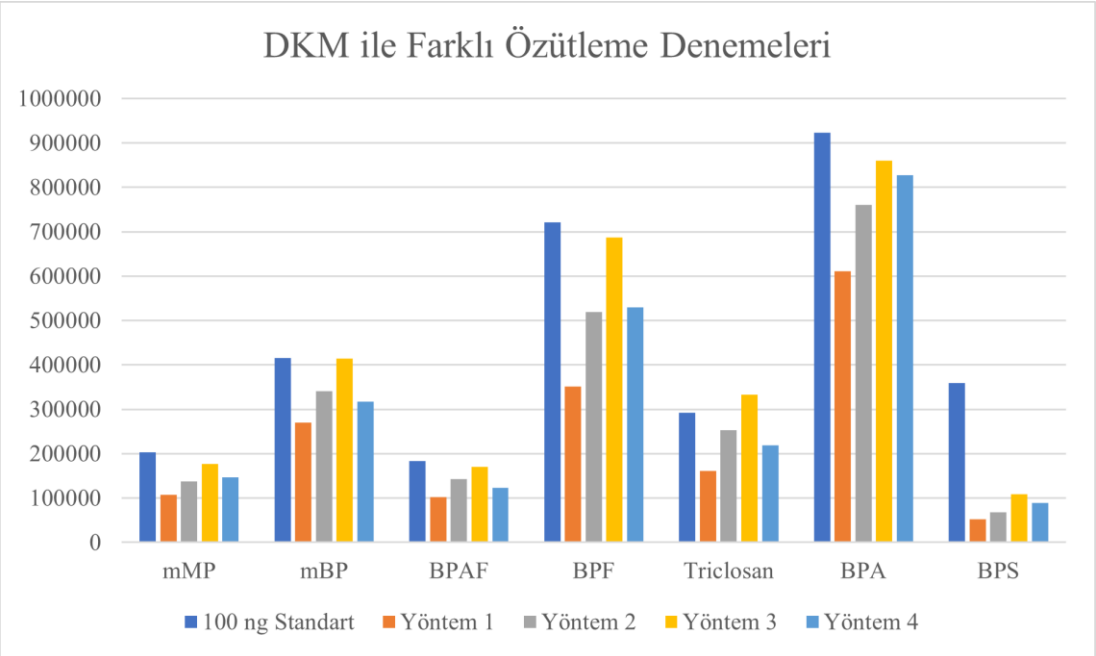
Metanol, asetonitril ve aseton doğrudan mekonyuma uygulanarak çöktürme denemeleri başarılı sonuçlanmıştır. Bu çözücülerin suyla geçimli olması ve hedef maddelerin bu çözücülerdeki çözünürlüklerinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Özütleme verimine katkısı ve en iyi çöktürme verimi metanolde elde edildiği için çalışmalara metanol ile devam edilmiştir.

3:1 çözücü numune oranıyla başlanılan özütleme denemelerinde beş farklı çözücünün özütleme verimi incelenmiş ve Şekil 3.3.'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir (Hekzan verimi çok düşük olduğu için grafiğe eklenmemiştir).



Şekil 3.3. Çözücülerin özütleme başarımı.

Özütleme verimi yüksek olan DKM ile optimizasyon denemeleri yapılmış ve elde edilen alanların karşılaştırılması Şekil 3.4.'de yapılmıştır.



Şekil 3.4. DKM ile denenen farklı yöntemlerin özütleme başarımı.

3.4. Katılımcılara Ait Veriler

Çizelge 3.4.'te ve Çizelge 3.5.'te anne ve yeni doğana ait olan bilgiler bulunmaktadır.

Çizelge 3.4. Annelere ve yeni doğanlara ait bilgiler.

	Ortalama	**Bağıl Standart Sapma**
Anne (n=100)		
Yaş	29.89	±5.93
Gebelik Süresi (gün)	271.94	±7.72
Gravide	2.20	
Parite	1.90	
Düşük	0.27	
D/C	0.05	
Bebek (n=100)		
Ağırlık (g)	3257.52	±510.18
Boy (cm)	50.81	±2.17
Baş Çevresi (cm)	34.78	±1.59
APGAR 1 dk	8.59	
APGAR 5 dk	9.8	

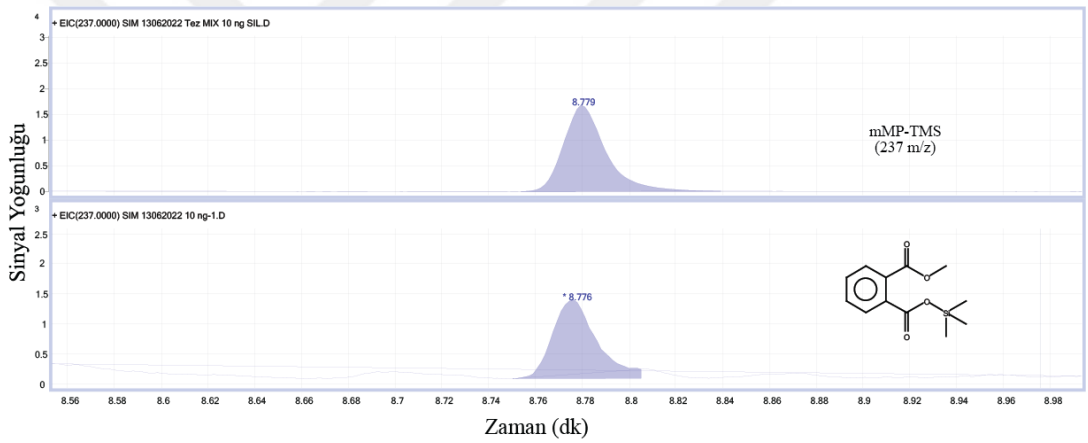
Çizelge 3.5. Optimize edilen gaz kromatografisi yönteminin parametreleri

Cinsiyet	**n**	**Toplam**
Kız	52	100
Erkek	48	
Doğum Yöntemi		
NVY	45	100
CS	55	
Doğum Ağırlığı		
LGA	18	100
AGA	78	
SGA	4	

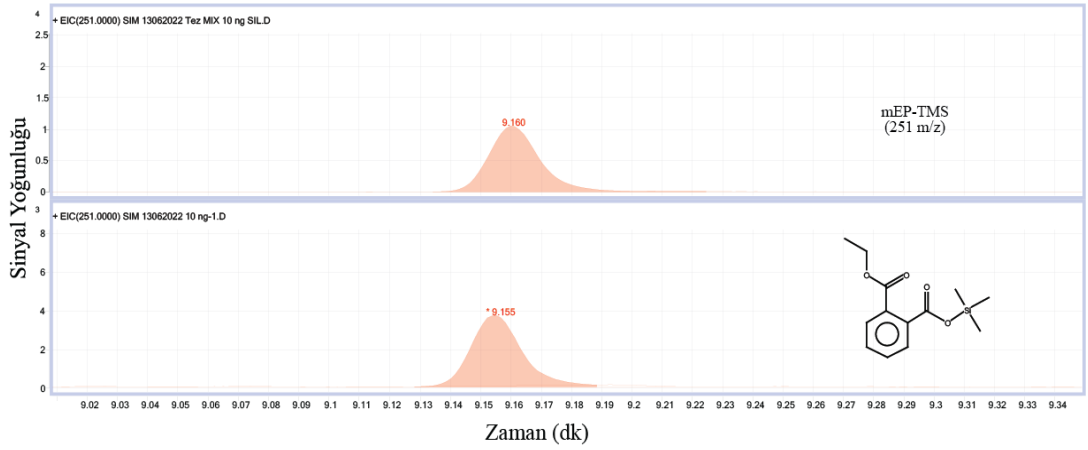
3.5. Yöntem Validasyonu

3.5.1. Seçicilik

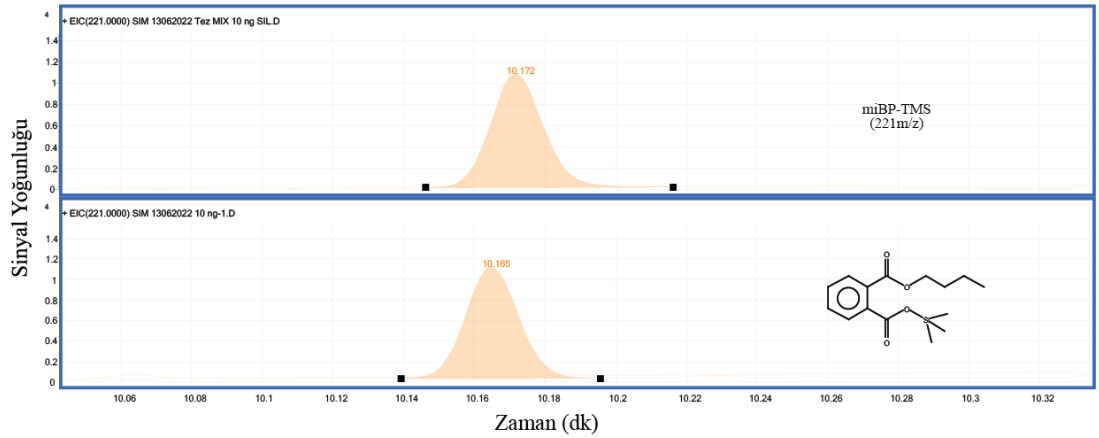
Aşağıdaki şekillerde ftalat esterlerinin, bisfenol analoglarının ve triklosanın standart ve geliştirilen yöntem sonuçlarını gösteren kromatogramlar bulunmaktadır. Kromatogramlardan anlaşılacağı üzere bileşiklere ait olan pikler rahatlıkla seçilebilmekte ve matriks kaynaklı girişim en az düzeydedir.



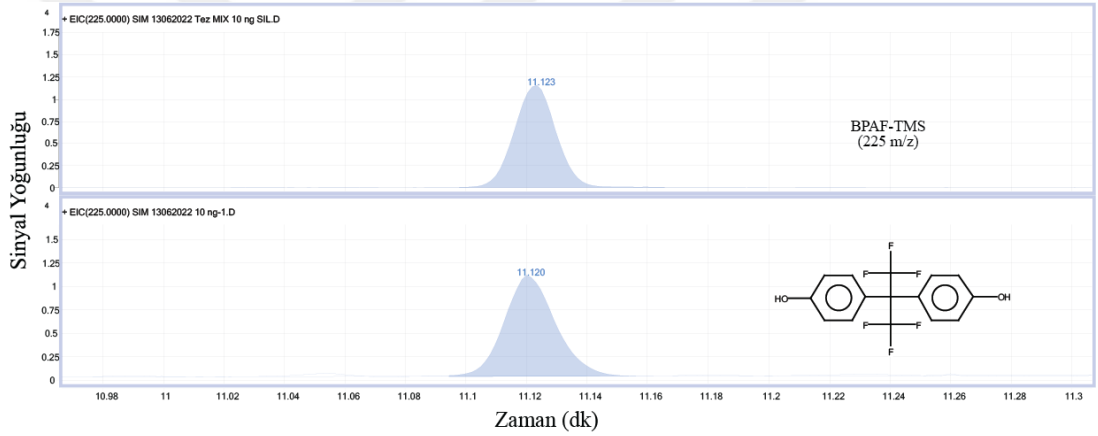
Şekil 3.5. MMP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



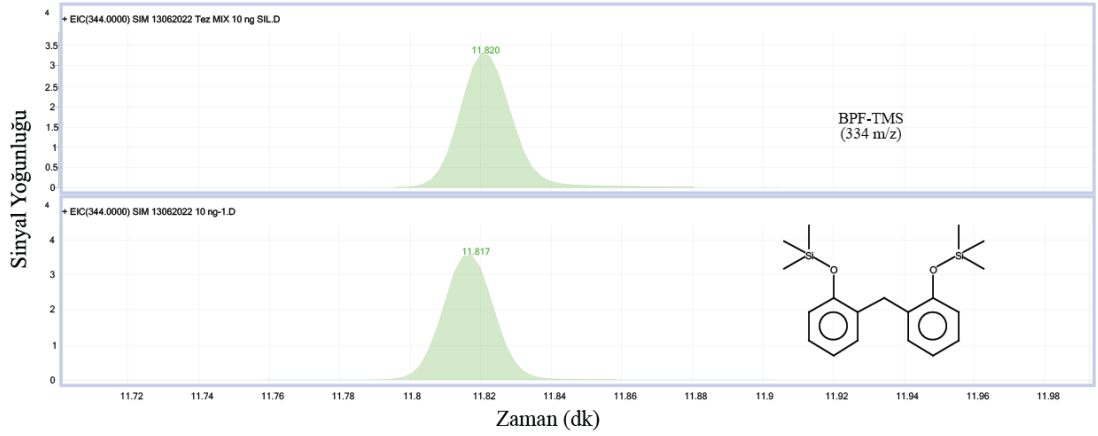
Şekil 3.6. MEP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



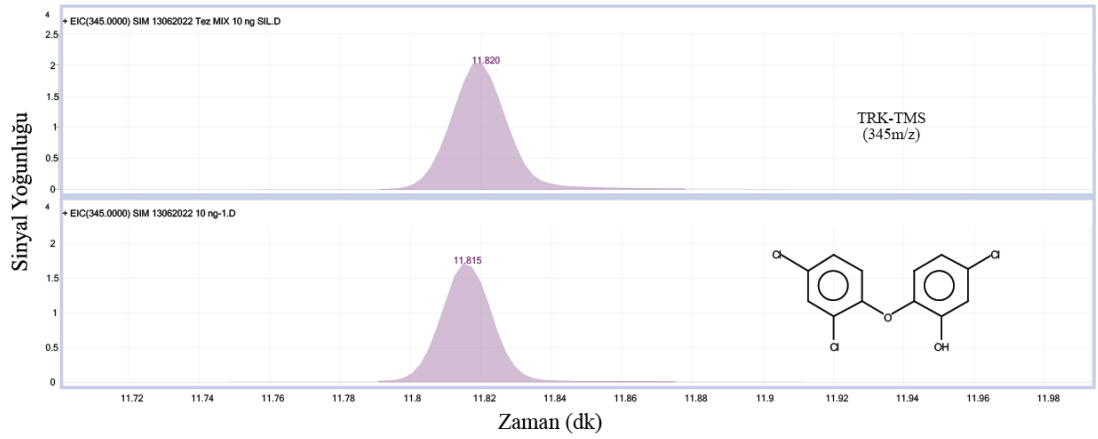
Şekil 3.7. MiBP'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



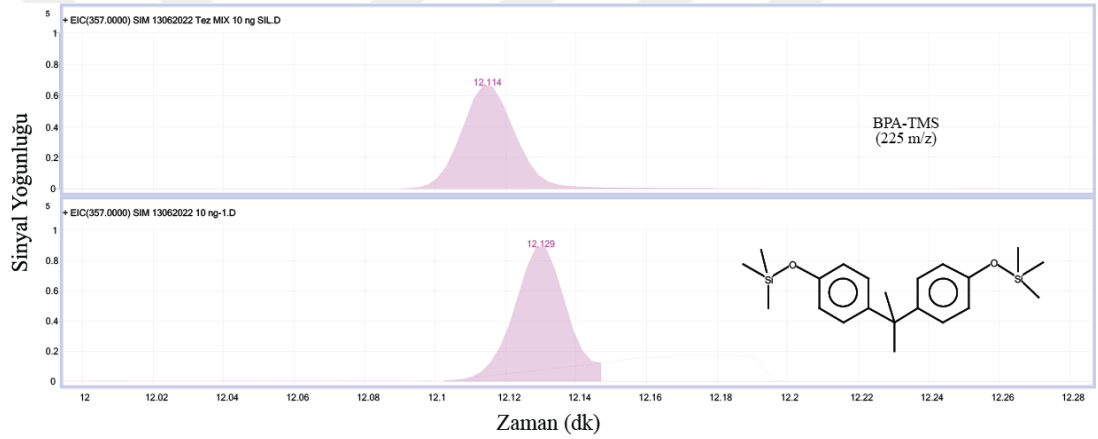
Şekil 3.8. BPAF'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



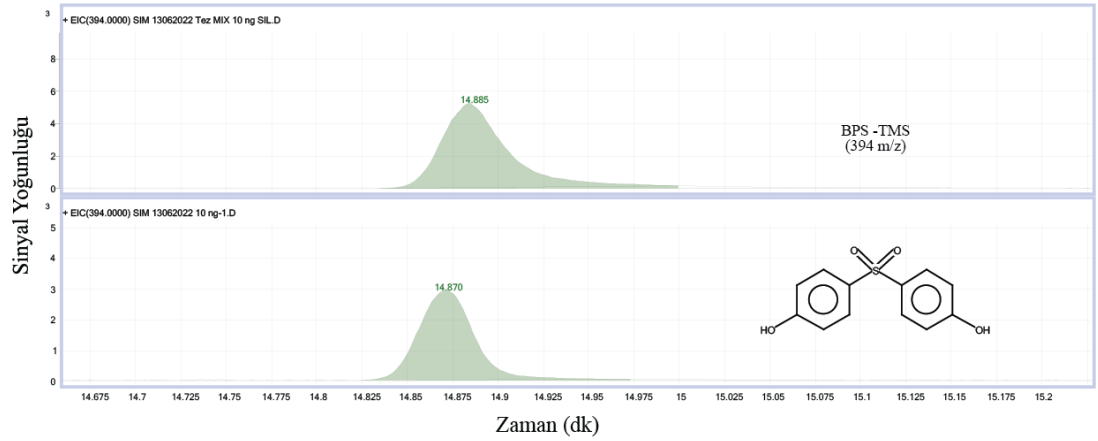
Şekil 3.9. BPF'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



Şekil 3.10. TRK'a ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



Şekil 3.11. BPA'ya ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).



Şekil 3.12. BPS'ye ait standart ve özütleme kromatogramları (10 ng/mL).

3.5.2. Doğruluk

Doğruluk hesaplamaları için kalite kontrol örnekleri bilinen derişimlerde hazırlanarak analiz edilmiştir. Ölçülen pik alanı kalibrasyon eğrisine yerleştirilerek beklenen derişimle oranı yüzde olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızın doğrulukla ilgili verileri Çizelge 3.6'da tablo haline getirilmiştir.

3.5.3. Kesinlik

Kesinlik hesaplamaları için kalite kontrol örnekleri bilinen derişimlerde hazırlanarak tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir. Alınan sonuçların varyansının ortalamalarına oranı yüzde olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızın kesinlikle ilgili verileri Çizelge 3.6.'da tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmamızın doğruluk ve kesinlik ile ilgili verileri.

Bileşik		**Gün İçi**				**Günler Arası**		
		Ortalama	**Stansart Sapma**	**%BSS**	**Doğruluk**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**%BSS**
MMP	**1.2 ng**	1.15	0.04	***3.10***	***95.51***	1.13	0.03	***3.09***
	2.4 ng	2.35	0.07	***2.81***	***97.79***	2.36	0.08	***3.56***
	3.6 ng	3.67	0.19	***5.15***	***102.08***	3.61	0.15	***4.28***
	7.2 ng	7.42	0.43	***5.79***	***103.07***	7.38	0.26	***3.55***
MEP	**1.2 ng**	1.19	0.03	***2.54***	***99.22***	1.20	0.04	***2.99***
	2.4 ng	2.37	0.02	***0.96***	***98.84***	2.37	0.11	***4.43***
	3.6 ng	3.73	0.06	***1.60***	***103.75***	3.69	0.18	***4.77***
	7.2 ng	7.24	0.08	***1.04***	***100.58***	7.20	0.08	***1.11***
MiBP	**1.2 ng**	1.15	0.04	***3.06***	***96.09***	1.20	0.08	***6.97***
	2.4 ng	2.36	0.06	***2.72***	***98.24***	2.36	0.05	***2.26***
	3.6 ng	3.50	0.10	***2.74***	***97.31***	3.51	0.09	***2.42***
	7.2 ng	7.21	0.09	***1.19***	***100.20***	7.48	0.34	***4.60***

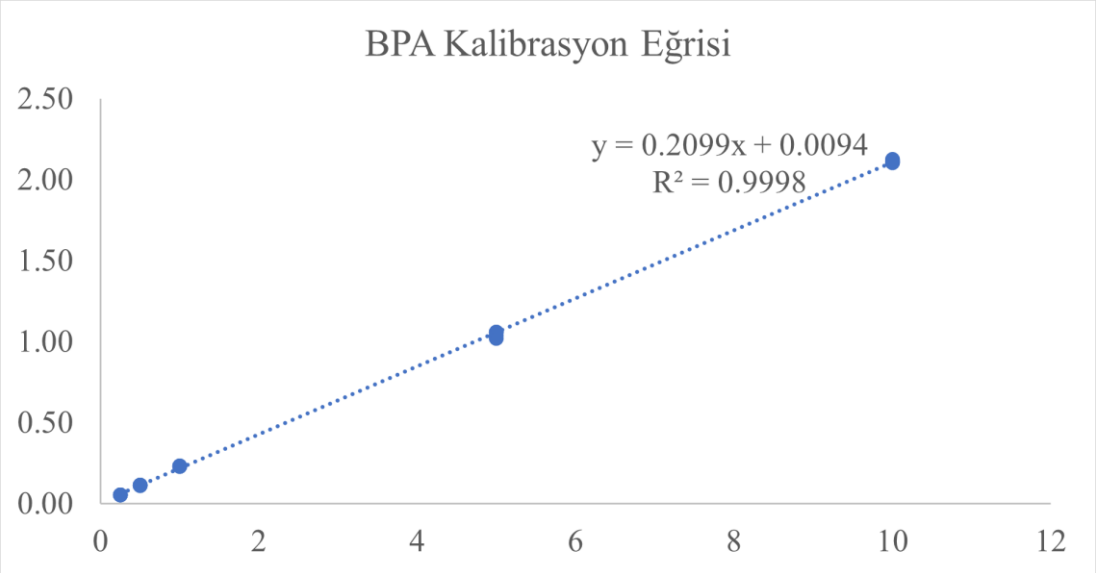
Çizelge 3.6. (Devam) Çalışmamızın doğruluk ve kesinlik ile ilgili verileri.

Bileşik		Gün İçi				Günler Arası		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**%BSS**	**Doğruluk**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**%BSS**
BPAF	**1.2 ng**	1.17	0.01	***0.46***	***97.67***	1.20	0.03	***2.34***
	2.4 ng	2.32	0.07	***2.92***	***96.76***	2.42	0.11	***4.52***
	3.6 ng	3.69	0.06	***1.76***	***102.62***	3.65	0.06	***1.63***
	7.2 ng	7.23	0.20	***2.77***	***100.35***	7.20	0.13	***1.83***
BPF	**1.2 ng**	1.21	0.06	***5.11***	***100.85***	1.25	0.08	***6.41***
	2.4 ng	2.34	0.09	***3.92***	***97.43***	2.31	0.10	***4.55***
	3.6 ng	3.55	0.07	***1.94***	***98.67***	3.53	0.08	***2.13***
	7.2 ng	7.07	0.11	***1.52***	***98.16***	7.11	0.08	***1.07***
TRK	**1.2 ng**	1.21	0.03	***2.39***	***100.96***	1.17	0.04	***3.49***
	2.4 ng	2.40	0.10	***4.08***	***100.04***	2.40	0.08	***3.53***
	3.6 ng	3.72	0.10	***2.63***	***103.36***	3.66	0.12	***3.37***
	7.2 ng	7.30	0.10	***1.43***	***101.41***	7.48	0.24	***3.23***
BPA	**1.2 ng**	1.21	0.03	***2.55***	***100.99***	1.20	0.03	***2.71***
	2.4 ng	2.49	0.05	***2.20***	***103.89***	2.50	0.04	***1.73***
	3.6 ng	3.62	0.04	***1.07***	***100.56***	3.61	0.04	***1.17***
	7.2 ng	7.30	0.05	***0.74***	***101.39***	7.28	0.08	***1.14***
BPS	**1.2 ng**	1.24	0.02	***1.84***	***103.38***	1.22	0.05	***4.49***
	2.4 ng	2.64	0.09	***3.28***	***110.02***	2.54	0.13	***5.19***
	3.6 ng	3.78	0.01	***0.39***	***105.07***	3.68	0.11	***3.08***
	7.2 ng	7.49	0.09	***1.22***	***104.04***	7.45	0.11	***1.53***

3.5.4. Doğrusallık

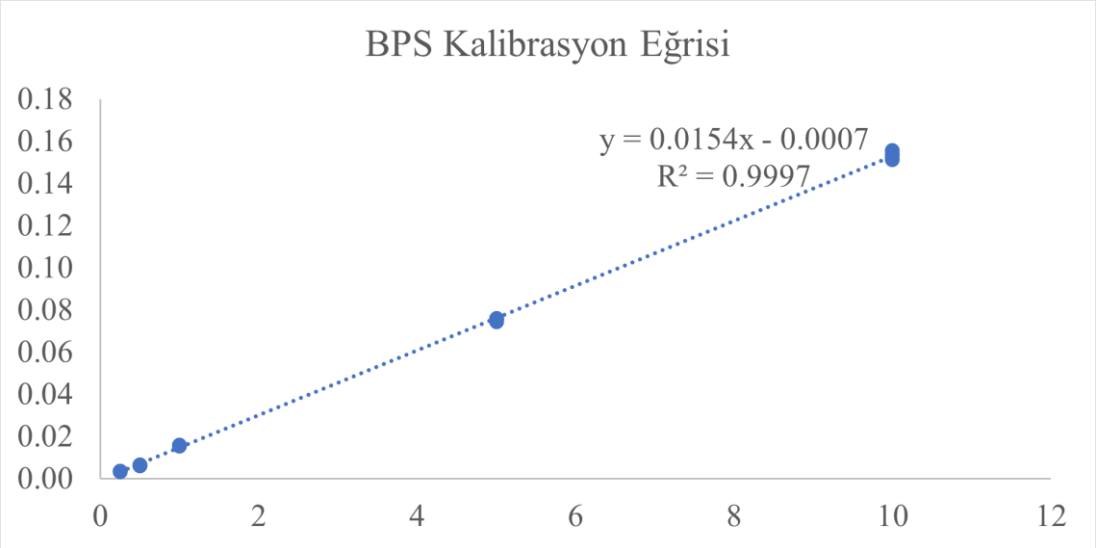
Çalışmamızda oldukça düşük seviyelerde madde tayini yapılacağı için tayin aralığı tayin limitine oldukça yakın tutulmuştur. Bölüm 2.9.'da hazırlanan kalibrasyon noktalarında görüldüğü üzere çalışmamız dahilinde çalışma aralığını belirlemek için 0.1 ng/mL ile 50 ng/mL arasında değerler denenmiştir. Elde edilen verilerde 25 ng/mL ve 50 ng/mL kalibrasyon noktalarının doğrusallığı bozduğu görüldüğü için kalibrasyon eğrisinden çıkartılmıştır. Kalan noktalardan en az 5 tanesi kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır.

BPA için 5 farklı noktadan (0,25 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.13.'de gösterilmiştir.



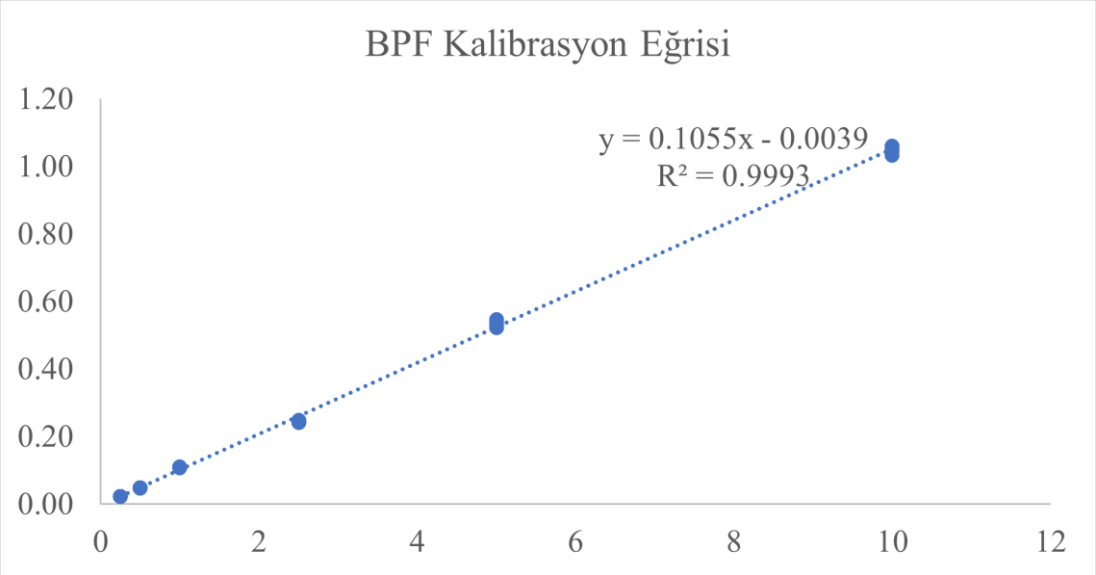
Şekil 3.13. BPA kalibrasyon eğrisi.

BPS için 5 farklı noktadan (0,25 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.14.'de gösterilmiştir.



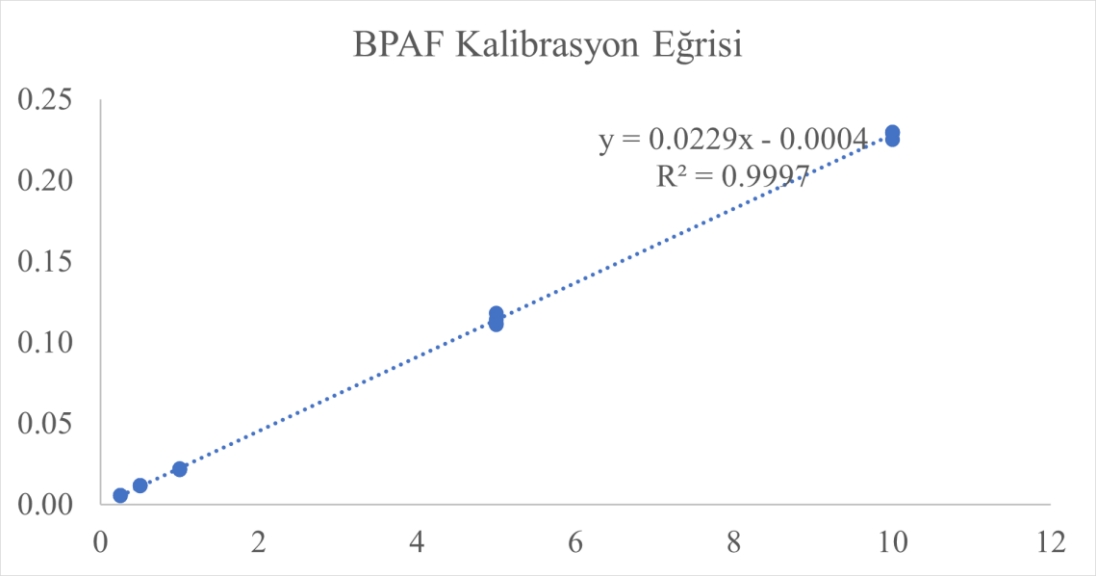
Şekil 3.14. BPS kalibrasyon eğrisi.

BPF için 6 farklı noktadan (0,1 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.15.'te gösterilmiştir.



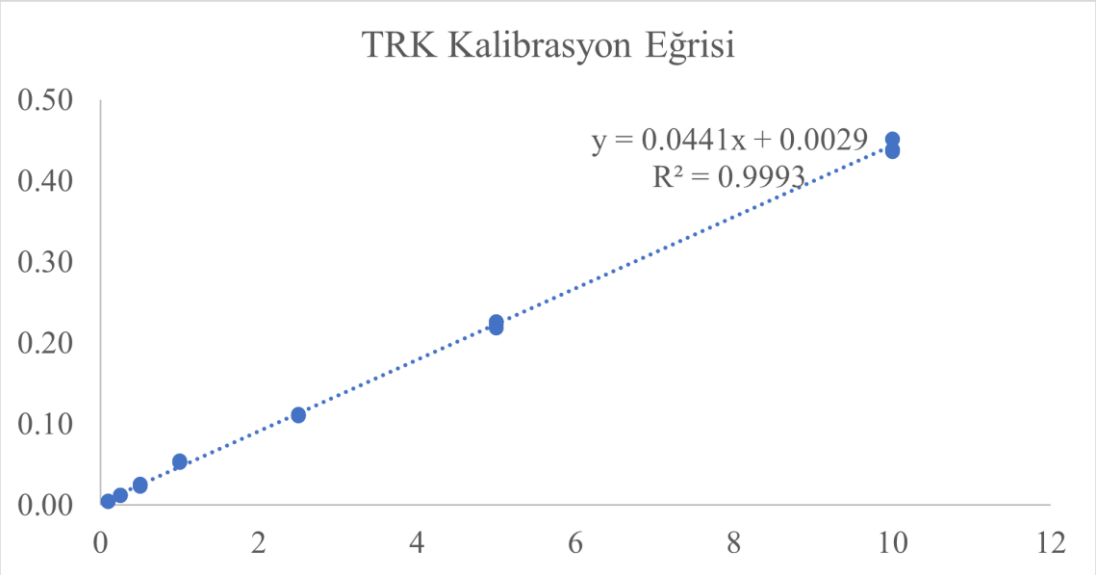
Şekil 3.15. BPF kalibrasyon eğrisi.

BPAF için 5 farklı noktadan (0,25 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.16.'te gösterilmiştir.



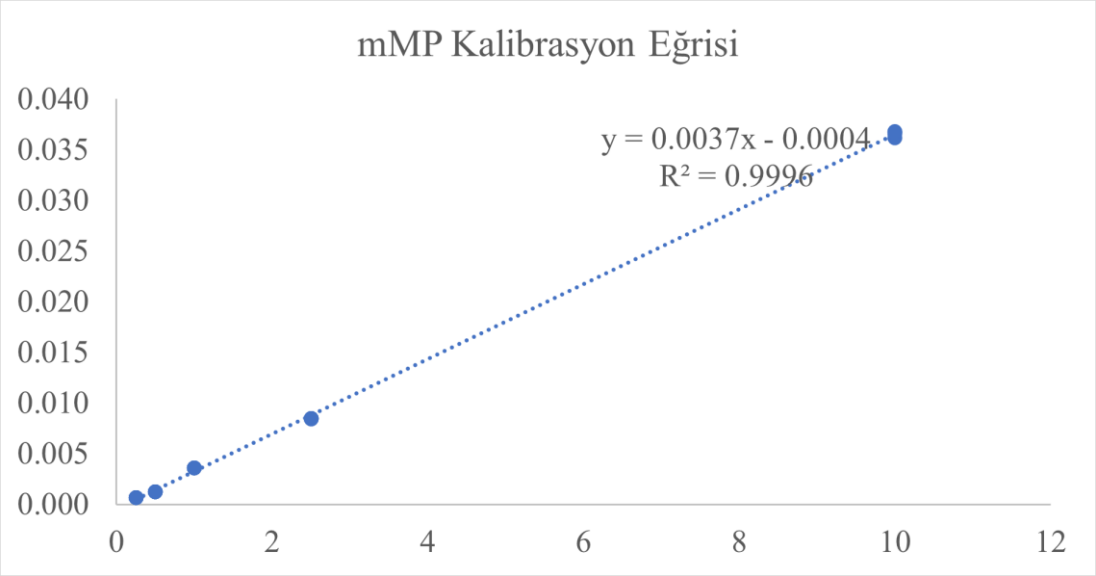
Şekil 3.16. BPAF kalibrasyon eğrisi.

TRK için 7 farklı noktadan (0,01 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.17.'da gösterilmiştir.



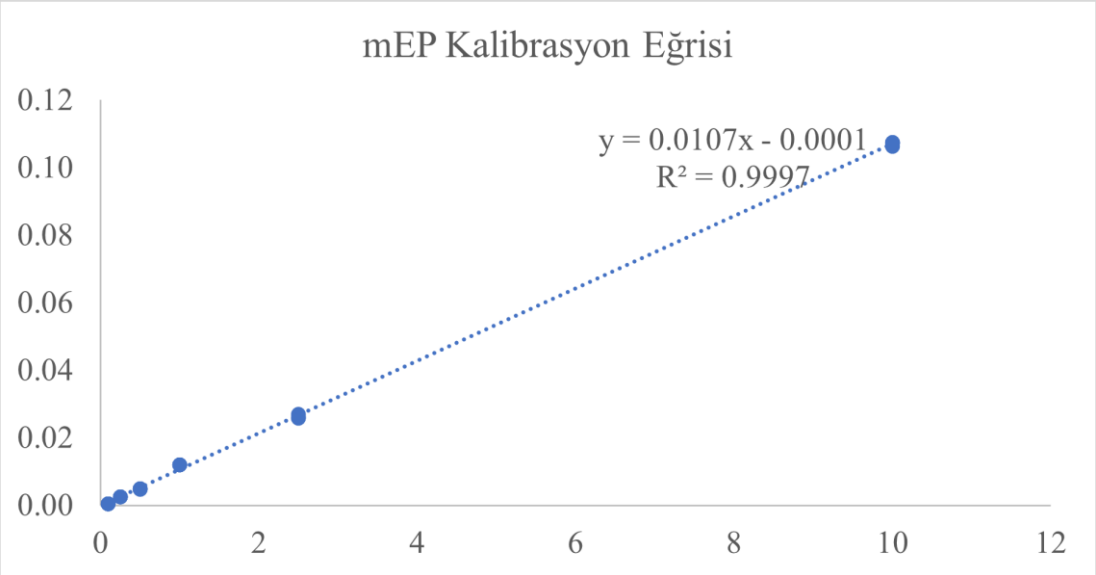
Şekil 3.17. TRK kalibrasyon eğrisi.

MMP için 5 farklı noktadan (0,25 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.18.'de gösterilmiştir.



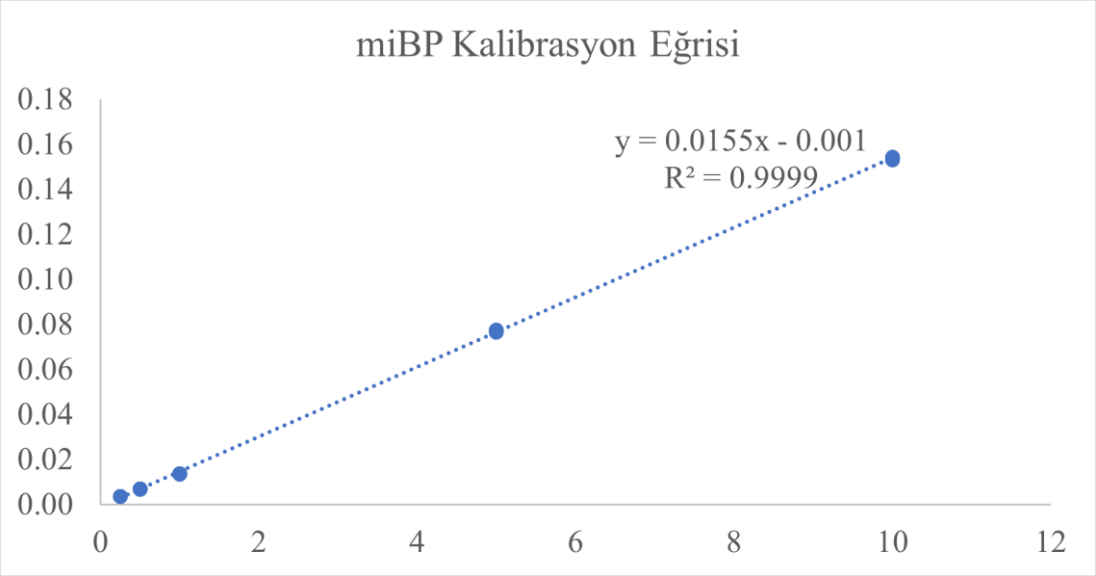
Şekil 3.18. MMP kalibrasyon eğrisi.

MEP için 6 farklı noktadan (0,1 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.19.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. MEP kalibrasyon eğrisi.

MiBP için 5 farklı noktadan (0,25 - 10 ng/mL) çizilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.20.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.20. MiBF kalibrasyon eğrisi.

Doğrusallıkla ilgili veriler Çizelge 3.7.'de tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 3.7. Kalibrasyon örneklerinin GK/KS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=5)[2].

Bileşik	Çalışma Aralığı (ng/mL)	a	b	r	R^2	p[3]	F[4]
MMP	0.25 - 10	0.00370	-0.00042	0.99981	0.99963	<0.001	62010.76
MEP	0.25 - 10	0.01070	0.00002	0.99983	0.99967	<0.001	69268.64
MiBP	0.25 - 10	0.01549	-0.00095	0.99994	0.99988	<0.001	191109.86
BPAF	0.25 - 10	0.02288	-0.00043	0.99984	0.99967	<0.001	70336.87
BPF	0.25 - 10	0.10551	-0.00387	0.99964	0.99929	<0.001	39134.73
TRK	0.25 - 10	0.04397	0.00375	0.99961	0.99923	<0.001	36287.14
BPA	0.25 - 10	0.20991	0.00939	0.99988	0.99976	<0.001	96235.75
BPS	0.25 - 10	0.01535	-0.00068	0.99986	0.99972	<0.001	81011.42

[2] y= ax + b (a, Eğim; b, Kesişim; x, Derişim).
[3] Kesişimin olasılık değeri. p<0.05, tüm bileşikler için anlamlı.
[4] Varyans analizinin değeri. F Anlamlılık tüm bileşikler için <0.05.

3.5.5. Çalışma Aralığı

Geliştirilen yöntemin çalışma aralığı, doğruluk, kesinlik ve doğrusallık değerlerinin en uygun olduğu seviyedeki aralıktır. Bu aralıklar Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir.

3.5.6. Tespit ve Tayin Sınırları

Belirlenen çalışma aralığındaki kalibrasyon noktalarının tekrarlı ölçümleri sonrasında ortaya çıkan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin varyansı üzerinden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.8.'de tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 3.8. Kalibrasyon örneklerinin GK/KS yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=5).

Bileşik	Çalışma Aralığı (ng/mL)	Eğim Denklemi	R^2	LOD (ng/mL)[5]	LLOQ (ng/mL)	%BSS (LLOQ)
MMP	0.25 - 10	y = 0.0037x - 0.0004	0.99963	0.06	0.25	1.281
MEP	0.25 - 10	y = 0.0107x - 0.0001	0.99967	0.06	0.25	1.259
MiBP	0.25 - 10	y = 0.0155x - 0.001	0.99988	0.04	0.25	1.498
BPAF	0.25 - 10	y = 0.0229x - 0.0004	0.99967	0.06	0.25	0.522
BPF	0.25 - 10	y = 0.1055x - 0.0039	0.99929	0.08	0.25	1.867
TRK	0.25 - 10	y = 0.044x + 0.0038	0.99923	0.08	0.25	1.911
BPA	0.25 - 10	y = 0.2099x + 0.0094	0.99976	0.05	0.25	0.500
BPS	0.25 - 10	y = 0.0154x - 0.0007	0.99972	0.06	0.25	0.898

[5] İstatistiksel olarak belirlenen LOD değerleri, 1:3 sinyal—gürültü oranına uygundur.

3.6. Analiz Sonuçları

Çizelge 3.9. ve 3.10.'da mekonyum örneklerinin analizi sonucu tayin edilen analitlerin geometrik ortalamaları ve karşılaştırmaları tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 3.9. Hedef analitlerin geometrik ortalaması, çeyreklik ve seçilmiş yüzdelik değerleri (ng/g).

Bileşik	GM *(%95 CI)* (ng/g)	Yüzdelik ve Çeyreklik (ng/g)					Maksimum (ng/g)	n	%<LOD
		10	25	50	75	90			
MMP	10.96 *(9.76-12.32)*	2.897	7.189	10.51	15.28	25.23	37.56	100	7
MEP	1.7 *(1.45-2.0)*	0.3673	0.9204	1.581	2.573	4.773	28.67	100	7
MiBP	2.78 *(2.23-3.49)*	0.04651	1.05	2.262	3.844	12.96	60.4	100	10
BPAF	1.09 *(0.74-1.6)*	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.8725	3.845	100	86
BPF	2.45 *(1.54-3.91)*	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.345	9.979	100	83
BPA	1.84 *(1.52-2.25)*	0.3091	0.7374	1.58	3.063	6.122	22.82	100	9
BPS	2.88 *(2.36-3.51)*	<LOD	1.064	2.333	4.991	10.19	34.98	100	12
TRK	3.54 *(2.3-5.45)*	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.326	100	94

Çizelge 3.10. Yenidoğan cinsiyeti ve tayin edilen ortalama miktarlar (ng/g) arasındaki ilişki.

	MMP		MEP		MiBP		TRK	
	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri
Kız (n=52)	11.09	0.91	1.47	0.17	2.32	0.28	3.8	0.8
Erkek (n=48)	10.81		1.52		3.42		3.42	

	BPAF		BPF		BPA		BPS	
	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri	GM (%95 CI)	p-Değeri
Kız (n=52)	1.06	0.85	1.64	0.15	2.05	0.39	2.77	0.78
Erkek (n=48)	1.1		3.05		1.64		3.03	

4. TARTIŞMA

Mekonyum yeni doğanların ilk dışkısıdır ve gebeliğin yaklaşık 12. Haftasından itibaren oluşmaya başlar (Bearer, 2003; Ostrea EM, Jr. ve ark., 2006) ve doğumu izleyen 48 saat içerisinde vücuttan atılır.

Gebelik sırasında maruz kalınan pek çok maddeyi bu biyolojik örnekte inceleyebilmemize karşın, örnek ile baş etmek ve analize hazırlamak oldukça uğraş gerektiren bir süreç yaratmaktadır. Bu nedenle literatürde mekonyumun özütleme tekniklerini içeren yayın sayısı oldukça kısıtlıdır. Literatürü incelediğimizde özellikle pestisit ve yasadışı madde analizleri ön plana çıkmaktadır. Fakat mekonyumun kullanılabileceği alan bunlarla kısıtlı değildir. Son yıllarda özellikle çevresel kirleticilerin yarattığı endişe giderek artmaktadır (Cassoulet ve ark., 2019). Bu kirleticilerin önemli bir kısmını endokrin bozucu kimyasallar oluşturmaktadır.

Çalışmamızda araştırılan maddelerin özellikle gelişim çağındaki çocuklarda bazı nörolojik ve hormonal problemler yaratabildiği konusunda ciddi şüpheler bulunmaktadır. Bu maddeler ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, özellikle ana karnında maruz kalınan miktarı belirlemek için yapılan çalışma miktarı oldukça azdır. Organizmadaki yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle çalışmalarda kullanılan maternal idrar, plazma ve bebeğin ilk idrarı gebelik süresince maruz kalınan miktarı ne yazık ki yeterli düzeyde yansıtamamaktadır.

Mekonyum inert yapısı nedeniyle ftalat esterleri ve bisfenol analogları gibi organizmada kısa ömürlü olan maddeler için birikebilecekleri bir havuz olabilir (Bearer, 2003).

Bu maddelerle ilgili mekonyumda yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Çin'de yapılmış olan üç farklı çalışmada bir ftalat monoesteri olan MEHP'in ortanca derişimi 3800 μg/g, 2.9 mg/g ve 163.8 μg/g gibi oldukça yüksek seviyelerde bulunmuştur (Zhang ve ark., 2009; Li LX ve ark., 2013; Xie ve ark., 2015). Buna karşın Kanada'da yapılmış olan bir çalışmada ortanca mEHP derişimi 0.64 ng/g gibi düşük bir seviyede bulunmuştur (Arbuckle ve ark., 2016). Yine Zhang ve Xie'nin çalışmalarında ortanca MiBP derişimi sırasıyla 1.7 mg/g ve 101.70 μg/g seviyelerindeyken Arbuckle'ın çalışmasında 2.09 ng/g olarak belirlenmiştir. Amerika'da beş farklı mekonyum örneği ile yapılmış olan bir çalışmada ortalama MEOHP ve MEHHP derişimleri 3.26 ve 3.76 ng/g olarak tespit edilmiş (Kato ve ark., 2006), buna kıyasla Arbuckle yaptığı çalışmada bu değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.37 ng/g olarak bulmuştur (Arbuckle ve ark., 2016). Yaptığımız çalışmada ortalama MMP, MEP ve MiBP derişimleri sırasıyla 11.86 ng/g, 1.70 ng/g ve 2.78 ng/g olarak tespit edilmiştir. Arbuckle'ın sonuçlarıyla kıyasladığımızda mekonyum örneklerinde bulunan ortalama MMP derişimi yaklaşık 100 kat fazla bulunsa da MEP ve MiBP sonuçları oldukça yakındır. Bununla birlikte Çin kaynaklarıyla kıyaslandığında sonuçlarımız oldukça düşük bulunmuştur.

BPA'yı ise mekonyum örneklerinde ilk olarak 2015 yılında yine Kanadalı ekip çalışmıştır (Arbuckle, Marro, ve ark., 2015). Yaptıkları çalışmada BPA'yı ve TRK'yı mekonyum örneklerinde incelemişlerdir. Daha sonrası için yaptığımız literatür taramasında bisfenol analogları için yapılmış bir çalışma bilgimiz dahilinde bulunmamaktadır. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada mekonyumda ortalama 0.52 ng/g BPA ve 2.24 ng/g TRK bulmuşlardır (Arbuckle, Marro, ve ark., 2015). Yaptığımız çalışmada ise bu değerler sırasıyla 1.72 ve 3.54 ng/g'dır.

BPA'nın kullanımının kısıtlanması ve giderek tüketim ürünlerinden çıkarılması nedeniyle farklı bisfenol analoglarının üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. BPS ülkemizde ve dünyada BPA yerine sıklıkla tercih edilen maddeler arasında ilk sırayı almıştır. Çalışmamızda mekonyum örneklerindeki BPS'nin,

BPF'nin ve BPAF'nin derişimi ortalama 2.88 ng/g, 2.45 ng/g ve 1.09 ng/g düzeyinde bulunmuştur. BPS'nin ve analizini yaptığımız diğer bisfenol analoglarının mekonyum örneklerinde çalışıldığı başka bir çalışma bilgimiz dahilinde yoktur. Dolayısıyla elde edilen veriler kıyaslanamamaktadır.

Analitik açıdan incelediğimizde, ne yazık ki literatürde çok detaylı yayınlar bulunmamaktadır. Dolayısıyla geliştirdiğimiz yöntem literatüre yenilik katmaktadır. Mekonyumla ilgili yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde katı faz özütleme yöntemi ve sıvı-sıvı özütleme yönteminin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Tercihen çalışmamızda sıvı-sıvı özütleme tekniği kullanılmıştır, fakat kromatografk yöntemimiz katı faz özütleme tekniği için de uygundur.

Çalışmamızda tercih ettiğimiz sıvı-sıvı özütleme yöntemi hedeflediğimiz maddeleri eş zamanlı olarak başarıyla özütleyebilmektedir. Bununla birlikte kolaylıkla değiştirilebilmesi sayesinde farklı maddelerin de yönteme eklenebilmesi oldukça basittir. Ayrıca yapılacak ileri düzenlemelerle yöntemin daha çevreci hale getirilmesi de mümkündür.

Geliştirdiğimiz kromatografik yöntem ile yaklaşık 15 dk içerisinde İS ile birlikte 9 maddenin analizi hızlı ve etkili bir biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Bununla birlikte özütleme tekniğinde olduğu gibi ileri düzenlemelerle yönteme farklı maddelerin eklenmesi ve veriminin arttırılması mümkündür.

Çalışmamız sırasında bazı sınırlamalarla karşılaşılmıştır. Bunlardan en önemlisi örneklerin toplanması aşamasıdır. Örneklerin kontamine olmaması için özellikle yeni doğaların ölçümleri yapılırken mekonyum çıkışı olan bebeklerden örnek alınması tercih edilmiştir. Fakat bu sırada idrar çıkışı olan bebekler de olmuştur (çapraz bulaş).

Ayrıca klinik şartları nedeniyle bazı örnekler bebeklerin bezlerinden abeslang yardımıyla toplanmıştır.

İkinci sınırlama gaz kromatografisi yöntemi ftalat esterleri için öncelikli tercih edilen yöntem olmamasıdır. Bunun sebebi ftalat esterlerinin yüksek sıcaklıklarda kararlılığını kaybetmesidir. Örneklerin enjeksiyonu sırasında yüksek sıcaklık nedeni ile bir miktar ftalat ester kaybedilmektedir.

Üçüncü sınırlama kullanmakta olduğumuz kütle spektrometresinin yalnızca bir dört kutuba sahip olmasıdır. Yenilenen teknoloji ile birlikte enstrümanlar gelişmekte ve daha duyarlı dedektörler üretilmektedir. Yeni nesil üçlü-dört kutuplu kütle spektrometreleri daha düşük limitlerde daha spesifik ölçüm yapabilmektedir. Buna karşın çalışmamızda oldukça düşük tespit limitlerine inilmiştir.

Dördüncü sınırlama, gaz kromatografisi tekniği kullanıldığı için, özütleme yönteminde organik faza tekrar özütlenmesi ve türevleme gibi ekstra adımlar uygulanmaktadır. Sıvı kromatografisi yönteminde bu basamaklar atlanarak örnek hazırlama aşamasında kaybedilen bu zaman en az düzeye indirilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda mekonyum örneklerinden ftalat esterler, bisfenol analogları ve triklosan başarıyla tespit ve tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer uluslararası çalışmaların önemli bir kısmıyla yakınlık gösterirken Çin kaynaklı yayınlara göre oldukça düşük seviyelerdedir. Özellikle Avrupa ve Amerika'daki çalışmalara kıyasla bu çalışmada gözlenen daha yüksek seviyeler, beslenme şeklinden, çalışma toplumlarındaki farklılıklardan, bulunduğumuz çevreden, gıda paketlemelerinden ve tüketici ürünlerinden kaynaklı olabilir.

Geliştirilmiş olan yöntemin gerçekleştirilen validasyon çalışmaları sonucunda biyoanalitik uygulamalar için geçerliliği kanıtlanmıştır. Dolayısıyla ileri çalışmalar için kullanıma hazır bir yöntemdir. Literatürde kısıtlı sayıda da olsa bulunan çalışmalarla kıyaslandığında düşük tayin limitli ve hızlı bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır. Ayrıca literatürde daha önce mekoyumdan tayini gerçekleştirilmemiş olan bazı bisfenol analogları yönteme dâhil edilerek diğer yöntemlere göre farklılık yaratılmıştır.

Yöntemin triklosanı, bisfenol analoglarını ve ftalat esterlerlerini eş zamanlı tayin edebiliyor olması çalışmamızın literatürdeki diğer çalışmalara göre bir başka üstünlüğünü ortaya çıkarmaktadır. Bu sayede tek bir özütleme ve tek bir analiz yöntemi ile iki farklı gruba ait maddeler analiz edilebilmektedir.

İlerleyen süreçte örneklemi daha geniş ve birden fazla farklı grup üzerinde yeni çalışmalar yapılması, özütleme tekniğinin daha çevreci olan (mikroözütleme gibi) tekniklere dönüştürülmesi, diğer ftalat esterinin ve bisfenol analoglarıın yönteme entegre edilmesi çalışmanın devamı için planlanan basamaklardır.

ÖZET

Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması

Mekonyum yeni doğanların ilk dışkısıdır ve gebeliğin yaklaşık 12. Haftasından itibaren oluşmaya başlar ve doğumu izleyen 48 saat içerisinde vücuttan atılır. Çalışmamızda araştırılan ftalat esterleri, bisfenol analogları ve triklosanın özellikle gelişim çağındaki çocuklarda bazı nörolojik ve hormonal problemler yaratabildiği konusunda ciddi şüpheler bulunmaktadır. Ftalat esterleri ve bisfenol analogları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, özellikle ana karnında maruz kalınan miktarı belirlemek için yapılan çalışma miktarı oldukça azdır. Organizmadaki yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle çalışmalarda kullanılan maternal idrar, plazma ve bebeğin ilk idrarı gebelik süresince maruz kalınan miktarı ne yazık ki yeterli düzeyde yansıtamamaktadır. Mekonyum inert yapısı nedeniyle ftalat esterleri ve bisfenol analogları gibi organizmada kısa ömürlü olan maddeler için birikebilecekleri bir havuz olabilir. Bu nedenle yeni bir özütleme ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi yöntemi geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile yüz farklı yeni doğana ait mekonyum örneği analiz edilerek yöntem geniş çapta değerlendirilmiş ve fetüsün maruz kaldığı ftalat esterlerinin, bisfenol analoglarının ve triklosanın miktarları belirlenmiştir.

Geliştirilen hızlı ve etkin yöntem ile analiz edilen mekonyum örneklerinden alınan sonuçların ortalamaları, monometil ftalat 10.96 ng/g, monoetil ftalat 1.7 ng/g, monobutil ftalat 2.78 ng/g, bisfenol AF 1,09 ng/g, bisfenol F 2.45 ng/g, bisfenol A 1.72 ng/g, bisfenol S 2.88 ng/g ve triklosan 3.54 ng/g şeklindedir.

Anahtar Sözcükler: Bisfenol Analogları, Ftalat Esterleri, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi, Validasyon, Mekonyum.

SUMMARY

Investigation of Various Toxic Substances in Meconium Samples

Meconium is the first stool of newborns and begins to form from about the 12th week of pregnancy, and is excreted within 48 hours of birth. There are serious doubts that the phthalate esters, bisphenol analogs and triclosan investigated in our study may cause some neurological and hormonal problems, especially in children in the developmental age. Although there are many studies on phthalate esters and bisphenol analogs, the number of the study done especially to determine the amount of exposure in the womb is very few. Due to the short half-life of these substances in the organism, the maternal urine, plasma and the first urine of the baby used in the studies unfortunately do not adequately reflect the amount of exposure during pregnancy. Because of its inert nature, meconium can become a pool for short-lived substances such as phthalate esters and bisphenol analogs in the organism. Therefore, a new extraction and gas chromatography/mass spectrometry method was developed and validated. With the developed method, meconium samples belonging to one hundred different newborns were analyzed and the method was evaluated widely. The amounts of phthalate esters, bisphenol analogs and triclosan which the fetus was exposed were determined.

The average of the results obtained from meconium samples analyzed with the developed method, monomethyl phthalate 10.96 ng/g, monoethyl phthalate 1.7 ng/g, monobutyl phthalate 2.78 ng/g, bisphenol AF 1.09 ng/g, bisphenol F 2.45 ng/g , bisphenol A 1.72 ng/g, bisphenol S 2.88 ng/g and triclosan 3.54 ng/g.

Keywords: Bisphenol Analogs, Phthalate Esters, Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Validation, Meconium.

KAYNAKLAR

ABRAHAM A, CHAKRABORTY P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health,* **35**(2): 201-210.

AIT BAMAI Y, ARAKI A, KAWAI T, TSUBOI T, YOSHIOKA E, KANAZAWA A, CONG S, KISHI R. (2015). Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. *Int J Hyg Environ Health,* **218**(5): 461-470.

ALDER L, GREULICH K, KEMPE G, VIETH B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom Rev,* **25**(6): 838-865.

ARBUCKLE TE, FISHER M, MACPHERSON S, LANG C, PROVENCHER G, LEBLANC A, HAUSER R, FEELEY M, AYOTTE P, NEISA A, RAMSAY T, TAWAGI G. (2016). Maternal and early life exposure to phthalates: The Plastics and Personal-care Products use in Pregnancy (P4) study. *Sci Total Environ,* **551-552**: 344-356.

ARBUCKLE TE, MARRO L, DAVIS K, FISHER M, AYOTTE P, BELANGER P, DUMAS P, LEBLANC A, BERUBE R, GAUDREAU E, PROVENCHER G, FAUSTMAN EM, VIGOREN E, ETTINGER AS, DELLARCO M, MACPHERSON S, FRASER WD. (2015). Exposure to free and conjugated forms of bisphenol A and triclosan among pregnant women in the MIREC cohort. *Environ Health Perspect,* **123**(4): 277-284.

ARBUCKLE TE, WEISS L, FISHER M, HAUSER R, DUMAS P, BERUBE R, NEISA A, LEBLANC A, LANG C, AYOTTE P, WALKER M, FEELEY M, KONIECKI D, TAWAGI G. (2015). Maternal and infant exposure to environmental phenols as measured in multiple biological matrices. *Sci Total Environ*, **508**: 575-584.

BARTLE KD, MYERS P. (2002). History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **21**(9): 547-557.

BASAK S, DAS MK, DUTTAROY AK. (2020). Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development. *Birth Defects Res,* **112**(17): 1308-1325.

BEARER CF. (2003). Meconium as a biological marker of prenatal exposure. *Ambul Pediatr,* **3**(1): 40-43.

BEARER CF, JACOBSON JL, JACOBSON SW, BARR D, CROXFORD J, MOLTENO CD, VILJOEN DL, MARAIS AS, CHIODO LM, CWIK AS. (2003). Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr,* **143**(4): 463-469.

BEARER CF, LEE S, SALVATOR AE, MINNES S, SWICK A, YAMASHITA T, SINGER LT. (1999). Ethyl linoleate in meconium: a biomarker for prenatal ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res,* **23**(3): 487-493.

BEARER CF, SANTIAGO LM, O'RIORDAN MA, BUCK K, LEE SC, SINGER LT. (2005). Fatty Acid ethyl esters: quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. *J Pediatr,* **146**(6): 824-830.

BLAU K, HALKET JM. (1993). *Handbook of Derivatives for Chromatography*: Wiley.

BLOOM MS, WHITCOMB BW, CHEN Z, YE A, KANNAN K, BUCK LOUIS GM. (2015). Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. *Hum Reprod,* **30**(11): 2645-2657.

BROWNE S, MOORE C, NEGRUSZ A, TEBBETT I, COVERT R, DUSICK A. (1994). Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. *J Forensic Sci,* **39**(6): 1515-1519.

CABAN M, STEPNOWSKI P. (2020). The quantification of bisphenols and their analogues in wastewaters and surface water by an improved solid-phase extraction gas chromatography/mass spectrometry method. *Environmental Science and Pollution Research,* **27**(23): 28829-28839.

CALLAHAN CM, GRANT TM, PHIPPS P, CLARK G, NOVACK AH, STREISSGUTH AP, RAISYS VA. (1992). Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine. *J Pediatr,* **120**(5): 763-768.

CASSOULET R, HAROUNE L, ABDELOUAHAB N, GILLET V, BACCARELLI AA, CABANA H, TAKSER L, BELLENGER JP. (2019). Monitoring of prenatal exposure to organic and inorganic contaminants using meconium from an Eastern Canada cohort. *Environ Res,* **171**: 44-51.

CHANG C-M, CHOU C-C, LEE M-R. (2005). Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* **539**(1): 41-47.

CHEN D, KANNAN K, TAN H, ZHENG Z, FENG Y-L, WU Y, WIDELKA M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology,* **50**(11): 5438-5453.

CHEVALIER N, BOUSKINE A, FENICHEL P. (2012). Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *Int J Cancer,* **130**(1): 241-242.

DEN HOND E, PAULUSSEN M, GEENS T, BRUCKERS L, BAEYENS W, DAVID F, DUMONT E, LOOTS I, MORRENS B, DE BELLEVAUX BN, NELEN V, SCHOETERS G, VAN LAREBEKE N, COVACI A. (2013). Biomarkers of human exposure to personal care products: results from the Flemish Environment and Health Study (FLEHS 2007-2011). *Sci Total Environ,* **463-464**: 102-110.

DONG S, TERASAKA S, KIYAMA R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution,* **159**(1): 212-218.

ENGEL SM, MIODOVNIK A, CANFIELD RL, ZHU C, SILVA MJ, CALAFAT AM, WOLFF MS. (2010). Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ Health Perspect,* **118**(4): 565-571.

ENGEL SM, ZHU C, BERKOWITZ GS, CALAFAT AM, SILVA MJ, MIODOVNIK A, WOLFF MS. (2009). Prenatal phthalate exposure and performance on the Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic birth cohort. *Neurotoxicology,* **30**(4): 522-528.

FACTOR-LITVAK P, INSEL B, CALAFAT AM, LIU X, PERERA F, RAUH VA, WHYATT RM. (2014). Persistent Associations between Maternal Prenatal Exposure to Phthalates on Child IQ at Age 7 Years. *PLoS One,* **9**(12): e114003.

FERNANDEZ MAM, ANDRÉ LC, CARDEAL ZDL. (2017). Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. *Journal of Chromatography A,* **1481**: 31-36.

GRIGNARD E, LAPENNA S, BREMER S. (2012). Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol In Vitro,* **26**(5): 727-731.

HANNON PR, FLAWS JA. (2015). The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne),* **6**: 8.

HIROI H, TSUTSUMI O, MOMOEDA M, TAKAI Y, OSUGA Y, TAKETANI Y. (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J,* **46**(6): 773-778.

JAMES AT, MARTIN AJ. (1952). Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *The Biochemical journal,* **50**(5): 679-690.

KATAOKA H. (1996). Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *J Chromatogr A,* **733**(1-2): 19-34.

KATO K, SILVA MJ, NEEDHAM LL, CALAFAT AM. (2006). Quantifying phthalate metabolites in human meconium and semen using automated off-line solid-phase extraction coupled with on-line SPE and isotope-dilution high-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry. *Anal Chem,* **78**(18): 6651-6655.

KAY VR, CHAMBERS C, FOSTER WG. (2013). Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. *Crit Rev Toxicol,* **43**(3): 200-219.

KIM M, SONG NR, CHOI JH, LEE J, PYO H. (2014). Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Sci Total Environ,* **470-471**: 1408-1413.

KONDO F, IKAI Y, HAYASHI R, OKUMURA M, TAKATORI S, NAKAZAWA H, IZUMI S-I, MAKINO T. (2010). Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **85**(1): 92-96.

KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **138**(3): 863-870.

KUO HW, DING WH. (2004). Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1027**(1-2): 67-74.

KWON JH, KATZ LE, LILJESTRAND HM. (2007). Modeling binding equilibrium in a competitive estrogen receptor binding assay. *Chemosphere*, **69**(7): 1025-1031.

LA MERRILL MA, VANDENBERG LN, SMITH MT, GOODSON W, BROWNE P, PATISAUL HB, GUYTON KZ, KORTENKAMP A, COGLIANO VJ, WOODRUFF TJ, RIESWIJK L, SONE H, KORACH KS, GORE AC, ZEISE L, ZOELLER RT. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol*, **16**(1): 45-57.

LI D, PARK J, OH J-R. (2001). Silyl Derivatization of Alkylphenols, Chlorophenols, and Bisphenol A for Simultaneous GC/MS Determination. *Analytical Chemistry*, **73**(13): 3089-3095.

LI LX, CHEN L, MENG XZ, CHEN BH, CHEN SQ, ZHAO Y, ZHAO LF, LIANG Y, ZHANG YH. (2013). Exposure levels of environmental endocrine disruptors in mother-newborn pairs in China and their placental transfer characteristics. *PLoS One*, **8**(5): e62526.

MACKAY H, ABIZAID A. (2018). A plurality of molecular targets: The receptor ecosystem for bisphenol-A (BPA). *Horm Behav*, **101**: 59-67.

MALLOZZI M, BORDI G, GARO C, CASERTA D. (2016). The effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on fetal and neonatal development: A review on the major concerns. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **108**(3): 224-242.

MARIE C, VENDITTELLI F, SAUVANT-ROCHAT MP. (2015). Obstetrical outcomes and biomarkers to assess exposure to phthalates: A review. *Environ Int*, **83**: 116-136.

MATSUSHIMA A, KAKUTA Y, TERAMOTO T, KOSHIBA T, LIU X, OKADA H, TOKUNAGA T, KAWABATA S, KIMURA M, SHIMOHIGASHI Y. (2007). Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J Biochem*, **142**(4): 517-524.

MOLDOVEANU S, DAVID V. (2015a). Chapter 9 - The Role of Derivatization in Chromatography. In MOLDOVEANU S, DAVID V (Eds.), *Modern Sample Preparation for Chromatography* (pp. 307-331). Amsterdam: Elsevier

MOLDOVEANU S, DAVID V. (2015b). Chapter 10 - Chemical Reactions Used in Derivatizations. In MOLDOVEANU S, DAVID V (Eds.), *Modern Sample Preparation for Chromatography* (pp. 333-391). Amsterdam: Elsevier

MOLDOVEANU S, DAVID V. (2018). Chapter 2 - Derivatization Methods in GC and GC/MS. In KUSCH P (Ed.), *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*: IntechOpen

MOLDOVEANU SC, KISER M. (2007). Gas chromatography/mass spectrometry versus liquid chromatography/fluorescence detection in the analysis of phenols in mainstream cigarette smoke. *J Chromatogr A*, **1141**(1): 90-97.

NAIR P, ROTHBLUM S, HEBEL R. (1994). Neonatal outcome in infants with evidence of fetal exposure to opiates, cocaine, and cannabinoids. *Clin Pediatr (Phila)*, **33**(5): 280-285.

OSTREA EM, JR. (1999). Testing for exposure to illicit drugs and other agents in the neonate: a review of laboratory methods and the role of meconium analysis. *Curr Probl Pediatr*, **29**(2): 37-56.

OSTREA EM, JR., BIELAWSKI DM, POSECION NC, JR. (2006). Meconium analysis to detect fetal exposure to neurotoxicants. *Arch Dis Child*, **91**(8): 628-629.

OSTREA EM, JR., BRADY MJ, PARKS PM, ASENSIO DC, NALUZ A. (1989). Drug screening of meconium in infants of drug-dependent mothers: an alternative to urine testing. *J Pediatr*, **115**(3): 474-477.

OSTREA EM, JR., KNAPP DK, ROMERO A, MONTES M, OSTREA AR. (1994). Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. *J Pediatr*, **124**(3): 471-476.

OSTREA EM, JR., MATIAS O, KEANE C, MAC E, UTARNACHITT R, OSTREA A, MAZHAR M. (1998). Spectrum of gestational exposure to illicit drugs and other xenobiotic agents in newborn infants by meconium analysis. *J Pediatr*, **133**(4): 513-515.

OSTREA EM, JR., ROMERO A, KNAPP DK, OSTREA AR, LUCENA JE, UTARNACHITT RB. (1994). Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: clinical implications. *J Pediatr*, **124**(3): 477-479.

OSTREA EM, MORALES V, NGOUMGNA E, PRESCILLA R, TAN E, HERNANDEZ E, RAMIREZ GB, CIFRA HL, MANLAPAZ ML. (2002). Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *Neurotoxicology*, **23**(3): 329-339.

PALANZA P, NAGEL SC, PARMIGIANI S, VOM SAAL FS. (2016). Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr Opin Behav Sci*, **7**: 69-75.

PÉREZ RA, ALBERO B, FÉRRIZ M, TADEO JL. (2017). Rapid multiresidue determination of bisphenol analogues in soil with on-line derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**(19): 4571-4580.

PHILIPPAT C, BENNETT D, CALAFAT AM, PICCIOTTO IH. (2015). Exposure to select phthalates and phenols through use of personal care products among Californian adults and their children. *Environ Res*, **140**: 369-376.

PHILIPPAT C, BOTTON J, CALAFAT AM, YE X, CHARLES MA, SLAMA R, GROUP ES. (2014). Prenatal exposure to phenols and growth in boys. *Epidemiology,* **25**(5): 625-635.

PUPO M, PISANO A, LAPPANO R, SANTOLLA MF, DE FRANCESCO EM, ABONANTE S, ROSANO C, MAGGIOLINI M. (2012). Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ Health Perspect,* **120**(8): 1177-1182.

REZG R, EL-FAZAA S, GHARBI N, MORNAGUI B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int,* **64**: 83-90.

ROCHESTER JR, BOLDEN AL. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect,* **123**(7): 643-650.

SHENG Z-G, HUANG W, LIU Y-X, ZHU B-Z. (2013). Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **267**(1): 88-94.

STAPLES CA, DORN PB, KLECKA GM, O'BLOCK ST, HARRIS LR. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere,* **36**(10): 2149-2173.

SWAN SH. (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res,* **108**(2): 177-184.

SWEELEY CC, BENTLEY R, MAKITA M, WELLS WW. (1963). Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. *Journal of the American Chemical Society,* **85**(16): 2497-2507.

TAKEDA Y, LIU X, SUMIYOSHI M, MATSUSHIMA A, SHIMOHIGASHI M, SHIMOHIGASHI Y. (2009). Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. *J Biochem,* **146**(1): 113-122.

THOENE M, DZIKA E, GONKOWSKI S, WOJTKIEWICZ J. (2020). Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients,* **12**(2).

VIÑAS P, CAMPILLO N, MARTÍNEZ-CASTILLO N, HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M. (2010). Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **397**(1): 115-125.

WELLS WW, MAKITA M. (1962). The quantitative analysis of fecal neutral sterols by gas-liquid chromatography. *Anal Biochem,* **4**: 204-212.

WHITEHALL JSO, E. M.; BOLISETTY, S.; WHITEHALL, J. F.; PATOLE, S. K. (2000). Fetal exposure to pollutants in Townsville, Australia, detected in meconium. *Pediatric Research,* **47**(4).

WHYATT RM, BARR DB. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect,* **109**(4): 417-420.

WHYATT RM, LIU X, RAUH VA, CALAFAT AM, JUST AC, HOEPNER L, DIAZ D, QUINN J, ADIBI J, PERERA FP, FACTOR-LITVAK P. (2012). Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environ Health Perspect,* **120**(2): 290-295.

WOLFF MS, ENGEL SM, BERKOWITZ GS, YE X, SILVA MJ, ZHU C, WETMUR J, CALAFAT AM. (2008). Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect,* **116**(8): 1092-1097.

WORMUTH M, SCHERINGER M, VOLLENWEIDER M, HUNGERBUHLER K. (2006). What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal,* **26**(3): 803-824.

XIE C, JIN R, ZHAO Y, LIN L, LI L, CHEN J, ZHANG Y. (2015). Paraoxonase 2 gene polymorphisms and prenatal phthalates' exposure in Chinese newborns. *Environ Res,* **140**: 354-359.

ZHANG Y, LIN L, CAO Y, CHEN B, ZHENG L, GE RS. (2009). Phthalate levels and low birth weight: a nested case-control study of Chinese newborns. *J Pediatr,* **155**(4): 500-504.

EKLER

EK-1. Etik Raporu



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:21-1413-18	Tarih:25 Aralık 2018	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

EK-2. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İzni

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Başkanlığı
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Sayı : 69545805-100-E.1334 07.01.2020
Konu : İzin Belgesi hk.

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Adli Bilimler Enstitüsü Adli Kimya ve Adli Toksikoloji doktora programı öğrencisi 15725403 numaralı Kenan Can TOK'un *"Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması"* adlı doktora tez çalışması için Anabilim Dalımızın bilgisi ve izni bulunmaktadır.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Saadet ARSAN
Anabilim Dalı Başkanı

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Balkiraz Mahallesi 06620 Mamak/ANKARA
Telefon No: 0312 319 14 41 Belge Geçer No: 0312 319 14 40
e-posta: cocukhas@medicine.ankara.edu.tr internet adresi: -

Bilgi için:Meral SELVİ
Bilgisayar İşletmeni
Telefon No:(312) 595 60 00-6402

EK-3. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Başkanlığı
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Sayı : 12405952-604.01.01-E.53391 24.10.2018
Konu : Doktora Tez Projesi İçin Materyal İzni hk

CEBECİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA HASTANESİ BAŞHEKİMLİĞİNE

Anabilim Dalımıza başvuran Adli Bilimler Enstitüsü Adli Kimya ve Adli Toksikoloji doktora programı öğrencisi 15725403 numaralı Kenan Can TOK'un doktora tez çalışması için Anabilim Dalımız gerekli izinleri vermiştir.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Feride SÖYLEMEZ
Anabilim Dalı Başkanı

Ek : Dilekçe (1 sayfa)

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Balkiraz Mahallesi 06620 Mamak/ANKARA
Telefon No: 0312 320 35 50 Belgegeçer No: 0312 320 35 53
e-posta: kadindog@medicine.ankara.edu.tr internet adresi: -

Bilgi için:Fevzi BAĞCI
Memur
Telefon No:(312) 595 69 17

EK-4. Onam Formu

Aydınlatılmış Onam Formu

Araştırmanın adı: Mekonyum Örneklerinde Çeşitli Toksik Maddelerin Araştırılması

Giriş

Sayın gönüllü,

Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Çocuk Hastanesi bünyesinde yapılacak olan bu çalışmaya davet edilmiş bulunuyorsunuz. Bu araştırmada yer almayı kabul etmeden önce, araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme çerçevesinde özgürce vermeniz gerekmektedir. Aşağıdaki bilgileri lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınız olursa sorunuz ve açık yanıtlar isteyiniz.

Mekonyum memelilerin doğum sonrasında yaptığı ilk dışkıdır. Mekonyum içerisinde daha sonraki dışkılardan farklı olarak bebeğin rahimde geçirdiği süre boyunca yutulan materyalleri, bağırsak hücrelerini, ayva tüylerini, mukusu, amniyotik sıvıyı, safrayı ve suyu barındırır. Günümüzde mekonyum, ana karnında bulunan bebeğin maruz kaldığı çeşitli kimyasalların ve ilaçların tayininde kullanılabilmektedir. Çalışmamızda mekonyumdaki hormon bozucu kimyasallar (BPA, Triklosan, Ftalatlar), toksik metaller (Co, Ni, Cr, Pb, Sb, As ve Cd) ve haşere ilaçları (DDT, Lindane, Malathion, Parathion, Diazinon) analiz edilecektir. Bu çalışma, dışkıdan alınan örneklerin kimyasal analizini ve yorumlanmasını kapsamaktadır.

Çalışma için bebeğinizin ilk dışkısından yaklaşık 5 gramlık bir örnek alınacaktır. Bu işlem sizden ve bebeğinizden bağımsız olup yalnızca bez üzerindeki dışkıdan örnekleme yapılacaktır. Bu işlem sizin veya bebeğiniz için kesinlikle bir risk oluşturmamaktadır. Çalışma için 100 farklı bebeğin ilk dışkısından örnek toplanması hedeflenmektedir.

Normal doğum veya sezaryen ile komplikasyonsuz olarak 38-41 hafta içerisinde doğmuş, 2500-4500 gr ağırlığında olan ve ebeveyn izni olan bebekler çalışmaya dahil edilecektir.

Erken doğan (prematürite), doğum sırasında komplikasyon yaşayan, 2500 gramdan az veya 4500 gramdan fazla doğum ağırlığı bulunan, ilk 48 saatini doldurmuş olan bebekler çalışmaya alınmayacaktır.

Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra yarıda bırakabilirsiniz. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından araştırmadan çıkarılmanız halinde, sizle ilgili veriler kullanılmayacaktır. Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilecektir. Dolayısıyla bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilecek ve gizliliğiniz sağlanacaktır.

Onay

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (ya da sözlü olarak dinledim). Eksik kaldığını düşündüğüm konularda sorularımı araştırmacılara sordum ve doyurucu yanıtlar aldım. Yazılı ve sözlü olarak tarafıma sunulan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığım kanısındayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğim konusunda karar vermem için yeterince zaman tanındı.

Bu koşullar altında, araştırma kapsamında elde edilen şahsıma ait bilgilerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama altında kalmaksızın, kendi özgür irademle kabul ettiğimi beyan ederim.

☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐ Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum (Bu kutuyu seçmem durumunda, bu çalışmaya katılmayacağımı anlıyorum).

Katılımcının;	Araştırmacının;	Araştırmacının;	Araştırmacının;
Adı, Soyadı:	Adı, Soyadı: Prof. Dr. Aslıhan AVCI	Adı, Soyadı: Prof. Dr. Saadet ARSAN	Adı, Soyadı: Arş. Gör. Kenan Can TOK

ÖZGEÇMİŞ