

**SUDA BAZI ÖSTROJENİK STEROİDLERİN GAZ
KROMATOĞRAFİSİ - KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE
TAYİNİ**

**DETERMINATION OF SOME ESTROGENIC STEROIDS IN
WATER BY GAS CHROMATOGRAPHY- MASS
SPECTROMETRY**

ÖZLEM KIRMIZIBAYRAK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Perihan ÇAĞLAR

Üye : Prof. Dr. Bekir SALİH

Üye : Prof. Dr. Nuray ÖĞÜN ŞATIROĞLU

Üye : Doç. Dr. Serdar ABACI

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

SUDA BAZI ÖSTROJENİK STEROİDLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ - KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE TAYİNİ

Özlem Kırmızıbayrak

ÖZ

İnsanlar ve hayvanlar tarafından vücut dışına atılan östrojenik maddeler nihai olarak suya karışırlar. Bu maddeler doğal bileşikler olabildiği gibi çeşitli amaçlarla kullanılan sentetik bileşikler de olabilirler ve sudaki canlı hayatını, insan sağlığını olumsuz etkileyen sonuçlara yol açabilmektedirler.

Çok düşük derişimlerde bile etkili olabilen östrojenlerin analizi için yüksek hassasiyete sahip yöntemler kullanılmalıdır. Öte yandan günümüzde analizler için çevre dostu yaklaşımlar denenmektedir. Bu çalışmanın amacı, doğal bir östrojen olan 17 β -estradiol (E2) ve sentetik bir östrojenik madde olan dietilstilbestrolün (DES) suda analizi için kolay, düşük maliyetli, güvenilir bir yöntem geliştirmek ve yöntemin geçerliliğini gösteren çalışmaları yapmaktır.

Yöntem geliştirme basamağında son yıllarda ortaya çıkan yeni bir teknik olan dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme (DLLME) kullanılmıştır. Özütleme basamağında çözücü türleri, hacimleri, geri kazanım ve tekrarlanabilirliklerine göre karşılaştırılarak, en iyi sonuçları veren çözücüler ve miktarları belirlenmiştir. Bunların dışında özütleme süresinin ve tuz eklemenin yönteme etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerli kılınması çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda çalışılan analitler için özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, geri kazanım parametreleri incelenmiştir. Yöntemin gerçek örneklerdeki performansı araştırılmış ve gerçek örneklere uygulanabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 17 β -estradiol, dietilstilbestrol, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme

Danışman: Prof.Dr. Perihan ÇAĞLAR, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

DETERMINATION OF SOME ESTROGENIC STEROIDS IN WATER BY GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

Özlem Kırmızıbayrak

ABSTRACT

Estrogenic substances excreted by human beings and animals are finally discharged into water. These substances could be both natural compounds and synthetic compounds used for various reasons and they can lead some adverse effects on human health and wildlife.

Analysis of estrogens which can be effective even in low concentrations requires very sensitive methods. On the other hand, researchers try environment-friendly approaches. The purpose of this study was to develop and to validate a simple, low cost, reliable method for a natural estrogen 17 β -estradiol (E2) and for a synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES).

For the method development step dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) which has been introduced in recent years was used. In order to optimize extraction procedure, types and volumes of these solvents were compared by considering recoveries and repeatabilities. Solvents and their volumes which gave best results were determined. Moreover the effects of extraction time and salt addition on the method were examined. The validation of the developed method was performed by studying specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification, recovery parameters. The performance of the method was studied in real samples and the applicability of the method was shown.

Keywords: 17 β -estradiol, diethylstilbestrol, gas chromatography-mass spectrometry, dispersive liquid-liquid microextraction

Advisor: Prof.Dr. Perihan ÇAĞLAR, Hacettepe University, Department of Chemistry

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarımda beni her zaman yűreklendiren, yol gűsteren hocam Prof. Dr. Perihan Çaęlar'a, laboratuvarındaki imkanları içtenlikle sunan ve her tűrlű kolaylıęı saęlayan hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e ve ekibine, bana verdięi destek için eőim Devrim Kırmızıbayrak'a ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teőekkűrler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	2
2.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar (EDC).....	2
2.2. Östrojenik Steroidler.....	2
2.2.1. Östrojenlerin sudaki analizleri.....	4
2.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi.....	7
2.3.1. Gaz Kromatografisi.....	7
2.3.2. Kütle Spektrometrisi.....	9
2.3.3. GC-MS ile veri elde etme.....	13
2.3.4. GC-MS ile nitel analiz.....	13
2.3.5. GC-MS ile nicel analiz.....	14
2.3.6. Türevlendirme.....	14
2.4. Dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Cihazlar.....	21
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	21
3.1.3. Analitik standart maddeler.....	22
3.1.4. Stok çözeltilerin hazırlanması.....	22
3.1.5. Türevlendirme çözeltilisinin hazırlanması.....	23
3.2. Yöntem Geliştirme.....	23
3.2.1. Özütleme çözücüsünün ve dispersif çözücünün seçimi.....	23

3.2.2. Özütleme çözücüsünün uygun hacminin araştırılması.....	24
3.2.3. Dispersif çözücünün uygun hacminin araştırılması.....	24
3.2.4. Özütleme süresinin etkisi.....	24
3.2.5. İyonik şiddetin etkisi.....	25
3.2.6. GC-MS Uygulamaları.....	25
3.3. Yöntemi Geçerli Kılma Çalışmaları.....	28
3.3.1. Özgünlük.....	28
3.3.2. Doğrusallık.....	28
3.3.3. Doğruluk,geri kazanım ve kesinlik.....	29
3.3.4. Gözlenebilme sınırı.....	29
3.3.5. Alt tayin sınırı.....	29
3.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Yöntem Geliştirme.....	31
4.1.1. Özütleme çözücüsünün ve dispersif çözücünün seçimi	31
4.1.2. Özütleme çözücüsünün uygun hacminin seçimi.....	34
4.1.3. Dispersif çözücünün uygun hacminin seçimi.....	35
4.1.4. Özütleme süresinin etkisinin incelenmesi.....	36
4.1.5. İyonik şiddetin etkisinin incelenmesi.....	38
4.2. Yöntemi Geçerli Kılma Çalışmaları.....	39
4.2.1. Özgünlük.....	39
4.2.2. Doğrusallık.....	40
4.2.3. Doğruluk, geri kazanım ve kesinlik.....	42
4.2.4. Gözlenebilme sınırı.....	43
4.2.5. Alt tayin sınırı.....	43
4.3. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması.....	43
5. SONUÇLAR.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil.2.1. DES ve E2'nin kimyasal yapıları.....	4
Şekil 2.2. Gaz kromatografisinin çalışma ilkesi	9
Şekil 2.3. Kütle spektrometresinin genel gösterimi	10
Şekil 2.4. xz-düzleminde bir kuadropolün çalışması.....	12
Şekil 2.5. Bu çalışmada kullanılan dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme işleminin gösterimi.....	18
Şekil 3.1. DES ve E2 standartlarına ait kromatogram (MSTFA ile türevlendirilmiş).....	27
Şekil 3.2. DES standardına ait kütle spektrumu (MSTFA ile türevlendirilmiş)	27
Şekil 3.3. E2 standardına ait kütle spektrumu (MSTFA ile türevlendirilmiş).....	28
Şekil 4.1. Çözücü kombinasyonlarının DES'in özütlenmesi için karşılaştırılması.....	32
Şekil 4.2. Çözücü kombinasyonlarının E2'nin özütlenmesi için karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.3. Özütleme çözücüsü hacminin DES'in özütlenmesine etkisi.....	35
Şekil 4.4. Özütleme çözücüsü hacminin E2'nin özütlenmesine etkisi.....	35
Şekil 4.5. Dispersif çözücü hacminin DES'in özütlenmesine etkisi.....	36
Şekil 4.6. Dispersif çözücü hacminin E2'nin özütlenmesine etkisi.....	36
Şekil 4.7. Özütleme süresinin DES'in özütlenmesine etkisi.....	37
Şekil 4.8. Özütleme süresinin E2'nin özütlenmesine etkisi.....	37
Şekil 4.9. İyonik şiddetin DES'in özütlenmesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.10. İyonik şiddetin E2'nin özütlenmesi üzerine etkisi	38
Şekil 4.11. Boş su örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram.....	39
Şekil 4.12. DES ve E2'nin standartlarının eklendiği su örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram.....	39
Şekil 4.13. Boş ve ekleme yapılmış örneklerin kromatogramlarının birlikte gösterilişi	40
Şekil 4.14. DES için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi.....	40
Şekil 4.15. E2 için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelde 2.1. Östrojenlerin sulardaki varlığı.....	3
Çizelge 2.2. Seçilen östrojenlerin bazı fizikokimyasal özellikleri.....	4
Çizelge 2.3. Kütle spektrometrisinde kullanılan iyon kaynakları.....	10
Çizelge 2.4. Sililleme ajanları.....	16
Çizelge 3.1. Örneklere eklenen standart derişimleri ve hacimleri.....	22
Çizelge 3.2. Özütleme çözücülerinin bazı fiziksel özellikleri.....	23
Çizelge 3.3. GC-MS çalışma koşulları.....	25
Çizelge 3.4. GC'de kullanılan sıcaklık programı.....	26
Çizelge 3.5. Analitlerin GC-MS'deki özellikleri.....	26
Çizelge 4.1. Asetonitrilin dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları	31
Çizelge 4.2. Asetonun dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları	31
Çizelge 4.3. Metanolün dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları	32
Çizelge 4.4. Çözücü kombinasyonlarının DES ve E2'nin özütlenmesi için karşılaştırılması	34
Çizelge 4.5. DES'e ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-20 ng/mL aralığında).....	41
Çizelge 4.6. E2'ye ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-20 ng/mL aralığında).....	41
Çizelge 4.7. E2'ye ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-10 ng/mL aralığında).....	42
Çizelge 4.8. DES için doğruluk, geri kazanım ve kesinlik çalışmasının sonuçları.....	42
Çizelge 4.9. E2 için doğruluk, geri kazanım ve kesinlik çalışmasının sonuçları.....	43
Çizelge 4.10. 5 ng/mL derişimindeki gerçek örneklere ait geri kazanım	43
çalışması	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E2	17 β -estradiol
DES	Dietilstilbestrol
DLLME	Dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
LC	Sıvı kromatografisi
SCAN	Toplam iyon taraması
SIM	Seçilmiş iyon taraması
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid
DTE	Dithioerythritol

1. GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasallar özellikle son yıllarda bilimsel çevrelerin dikkatini çekmiştir ve bu alandaki çalışmalar artmıştır. Bunun nedeni bu maddelerin hem insan sağlığında hem de vahşi hayatta yaratabileceği olumsuz etkilerdir. Endokrin bozucu kimyasallar bir tür kimyasal özellikleri nedeniyle değil, yarattıkları etkinin ortak olması nedeniyle aynı isim altında sınıflandırılırlar.

Östrojenik hormonlar da endokrin bozucu kimyasallardandır. Vücuttan atılan bu maddeler sonunda suya karışır. Bu durum özellikle sudaki canlı hayatı için tehdit oluşturmakla birlikte insanlar üzerinde de etkileri olabilmektedir. Östrojenik hormonlar suda çok düşük derişimlerde bulunurlar (Pacakova et al., 2009). Dolayısıyla bunların analizi çok hassas teknikler gerektirir. Bu teknikler zaman alıcı, maliyetli işlemlerden oluşur.

Çalışmamızda doğal bir östrojen olan 17β -estradiol (E2) ve sentetik bir madde olan dietilstilbestrolün (DES) sudaki analizi için kolay, düşük maliyetli ve kısa sürede çalışılabilen bir yöntem geliştirilmiş ve bu amaçla örneğin hazırlanmasında son yıllarda ortaya çıkan bir teknik olan dispersif sıvı sıvı mikroözütleme yöntemi, kullanılarak, analizler gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile yapılmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar (EDC)

Endokrin sistem, salgıladıkları hormonları dolaşım sistemine veren salgı bezlerinden oluşur. Endokrin bozucular, endokrin sisteminin işleyişini değiştirerek sağlam organizmada ya da onun yavrularında olumsuz etkiye neden olan dışkaynaklı bileşik ya da karışımlardır (Mills et al., 2005). EDC'ler endojen hormonları taklit edebilirler veya endokrin sisteminin normal hormonal aktivitesini engellerler (Roepke et al., 2005). EDC'lerin sperm sayısının düşmesinde, cinsiyet oranının değişmesinde, meme kanseri vakalarının artışında etkilerinin olabileceğine dair çalışmalar vardır (Zhang et al., 2008). Bu maddeler vahşi yaşamda ise gelişimi ve üremeyi etkileyebilmektedirler. Örneğin, doğal bir hormon olan 17 β -estradiolün 1 ng/L gibi düşük bir derişiminin bile erkek alabalıkta dişilere özgü bir protein olan vitellogenin oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Sarmah et al., 2006).

Endokrin sisteminin karmaşıklığı göz önüne alındığında doğal ya da sentetik çok çeşitli kimyasalların endokrin bozucu etkiye sahip olmaları şaşırtıcı değildir. Bir "Avrupa Birliği" çalışmasına göre 118 madde potansiyel endokrin bozucu kimyasal olarak sınıflandırılmıştır. Aralarında 17 β -estradiolün de bulunduğu bazı maddelere ise özel bir öncelik verilmiştir (Auriol et al., 2006).

2.2. Östrojenik Steroidler

Steroid hormonlar kolesterolden sentezlenen lipofilik, düşük molekül ağırlıklı, biyolojik aktiviteye sahip bileşikler grubudur (Noppe et al., 2008). Steroid hormonlar fizyolojik etkileri ile insan ve hayvan ilaçlarında geniş bir uygulama alanı bulurlar ve hali hazırda bazı hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli rol oynarlar. Bununla beraber, 1980'lerden sonra steroid hormonlar, yasadışı olarak hayvancılıkta büyüme hızını arttırmak için kullanılırken spor alanında da doping maddesi olarak kullanılmışlardır. Çok sayıda araştırma steroid hormonların çoğunun potansiyel kanserojenik etkiye sahip olduğunu, steroid hormonların uzun süreli alımlarının ise endokrin bozukluklarına ve gelişimsel anomalilere yol açtığını göstermiştir (Kai et al., 2010).

Steroid hormonların büyük bir kısmı endokrin bozucu kimyasallar grubuna aittir. Böyle maddelerin bozunması zordur ve çevrede biyolojik birikimleri kolaydır (Kai et al., 2010). Orme'nin, doğal östrojenlerin büyük bir kısmının insan ve hayvanlar tarafından sülfat ve glukoronit eşlenikleri halinde idrarla, küçük bir kısmının ise dışkıyla atıldığını bildirdiği bilinmektedir (Qin et al., 2008). Sülfat ve glukoronit eşlenikleri serbest östrojenlere kıyasla biyolojik olarak inaktiftir. Bununla birlikte, eşlenikler enzimatik hidroliz ya da kimyasal parçalanmalarla serbest hallerine dönüşebilirler (Qin et al., 2008).

Bu gruptaki bileşikler eser miktarlarına rağmen atıksu arıtma işleminde tamamen ortadan kaldırılamaz. Avrupada kullanılan aktifleşmiş çamurla 14 saat hidrolik temas 17 β -estradiolün %85'ini ortadan kaldırır. Östrojenler yüzey sularında pg/L den ng/L seviyesine kadar bulunurlar (Bodzek and Dudziak, 2006). Östrojenlerin sulardaki varlığını gösteren bazı çalışmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Östrojenlerin sulardaki varlığı

Matriks	Analit	Tespit edilen miktar	Referans
Atık sular	E1, E2, EE2	0,2-76 ng/L	Desbrow et al.
Atık sular	E1, E2, EE2	0,4-47 ng/L	Belfroid et al.
Nehir suyu	E1, E2, EE2	0,1-5,5 ng/L	Belfroid et al.
Nehir suyu	E1, E2, EE2	0.04-1,5 ng/L	Baronti et al.
İçme suyu	E1, E2, EE2	0,3-0,7 ng/L	Kuch et al.
Atık sular	E1, E2, EE2	0,9-3,4 ng/L	Kuch et al.

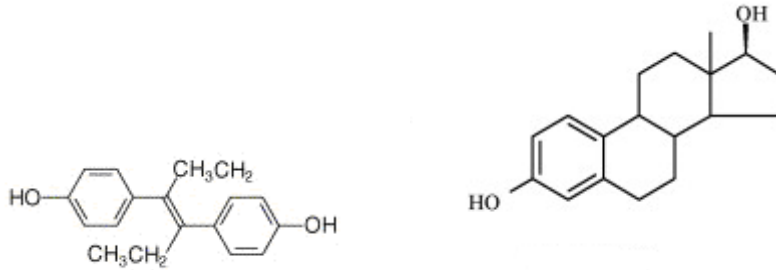
E1:Estron, E2:17 β -estradiol, EE2:17 α -etinilestradiol

Çalışmamızda doğal bir hormon olan 17 β -estradiol ve sentetik bir östrojen olan DES kullanılmıştır. Bu maddelerin bazı fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.2'de kimyasal yapıları Şekil 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Seçilen östrojenlerin bazı fizikokimyasal özellikleri (Kuster et al., 2004)

Analit	Molekül ağırlığı (g/mol)	Sudaki çözünürlük (mg/L)	Log Pow ^a
17β-estradiol	272,4	13	4.01
Dietilstilbestrol	268,4	12	5.07

a:oktanol-su dağılıma katsayısı



Şekil.2.1. DES ve E2'nin kimyasal yapıları

2.2.1. Östrojenlerin sudaki analizleri

Östrojenler çevrede çok düşük derişimlerde bulunurlar. Mevcut analitik yöntemler yeterince hassas olmadığı için bir önderiştirme basamağı uygulanır. Tipik bir örnek hazırlama işlemi süzme, özütleme, saflaştırma, hidroliz, türevlendirme ve uçurma gibi çeşitli basamaklardan oluşur (Lopez de Alda and Barcelo, 2001a). Östrojen eşleniklerinin analizleri, kimyasal ya da enzimatik hidroliz gerektirir ve eşleniklerin derişimi, serbest östrojenlerin, hidroliz yapılarak ve hidroliz yapılmadan bulunmuş derişimleri arasındaki fark ile bulunur (Qin et al.,2008). Analitlerin tayini öncesi yapılacak işlemler, örnek matriksinin çeşidine, karmaşıklığına ve analitlerin türüne, sayısına ve derişimlerine bağlıdır (Pacakova et al., 2009).

Örnek hazırlama işlemindeki en kritik basamak özütleme/saflaştırma basamağıdır. Bu işlemler örneğin türüne göre farklı yollarla yapılabilir. Günümüzde en çok kullanılan yöntem katı faz özütlemesidir (SPE) (Lopez de Alda and Barcelo,2001a)

Bununla birlikte sıvı sıvı özütlemenin kullanımı da bildirilmiştir (Pedersen et al., 2005). Ancak sıvı-sıvı özütleme yüksek miktarlarda organik çözücü ve ilave saflaştırma basamakları gerektirir (Kawaguchi et al., 2004). Katı faz özütlemesi için çok çeşitli sorbentler ve cihazlar ticari olarak mevcuttur. Bunların arasında yapılacak seçim, örneğin türü, gerekli olan seçicilik ve hassasiyet, maliyet gibi bir dizi faktöre bağlıdır. Östrojenlerin çevresel matrislerden katı faz özütlemesi, saflaştırılması çoğunlukla oktadesil (C18) silika bağlı fazlar, polimerik sorbentler ya da bunların kombinasyonuyla yapılır (Lopez de Alda and Barcelo, 2001a).

Watabe et al. E2 için moleküler baskılanmış polimer sentezlemiştir. Yüzey modifiye moleküler baskılanmış polimerler, örnekler için önişlem kolonu olarak kullanılmıştır. Irmak suyu örneklerinde sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile yapılan ölçümlerde 1.8 ng/L gözlenebilme sınırına ulaşılmıştır (Watabe et al., 2006).

Bu alanda floresans ölçümüne dayalı biyosensörler ile yapılan çalışmalar da vardır (Wozei et al., 2005).

Wang et al. sudaki östrojenlerin tayinini bulutlanma noktası özütlemesi yöntemiyle ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektör (HPLC-UV) kullanarak yapmışlardır. Triton-X-114'ü özütleme çözücüsü olarak kullanmışlardır ve bu yöntemle östrojenler için 0,23 ng/mL ile 0,32 ng/mL arasında değişen gözlenebilme sınırları elde etmişlerdir (Wang et al., 2006).

Östrojenlerin analizinde DLLME'nin kullanıldığı çalışmalar Chang et al.(2010) ve Du et al. (2010) tarafından bildirilmiştir. Chang et al.(2010) çalışmalarında DLLME'yi farklı bir şekilde uygulamışlardır (Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of organic drop, DLLME-SFO). Bu yöntemde, düşük özkütleli çözücüler özütleyici olarak kullanılır ve böylece santrifüjden sonra yüzeyde yüzen sıvı bir organik damla bulunur. Çözeltinin soğutulmasıyla bu damla donar ve kolayca sudan ayrılır, damla eritilerek işleme devam edilir. Chang et al., çalışmalarında musluk suyu için gözlenebilme sınırını 1,4-3,1 µg/L olarak bulmuşlardır. Du et al. östrojenlerin özütlenmesinde DLLME'yi uygulamışlardır. Analizi ise LC ile yapmışlardır. Bu çalışmanın gözlenebilme sınırı 0,1 ng/mL'dir.

Bir başka minyatürize teknik olan katı-faz mikroözütlemesi de (SPME) GC ve LC ile birlikte östrojenlerin analizinde kullanılmaktadır (Mitani et al.; 2005, Yang et al., 2006). SPME'nin SPE'ye göre bir avantajı çözücü kullanımının azaltılmış olmasıdır (Pacakova et al., 2009).

Östrojenlerin tayininde kullanılan en yaygın yöntem GC-MS'dir (Nakamura et al., 2001; Mouatassim-Souali et al., 2003; Quintana et al., 2004; Zuo et al., 2007). Bununla birlikte, biyolojik yöntemler de kullanılmaktadır ve son yıllarda LC-MS kullanımı da artmıştır (Lopez de Alda et al., 2001b).

GC, çevresel örneklerdeki östrojenlerin analizinde sıklıkla kullanılır. GC'nin üstünlüğü yüksek ayırma verimi, yüksek analiz hızı, çok seçici dedektörlerin varlığı ve kullanılan hareketli fazın inert gaz olması nedeniyle çevreye dost oluşudur.

Çevresel matrislerde östrojenlerin tayininde en çok kullanılan teknik GC-MS ve GC-MS-MS dir. GC ayırmasında çok çeşitli kapiler kolonlar kullanılırken helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılır. Östrojenler türevlendirme yapılmadan GC ile doğrudan analiz edilebilir. Bununla birlikte daha uçucu türevlere dönüştürme işlemi genellikle tercih edilir. En yaygın türevlendirme tekniği aktif hidrojen içeren analitlere uygun silillemedir. Sonuçta oluşan türevin polaritesi azaltılmış, uçuculuğu artmış ve ısıl kararlılığı iyileştirilmiş olur. Östrojenleri silillemek için N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid (MSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil)trifloroasetamid (BSTFA), N-(tert-bütildimetilsilil)-N-metiltrifloroasetamid (MTBSTFA) gibi türevlendirme ajanları kullanılır (Pacakova et al., 2009).

Diyot array dedektör (DAD)(Lopez de alda and Barcelo, 2001a), floresans (Yoon et al., 2003) ve kütle(Isobe et al., 2003, Mitani et al., 2006) gibi tayin sistemlerinin kullanıldığı sıvı kromatografi çevresel matrislerdeki östrojenlerin analizinde kullanılır. Östrojenlerin LC'deki ayrılmaları genellikle oktadesil silika durgun fazda (25 cm × 4,6 mm iççap, 5µm parçacık boyutu) su asetonitril karışımının hareketli faz olarak kullanılmasıyla yapılır (Petrovic et al., 2002).

Hem GC-MS hem de LC-MS doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından tatmin edicidir. Bununla birlikte genellikle GC-MS ya da GC-MS-MS analizinden önce

gerçekleşen türevlendirme basamağı zaman alıcı olmasının yanında bir hata kaynağı oluşturabilir. GC-MS'in LC-MS'e bir üstünlüğü de kütle spektrumu kütüphanelerinin varlığıdır (Petrovic et al., 2002).

Östrojenlerin çevresel örneklerdeki analizleri için immunoassayler yararlı yöntemlerdir (Farre et al., 2007;Huang and Sedlak, 2009). İmmunoözütme tekniklerinde katı faz özütme kartuşları hedef bileşiklere özgü antibadiler ile doldurulmuştur ve silika bazlı sorbentler üzerine bağlıdır. İmmunosorbentlerin kullanılmasıyla özütme, zenginleştirme ve temizleme (clean-up) tek basamakta gerçekleştirilir (Mozaz et al. 2007). Bu yöntemler antibadi bağlanma reaksiyonlarına dayanırlar, genellikle hassas ve özgündürler. Fakat serbest östrojenlerin analizi için sadece birkaç antibadi mevcuttur ve çapraz reaksiyonlar hala problem teşkil etmektedir (Qin et al., 2008).

2.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

Gaz kromatografisi – kütle spektrometrisi iki güçlü analitik tekniğin kombinasyonudur. Gaz kromatografisi bir ayırma tekniği, kütle spektrometrisi ise bir teşhis tekniğidir. Bu kombinasyon birçok avantaja sahiptir. Birincisi, bu teknikle nitel analiz amacıyla karmaşık yapıları bir karışım bileşenlerine ayrılır, her bir bileşiğin kütle spektrumu elde edilir; ikincisi bu bileşiklerin miktarıyla ilgili bilgi elde edilir. GC-MS ile analitin birkaç femtomolünden bütün bir kütle spektrumu elde edilebilir. Bu spektrum kütle için doğrudan kanıt sağlar ve elektron iyonlaşma tekniğinin kullanıldığı durumlarda da tespit için temel alınacak karakteristik parçalanma ürünleri veya kimyasal parmakizini sağlar (Watson and Sparkman, 2008).

2.3.1. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografide örnek buharlaştırılır ve kromatografik kolonun girişine enjekte edilir. Hareketli faz olarak görev yapan taşıyıcı gaz, örneği kolon boyunca taşır. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz örnekteki moleküllerle etkileşmez (Skoog vd., 1998). Kolondan ayrılan örnek bileşenleri dedektöre ulaşır.

GC sistemi şu bileşenlerden oluşur:

-gaz sağlama sistemi

- enjektör
- kolon ve fırın
- dedektör
- veri sistemi

Gaz sağlama sisteminin amacı, temiz, kuru ve saf taşıyıcı gaz sağlamaktır (Tebbett, 1994). Taşıyıcı gaz olarak helyum, azot, hidrojen gibi inert gazlar kullanılır. Gaz seçimi kullanılan dedektöre bağlıdır (Skoog vd., 1998). Enjektöre verilmeden önce suyu, hidrokarbonları ve oksijeni uzaklaştırmak için taşıyıcı gaz bir dizi tuzaktan süzölür (Tebbett, 1994).

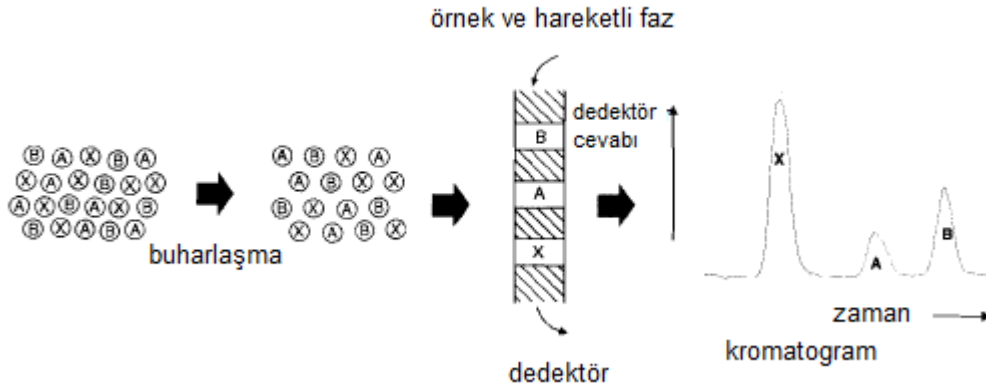
Enjektörün amacı belirli hacimdeki örneği çalışma basıncında sisteme vermektir. Yavaş enjeksiyon veya fazla miktarda örnek verilmesi, pik genişlemesine ve düşük ayırma gücüne neden olur. En yaygın enjeksiyon yöntemi sızdırmaz enjektör kullanımındır. Enjeksiyon, silikon bir lastik diyaframdan veya bir septumdan yapılır. Septumun hemen arkasında, kolonun giriş ucunda hızlı buharlaştırıcı bölme bulunur. Bu bölme, örnek içinde kaynama noktası en yüksek maddenin kaynama noktasından 50 °C kadar yüksek sıcaklığa ısıtılır (Skoog vd., 1998).

Gaz kromatografi sisteminin merkezi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kolon içindeki sabit faz silika, alumina veya karbon gibi katı bir madde ise yöntem gaz-katı kromatografisi denir. Ayırma analitlerin katı faz üzerindeki farklı adsorpsiyon ilgilerine dayanır. Gaz kromatografisi yönteminin en yaygın kullanılan türünde ise sabit faz inert bir katı dolgu maddesi üzerine tutturulmuş uçucu olmayan sıvı bir filmidir ve bu yöntem gaz-sıvı kromatografisi denir. Böylece 2-10 mm iç çaplı, 1-5 m boyundaki kolonlar yerine 0,2-0,5 mm iç çapında ve 10-50 m boyundaki kapiler borular gaz kromatografi kolonu olarak kullanılabilir (Yıldız vd.,1997).

Gaz kromatografide çok çeşitli dedektörler kullanılır. Belirli bir analiz için kullanılacak dedektör, hassasiyet, seçicilik, doğrusallık gibi parametrelere ve ilgilenilen dedektörün analitlere cevap verme yeteneklerine göre seçilir. Dedektörler seçici dedektörler ve evrensel dedektörler olarak sınıflandırılabilir. Seçici dedektörler sadece belirli heteroatomları içeren bileşiklere cevap verirken

evrensel dedektörler kolondan gelen her bileşiğe cevap verir (Grob and Barry, 2004).

Gaz kromatografisinin çalışma prensibi Şekil 2.2’de özetlenmiştir. X çözücüsü içinde çözülmüş A ve B maddelerinden oluşan karışım GC’ye enjekte edildiğinde buharlaşır. Hareketli faz, oluşan buharı kolon boyunca taşır. Örnek, kolonda organik durgun faz ve hareketli faz arasında dağılır. X çözücüsü durgun faz ile çok az etkileşir (ideal olanı hiç etkileşmemesidir). Bu yüzden kolondan çıkan ilk bileşen X çözücüsü olur. A ve B bileşenlerinin kolondaki hareketi boyunca, B’nin durgun fazdaki çözünürlüğü A’nın durgun fazdaki çözünürlüğünden fazladır. Bu, B’nin kolonda A’nın tutulduğundan daha fazla tutulacağını gösterir. Sonuçta A kolondan B’den daha önce çıkar. Kolonun sonundaki dedektör, taşıyıcı gaza ek olarak organik bir madde gelmesiyle elektriksel bir cevap üretir. Dedektör cevabının zamana karşı grafiği kromatogramı oluşturur. GC-MS tekniği kullanıldığında kolondan çıkan saf bileşen kütle spektrometresinin iyon kaynağına girer (Watson and Sparkman, 2008).



Şekil 2.2. Gaz kromatografisinin çalışma ilkesi (Watson and Sparkman, 2008)

2.3.2. Kütle spektrometrisi

Kütle spektrometrisinin temel prensibi inorganik ya da organik bileşiklerden uygun bir yöntemle iyonlar oluşturmak, bu iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırmak ve bunların kütle/yük oranlarını ve bolluklarını ayrı ayrı nitel ve nicel olarak tespit etmektir (Gross, 2004).

Bütün kütle spektrometrelerinin Şekil 2.3’de gösterildiği gibi üç ana bileşeni vardır:

- iyon kaynağı
- kütle analizörü

-iyon dedektörü



Şekil 2.3. Kütle spektrometresinin genel gösterimi (Gross,2004)

İyon kaynağının görevi molekülleri yüklü ya da iyonlaşmış hale dönüştürmektir. İyonların oluşmasından sonra bir kütle analizörü ile elektrik ve manyetik alanın uygulanmasıyla iyonlar kütle /yük oranlarına göre ayrılırlar. Sinyal şiddetinin m/z oranına karşı çizilmiş iki boyutlu gösterimi kütle spektrumudur. İyonun şiddeti, iyon kaynağında analitten oluşan farklı m/z oranına sahip iyonik türlerin bolluğunu yansıtır (Gross, 2004). Moleküler kütle spektrometrelerinde kullanılan iyon kaynakları Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

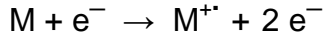
Çizelge 2.3. Kütle spektrometrisinde kullanılan iyon kaynakları (Skoog vd.,1998)

Temel Tip	Adı ve Kısaltması	İyonlaştırıcı
Gaz Fazı	Elektron impakt (EI)	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek –potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek –potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımcı desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	²⁵² Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometri(SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termosprey iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

Gaz fazı iyon kaynaklarının kullanımı kaynama noktaları 500°C’den küçük termal olarak kararlı maddeler ile sınırlıdır, çoğunlukla mol kütleleri 10³ daltondan daha küçük bileşikler incelenebilir. Analitin uçucu olmasının gerekmediği desorpsiyon

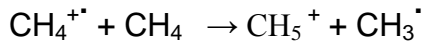
kaynakları, mol kütlesi 10^5 daltona kadar olan yüksek molekül ağırlıklı analitlere uygulanabilir (Skoog vd., 1998).

En yaygın iyonlaştırma tekniği olan elektron iyonlaştırma tekniğinde, gaz fazındaki nötr moleküle kendi elektronlarından birini fırlatmaya yetecek kadar enerji transfer edilir ve molekül pozitif yüklenmiş olur (Watson and Sparkman, 2008).

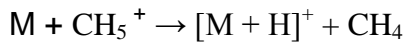


M^+ iyonuna moleküler iyon denir. Bu M^+ iyonu belirli kimyasal bağların parçalanması yoluyla dağıtılabilen fazla enerjiye sahip olabilir. Çeşitli kimyasal bağların kırılması, kütlesi kendisini oluşturan atomların kütlelerinin toplamına eşit olan pozitif yüklü parçalanma iyonlarının oluşmasına yol açar. Bütün moleküler iyonlar parçalanmaya uğramayabilir. Aromatik bileşikler gibi kararlı bir M^+ iyonu oluşturabilen bileşiklerde bu iyon parçalanmaya direnir ve bunun sonucunda spektrumda şiddetli bir moleküler iyon görülür (Watson and Sparkman, 2008).

Kimyasal iyonlaştırmada, örneğin gaz haline gelmiş molekülleri elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış çok sayıda başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılır (Skoog vd., 1998). Elektron bombardımanına tabi tutulduğunda metan molekülleri CH_4^+ oluşturacak şekilde iyonlaşır. Bu iyon ikinci bir metan molekülüyle reaksiyona girerek CH_5^+ iyonu oluşturur.



Bu CH_5^+ etkili proton donörüdür ve iyonlaşma bölgesindeki M molekülü ile aşağıdaki reaksiyona göre iyonlaşır.



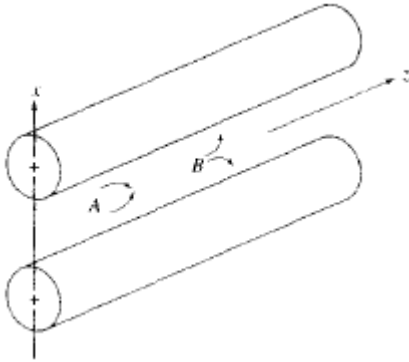
Bu MH^+ 'nin enerjisi M^+ 'dan çok daha düşüktür ve kütle spektrometri tayininde büyük olasılıkla değişmeden kalır (Watson and Sparkman, 2008).

İyonlaştırma bölgesinde oluşturulan iyonlar kütle analizörüne gelirler. Kütle spektrometrede manyetik sektör analizörleri, çift-odaklamalı spektrometreler,

kuadrupol, uçuş-zamanlı analizörler, iyon tuzaklı analizörler kullanılır (Skoog vd.,1998).

Manyetik sektörlü kütle analizörlerinde, iyonları dairesel bir yola saptırmak için iyon hareketinin yönüne dik manyetik alan kullanılır. Dairesel hareketin yarıçapı iyonun hızına ve m/z oranına bağlıdır. Ayırmayı arttırmak için sadece belirli kinetik enerjiye sahip moleküllerin alanlarında geçişine izin veren elektrostatik analizör ya da elektrik sektör kullanılır. Belirli bir kinetik enerji için, eğrilik yarıçapı doğrudan m/z değerine bağlıdır (Lee, 2009).

Kuadrupol kütle analizörleri belirli m/z değerine sahip iyonlar için filtre görevi görür. Bu, elektrot olarak iş gören dört paralel silindirik çubukla sağlanır. Karşılıklı çubuklar birbirine bağlıdır; bir çift değişebilir doğru akım kaynağının pozitif tarafına, diğer çift ise negatif ucuna bağlanır. İlaveten her çubuk çiftine değişebilir radyo-frekanslı alternatif akım potansiyeli uygulanır (Skoog vd., 1998). Radyo frekansı salınımı iyonların çubuklar tarafından itilmesine ya da çekilmesine neden olur. Şekil 2.4'de de gösterildiği gibi sadece belirli m/z oranına sahip iyonlar z ekseni boyunca bir yörüngeye sahip olurlar ve diğerleri çubuklar tarafından tutulurken, onlar dedektöre geçerler (Lee, 2009).



Şekil.2.4. xz-düzleminde bir kuadrupolün çalışması. A: z eksenine doğru odaklanan iyonlar, B: x çubuklarına çekilen iyonlar (Skoog vd., 1998).

Kütle spektrometresinin son bileşeni iyon dedektörüdür. İyonlar kütle analizöründen geçtikten sonra dedektörde bir sinyal oluşturulur. Dedektör elektron çoğaltıcı içerir. Elektron çoğaltıcı iyonların enerjisini ikincil iyonlara dönüştürür. Bu da sinyalde yaklaşık bir milyon kat artışa neden olur (Lee, 2009).

2.3.3. GC-MS ile veri elde etme

Kütle spektrometresinde iki tane veri işleme modu vardır. Bunlar SCAN (toplam iyon taraması) ve SIM (seçilen iyon taraması) modlarıdır. SCAN modunda yapılan analizlerde kromatografik işlem süresince sürekli olarak kütle spektrumu elde edilir (Niessen, 2001). SIM modu belirli bir aralıktaki bütün m/z değerlerinin taranmasından çok sadece birkaç m/z değerinin tarandığı moddur (Watson and Sparkman, 2008). Tarama, m/z değerleri hedef bileşiği en iyi temsil edecek şekilde yapılır. SIM modunda kütle analizörü, ilgilenilen m/z değerlerini dönüşümlü olarak ölçer. Bir m/z değerinden diğerine atlar. Bu nedenle analiz için gereksiz olan m/z değerlerinde harcanan tarama zamanı sifıra inerken ilgilenilen iyonlar için zaman 10-100 kat artar. Dolayısıyla hassasiyetin arttığı gözlenir (Gross, 2004). Sınırlı sayıdaki bileşiğin rutin nicel analizinde SIM kullanılarak gözlenebilme sınırı açısından daha iyi sonuçlar elde edilir. SCAN ya da SIM modu arasında yapılacak seçim gerekli olan gözlenebilme sınırına ve elde edilmek istenen bilgiye göre değişir (Niessen, 2001). SIM modu genellikle hedef-bileşik analizlerinde kullanılır. Bazı GC-MS cihazları, aynı veri işlemede kullanılan bu iki moddan gelen veriyi farklı dosyalarda depolar. SIM dosyası nicel analizde, SCAN dosyası analitin varlığının teyidinde ve var olabilecek diğer analitleri tespit etmede kullanılabilir (Watson and Sparkman, 2008).

Veri işlemenin bir sonucu olarak x eksenini boyunca bir üç boyutlu veri dizini (zaman, m/z, ve iyon şiddeti) oluşturulur. Bu dizin birkaç yolla işlenir. TIC'de (toplam iyon kromatografisi) her spektrum için toplam iyon şiddeti, zamanın fonksiyonu olarak çizilir. TIC'deki piklerden kütle spektrumu elde edilebilir. Kütle spektrumu, kütle spektrumu kütüphanesinde araştırılabilir (Niessen, 2001).

2.3.4. GC-MS ile nitel analiz

GC-MS ile nitel analiz yapılabilir. Kromatogramdaki herhangi bir pikin veya bütün piklerin kütle spektrumları sistem bilgisayarında yüklü kütüphanedeki spektrumlarla karşılaştırılır (Settle, 1997). Spektral kütüphanelerde, bilgisayarın yaptığı araştırma veri yorumlama açısından güçlü bir araçtır. NIST ve WILEY Kütüphaneleri gibi büyük spektral kütüphaneler ticari olarak mevcuttur. Bilinmeyen örnek için yapılan kütüphane araştırması eğer o madde kütüphanede varsa ve

temiz bir kütle spektrumu almayı olanaklı kılacak ölçüde etkili bir gaz kromatografi ayırması yapıldıysa doğru sonuca götürebilir (Niessen, 2001).

Kütüphane taramasının yanında, kütle spektrumunun yorumlanması da bilinmeyen örneğin tespitinde önemlidir. Moleküler iyonun parçalanma reaksiyonları ve sonuçta oluşan parçalanma iyonları örnek hakkında önemli bilgiler verir. Bilinmeyen örneğin nihai tespiti şüphe edilen bileşiğe ait referans maddenin GC alıkonma karakteristikleri ve kütle spektrumlarının örneğinkilerle karşılaştırılmasıyla yapılır (Niessen, 2001).

2.3.5. GC-MS ile nicel analiz

Nicel analiz GC-MS'in önemli bir uygulama alanıdır. GC-MS'in nicel analizdeki gücü, yüksek seçiciliğe ve iyi tayin limitlerine ulaşılabilmesi ile açıklanabilir (Niessen, 2001). Nicel analiz, ilgilenilen bileşiğin bilinen derişimlerinin ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmesine dayanır. Kalibrasyon eğrileri genellikle geniş bir derişim aralığında doğrusaldır. Derişim, gözlenebilme sınırına yaklaştıkça doğrusallıktan sapmalar olur (Gross, 2004).

GC-MS'in nicel analizdeki gücü, ideal iç standartlara uygulanabilir olması nedeniyle daha da arttırılabilir. Bu iç standartlar radyoaktif işaretlenmiş standartlardır ve örnek hazırlama, GC ayırması ve kütle spektrometresinde iyonlaşma sonucunda analitle aynı karakteristiklere sahiptir. Aralarındaki küçük kütle farkı analitle iç standardın ayrılmasını olanaklı kılar (Niessen, 2001).

SIM 'in nicel analizde uygulama şekli, uygulama alanına ve analizi yapılan örneğin karmaşıklığına bağlıdır. Bazı farmasötik uygulamalarda SIM sadece bir tek karakteristik iyonun m/z değerine göre yapılırken kalıntı analizlerinde birkaç m/z kullanılmalıdır. Bu tür uygulamalarda analitin varlığının teyidi için kriterler vardır ve çeşitli iyonların pik alanları referans maddenin kütle spektrumundan belirlenmiş oranlarla uyuşmalıdır (Niessen, 2001).

2.3.6. Türevlendirme

Sınırlı ısıl kararlılık ya da yetersiz uçuculuk nedeniyle GC analizlerine uygun olmayan bileşikler türevlendirme yoluyla uygun hale getirilebilir. Bu tip türevlendirmenin amacı analit polaritesinin azaltılmasıdır. Bu yolla analitteki aktif

protonlar başka türlerle yerdeğiştirir. Türevlendirme işlemi kütle spektrometresinde de moleküler iyon şiddetinin artması, parçalanma iyonlarında değişiklikler ve iyonlaşma veriminde düzelme gibi sonuçlar yaratabilir. Ancak türevlendirme işlemi zaman alıcı olması nedeniyle analitik yöntemi zorlaştırır. Bazen türevlendirme istenmeyen yan ürün oluşumu nedeniyle problemler çıkarır (Niessen, 2001).

Türevlerin hazırlanmasında çeşitli reaksiyonlar kullanılır. Fakat sonuçta en çok oluşan ürünler birkaç ana kategoride sınıflandırılabilir. Polar gruplardaki aktif hidrojenlerin yerdeğiştirilmesi analitik türevlendirmenin büyük bir bölümünü oluşturur ve genellikle alkilleme, açılme, sililleme ve kondensasyon reaksiyonlarını içerir (Knapp, 1979).

Steroidler için en uygun türevlendirme yöntemi hidroksil gruplarındaki aktif hidrojenlerin trimetilsilil (TMS) gruplarıyla yer değiştirdiği silillemedir (Bowden et al., 2009). Trimetilsilil grupları sililleme amacıyla en yaygın olarak kullanılan gruptur ve farklı özellikte çeşitli sililleme ajanları geliştirilmiştir. En çok kullanılan sililleme ajanları Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. Türevler kararsızdır ve su varlığında kolayca orijinal bileşiğe dönüşebilir (Tebbett, 1994). Bu nedenle sililleme ajanlarının ve kullanılacak çözücülerin, suyun eser miktarını bile içermemelerine dikkat edilmelidir.

En yaygın hidroksil grupları için, tatmin edici eser miktar analizleri trimetilsilil (TMS) türevlendirmesiyle elde edilir. En yaygın olarak kullanılan sililleme ajanı MSTFA'dır ve genellikle kullanılan katalizörler trimetiliodosilan (TMIS) ve amonyum iyodürdür (NH_4). Buna ek olarak dithioerythritol (DTE), ethanediol, 1-propanediol ve 2-merkaptotanol gibi indirgeyiciler bozunmayı engellemek, türevlendirme ajanını kararlı hale getirmek için sıklıkla kullanılır (Kai et al., 2010).

Bunların içinden DES ve E2 analizi için MSTFA sililleme ajanı olarak tercih edilmiştir. MSTFA en önemli sililleme ajanlarından biridir. Çözücü kullanmadan kullanılabilir. Polaritesinden dolayı çok polar maddeleri bile çözebilir. MSTFA'nın diğer türevlendirme ajanlarına üstünlüğü MSTFA'nın kendisinin ve yan ürünü olan N-metilfrifloroasetamidin daha uçucu olmasıdır.

Çizelge 2.4. Sililleme ajanları (Knapp, 1979)

Türevlendirme ajanı	Kısaltması	Formülü
Hekzametildisilazan	HMDS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ H
Trimetilklorosilan	TMCS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{Cl}$
N-Trimetilsilildietilamin	TMSDEA	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid	MSTFA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CF}_3-\text{C}-\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
N,O-Bis(trimetilsilil)- trifloroasetamid	BSTFA	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CF}_3-\text{C}=\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$

2.4. Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroözütleme

Son yıllarda örnek hazırlama basamaklarını basitleştirme, minyatürize etme ve kullanılan çözücülerin miktarlarını azaltma konusuna olan ilgi giderek artmış, buna bağlı olarak farklı mikroözütleme teknikleri (katı-faz mikroözütlemesi, stir-bar özütlemesi vb.) ortaya çıkmıştır. Bunların arasında, ilk olarak Rezaee et al. (2006) tarafından geliştirilen dispersif sıvı-sıvı mikroözütlemesi (DLLME), işlem kolaylığı, az zaman alması, düşük maliyeti, yüksek geri kazanımı ve zenginleştirme faktörü, organik çözücülerin az kullanımı gibi üstünlükleri sayesinde yararlı bir örnek hazırlama yöntemi olarak bildirilmiştir. Ortaya çıkışından bu yana DLLME, pekçok organik ve inorganik bileşiğin çoğunlukla sudan özütlenmesi için uygulanmıştır (Ravelo-Perez et al., 2009).

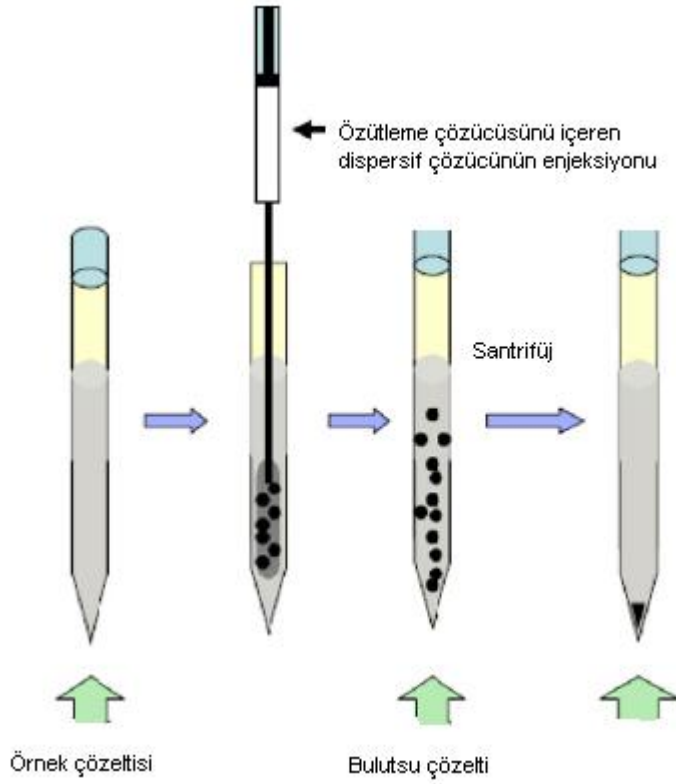
DLLME özütleme çözücüsünün mikrolitre seviyesinde kullanıldığı minyatürize edilmiş bir sıvı-sıvı özütleme yöntemidir. Özütleme, özütleme çözücüsü ve örnek çözeltisi arasındaki dağılım dengesine dayanır. Dağılım katsayısı K özütleme

çözücüsündeki ve örnek çözeltisindeki analit derişimlerinin oranıdır. DLLME sadece yüksek veya orta derecede lipofilik özellikteki ($K > 500$) analitler için uygulanabilir ve yüksek derecede hidrofilik özellikteki nötral analitler için uygun değildir. Asidik ya da bazik analitlerin dağılma katsayısı ise, örnek çözeltisinin pH değerinin kontrol edilmesiyle arttırılabilir (Zang et al., 2009).

Homojen sıvı-sıvı özütlemesi (HLLC) ve bulutlanma noktası özütlemesi (CPE) gibi üç bileşenli çözücü sistemlerine dayanır. Yüksek özkütleli organik bir çözücünün özütleyici olarak, hem özütleyici hem de suyla karışabilen bir çözücünün de dispersif olarak kullanıldığı basit ve hızlı bir mikroözütleme tekniğidir. Özütleyici ve dispersif çözücüden oluşan karışım sulu örneğe hızlı bir şekilde enjekte edildiğinde yüksek bir türbülans oluşur. Bu türbülans sulu çözeltide damlacıklar oluşmasına neden olur. Bulutsu çözeltinin oluşmasından sonra özütleme çözücüsü ile sulu örnek arasındaki yüzey alanı çok büyüktür. Bu nedenle dengeye çabuk ulaşılır ve özütleme zamanı kısadır. Bu, DLLME'nin başlıca avantajıdır. Bulutsu çözeltinin santrifüjünden sonra konik tüpün dibinde sediment faz çöker ve uygun bir analitik teknik kullanılarak sediment fazın analizi yapılır. DLLME'nin diğer avantajları uygulama kolaylığı, çabuk olması, düşük maliyeti, yüksek zenginleştirme faktörüdür (Rezaee et al., 2010).

DLLME Şekil 2.5'de de gösterildiği gibi iki basamaktan oluşur:

- 1) Analitleri içeren sulu örneğe uygun özütleme ve dispersif çözücü karışımının enjekte edilmesi. Bu basamakta özütleme çözücüsü sulu örnek içerisinde çok küçük damlalar halinde dağılır ve analitler özütleme çözücüsüne geçer. Özütleme çözücüsü ve sulu örnek arasındaki yüzey alanının büyük olması nedeniyle sistem dengeye çok çabuk ulaşır.
- 2) Bulutsu çözeltinin santrifüjü. Santrifüjden sonra sediment fazındaki analitler analitik cihazlarla tespit edilebilir (Rezaee et al., 2010).



Şekil 2.5. Bu çalışmada kullanılan dispersif sıvı sıvı mikroözütleme işleminin gösterimi (Cunha et al., 2009)

DLLME’de özütleme verimini etkileyen faktörler şunlardır:

- 1) uygun özütleme çözücüsü
- 2) uygun dispersif çözücü
- 3) özütleme çözücüsünün hacmi
- 4) dispersif çözücünün hacmi

Uygun bir özütleme çözücüsünün seçilmesi DLLME işleminin başlıca parametresidir. Özütleme çözücüsü iki şartı sağlamalıdır: Birincisi özütleme çözücüsünün özkütlesi sudan büyük olmalı, bu sayede özütleme çözücüsü sulu fazdan santrifüjle ayrılır. Diğeri, ilgilenilen bileşikler özütleme yeteneğidir. İyi kromatografik davranış ve sudaki çözünürlüğün az olması da yöntem açısından faydalıdır. Klorobenzen, kloroform, karbontetraklorür ve tetrakloroetilen gibi halojenürlü hidrokarbonlar özkütlelerinin büyük olması nedeniyle genellikle seçilen çözücülerdir (Rezaee et al., 2010).

Dispersif çözücü, özütleme çözücüsünde çözünür ve suyla karışabilir olmalıdır. Bu sayede bulutsu çözelti oluşturmak üzere özütleme çözücüsünün sulu fazda küçük

damlalar halinde dağılmasını sağlar. Böyle bir durumda özütleme çözücüsü ve sulu faz arasındaki yüzey alanı son derece büyük olur ve özütleme verimi artar. Dispersif çözücünün seçiminde hem özütleme çözücüsü hem de sulu fazla karışabilir olması esastır. Genellikle aseton, metanol, asetonitril dispersif çözücü olarak kullanılır (Rezaee et al., 2010).

Özütleme çözücüsünün hacminin önderiştirme faktörü üzerinde büyük etkisi vardır. Özütleme çözücüsü hacminin artmasıyla santrifüjden sonra elde edilen organik faz artarken analitin organik fazdaki derişimi azalır. Özütleme geri kazanımı hemen hemen sabit kalmasına rağmen önderiştirme faktörü düşmüş olur. Bu da hedef bileşiğin tayininde hassasiyetin azalmasına neden olur. Bu yüzden özütleme çözücüsü hacmi hem yüksek önderiştirme faktörü sağlamalıdır, hem de santrifüjden sonraki basamaklar için hacminin yeterli olması gerekir (Rezaee et al.,2010). DLLME işlemlerinde genellikle 5-100 mikrolitre özütleme çözücüsü kullanılır.

Dispersif çözücü hacmi, doğrudan bulutsu çözeltinin oluşumunu, özütleme çözücüsünün sulu fazda dağılma derecesini dolayısıyla da özütleme verimini etkiler. Dispersif çözücü hacminin değişmesi sediment faz miktarını değiştirir. DLLME işlemlerinde genellikle 0,5-1,5 mL dispersif çözücü kullanılır. İyi bir bulutsu çözelti elde etmek için gerekli uygun dispersif çözücü hacmi hem sulu fazın hem de özütleme çözücüsünün hacmine bağlıdır (Rezaee et al., 2010).

DLLME’de sediment fazın hacmini etkileyen faktörler:

- 1) özütleme çözücüsünün sudaki çözünürlüğü
- 2) örnek çözeltisinin hacmi
- 3) dispersif çözücünün hacmi
- 4) özütleme çözücüsünün hacmi

Özütleme süresi ve iyonik şiddet DLLME verimini etkileyen diğer faktörlerdir. DLLME’de özütleme süresi dispersif çözücü-özütleme çözücüsü karışımının örneğe enjekte edilmesiyle santrifüje başlamadan önceki zaman aralığı olarak tanımlanır (Chen et al., 2009).

Analitin ve özütleme çözücüsünün sulu fazdaki çözünürlüğü genellikle iyonik şiddetin artmasıyla azalır. Bu olay yüksek geri kazanımlara ulaşmak için faydalıdır. Bununla birlikte elde edilen organik fazın miktarı artar, bu da analit derişiminin ve önderiştirme faktörünün azalmasıyla sonuçlanır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Gaz Kromatografı	Agilent
Kütle Spektrometresi	Hewlett Packard
Santrifüj	Janetzki
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex
Vorteks	Heidolph
Hassas Terazi	Denver Instruments

3.1.2. Kimyasal maddeler

Asetonitril	Merck
Metanol	Riedel-de Haen
Aseton	Merck
Kloroform	Merck
Karbon tetraklorür	Merck
Diklorometan	Merck
Etanol	Riedel-de Haen
İsooktan	Merck
MSTFA	Merck
DTE	Sigma
Amonyum iyodür	Merck

3.1.3. Analitik standart maddeler

DES Riedel-de Haen

17 β -estradiol Dr.Ehrenstorfer

3.1.4. Stok çözeltilerin hazırlanması

DES ve E2'nin analitik standartlarından 10 mg alındı ve etanolde çözüldü. Son hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1mg/mL'lik A stok çözeltisi hazırlandı.

A çözeltisinden 1 mL alınarak etanolle 10 mL'ye tamamlandı ve 100 μ g/mL'lik B stok çözeltisi hazırlandı.

B çözeltisinden 1 mL alınarak etanolle 10 mL'ye tamamlandı ve 10 μ g/mL'lik C stok çözeltisi hazırlandı.

C çözeltisinden 1 mL alınarak etanolle 10 mL'ye tamamlandı ve 1 μ g/mL'lik D stok çözeltisi hazırlandı.

D çözeltisinden 1 mL alınarak etanolle 10 mL'ye tamamlandı ve 100 ng/mL'lik E stok çözeltisi hazırlandı.

Örnekler hazırlanırken 5 mL'lik sulara Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi uygun stok çözeltilerden eklenmiştir.

Çizelge 3.1.Örneklere eklenen standart derişimleri ve hacimleri

Derişim (ng/mL)	5 ml suya eklenen miktar (ng)	stok	Stoktan alınan miktar (μ L)
1	5	E	50
2	10	E	100
5	25	D	25
10	50	D	50
20	100	D	100

3.1.5. Türevlendirme çözeltilisinin hazırlanması

Türevlendirme ajanı olarak kullanılan MSTFA, katalizör olarak kullanılan NH_4I , indirgeyici olarak kullanılan DTE 1000:4:2 (v/w/w) oranında karıştırılarak hazırlandı (Gaillard et al.,1999;Seo et al., 2005).

3.2. Yöntem Geliştirme

Çalışmalarda kullanılan DLLME yöntemi :

5 mL su örneğine 1 $\mu g/mL$ 'lik DES ve E2 stok çözeltilerinden 50 μL eklenir. 1000 μL asetonitril (dispersif çözücü) ve 100 μL kloroform (özütleme çözücüsü) karıştırılır. Bu karışım hızlı bir şekilde örneğe enjekte edilir, 10 saniye vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 5 dakika santrifüj edilir. Dipte kalan faz türevlendirme tüpüne alınıp azot altında buharlaştırılır. Kuru kalıntı MSTFA/ NH_4I /DTE'nin (1000:4:2) 50 μL 'si ile muamele edilerek 55°C'de 30 dakika bekletilir. Örnekler oda sıcaklığına gelince azot altında buharlaştırılır. Buharlaştırmanın ardından tüplere 25 μL isooktan eklenir, karışım vorteks karıştırıcıda karıştırılır, ultrasonik banyoda 1 dakika tutulur. Ardından tekrar vorteks karıştırıcıda karıştırılır. Karışım viallere aktarılarak GC-MS'e verilir.

3.2.1. Özütleme çözücüsünün ve dispersif çözücünün seçimi

Özütleme çözücüsü olarak kullanılan çözücüler özkütleleri sudan daha büyük olmaları ve analitleri özütleyebilme özelliklerine göre seçilir.

Diklorometan, karbontetraklorür ve kloroform DES ve E2'nin özütlenmesi için karşılaştırıldı. Seçilen çözücülerin bazı fiziksel özellikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Özütleme çözücülerinin bazı fiziksel özellikleri

	Diklorometan	Karbontetraklorür	Kloroform
Özkütle (g/mL)	1,32	1,59	1,48
Sudaki çözünürlük (g/100mL,20°C)	1,3	0,1	0,8

Dispersif çözücünün hem organik hem de sulu fazla karışabilir olması dispersif çözücü seçiminde temel etkindir. Çalışmamızda aseton, asetonitril ve metanol DES ve E2'nin özütlenmesi için karşılaştırıldı.

Karşılaştırma yapılırken özütleme çözücüleri (diklorometan, kloroform, karbon tetraklorür) ile dispersif çözücülerinin (aseton, asetonitril, metanol) kombinasyonları DLLME işleminde kullanılmış, diğer koşullar sabit tutulmuştur. Her çözücü kombinasyonu ile iki örnek çalışılmıştır. Karşılaştırma sonucunda hangi çözücülerin kullanılacağına deneyler sonucu elde edilen pik alanları, geri kazanım değerleri ve tekrarlanabilirlikler dikkate alınarak karar verilmiştir.

3.2.2. Özütleme çözücüsünün uygun hacminin araştırılması

Özütleme çözücüsünün hacminin etkisini incelemek için farklı hacimlerdeki kloroform (40 µL, 60 µL, 80 µL ve 100 µL) özütleme çözücüsü olarak kullanılmıştır. Herbir hacim değeri için ikişer örnek analizi yapılmıştır. Karşılaştırma GC-MS analizi sonucu elde edilen alan değerine göre yapılmıştır.

3.2.3. Dispersif çözücünün uygun hacminin araştırılması

Dispersif çözücünün uygun hacminin seçilmesi için farklı hacimlerde (400µL, 600µL, 800µL, 1000 µL) asetonitril kullanılarak DLLME işlemi uygulanmıştır. Herbir hacim değeri için ikişer örnek analizi yapılmıştır. Karşılaştırma GC-MS analizi sonucu elde edilen alan değerine göre yapılmıştır

3.2.4. Özütleme süresinin etkisi

DLLME'de özütleme süresi, dispersif çözücü-özütleme çözücüsü karışımının örneğe enjekte edilmesi ile santrifüje kadar olan süredir. Özütleme süresinin etkisi 0-10 dak. aralığında sabit deneysel koşullarda incelendi. GC-MS analizi sonucu elde edilen sonuçların geri kazanım değerleri karşılaştırılarak özütleme süresinin etkisi belirlendi.

3.2.5. İyonik şiddetin etkisi

İyonik şiddetin DLLME işlemine olan etkisini incelemek için su örneklerine 0-0,4 g aralığında NaCl eklenerek DLLME işlemi uygulanmıştır. Her örnek iki paralel halinde çalışılmıştır.

3.2.6. GC-MS Uygulamaları

Deneysel çalışmanın ilk aşamasında DES ve E2 standartları hazırlanmış ve SCAN (toplam iyon taraması) modunda analiz yapılmıştır. Çalışmamızdaki GC-MS çalışma koşulları Çizelge 3.3'de, GC'de kullanılan sıcaklık programı Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Analiz sonucuna göre her bir analit için karakteristik m/z değerleri seçilmiştir. Bu değerlerin literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Bu aşamadan sonra yapılan analizlerde duyarlılığı arttırmak için seçilen m/z değerlerine göre oluşturulan SIM modu kullanılmıştır.

SIM modu için seçilen m/z değerleri:

DES: 412, 397, 383

17 β -estradiol: 416, 285, 232, 326

Çizelge 3.3. GC-MS çalışma koşulları

Kolon sıcaklığı	: 90 °C,
Enjektör bloğu sıcaklığı	: 280 °C,
Dedektör sıcaklığı	: 250 °C
Kolon	: 17 m uzunluk , 0,2 mm iç çap , %100 dimetilpolisiloksan çapraz bağlı kolon
Taşıyıcı gaz	: Helyum (1 mL/dak.),
Enjeksiyon miktarı	: 2 μ L
İyonizasyon	: EI (70 EV)
Analiz süresi	: 30 dak.
Kayıt tipi	: SIM

Çizelge 3.4. GC’de kullanılan sıcaklık programı

Sıcaklık artışı (°C/dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dak.)
	90	1
20	250	21

DES ve E2 standartlarının türevlendirme işleminin ardından yapılan GC-MS analizi ile Çizelge 3.5’de gösterilen alıkonma zamanları ve karakteristik iyonları belirlenmiştir.

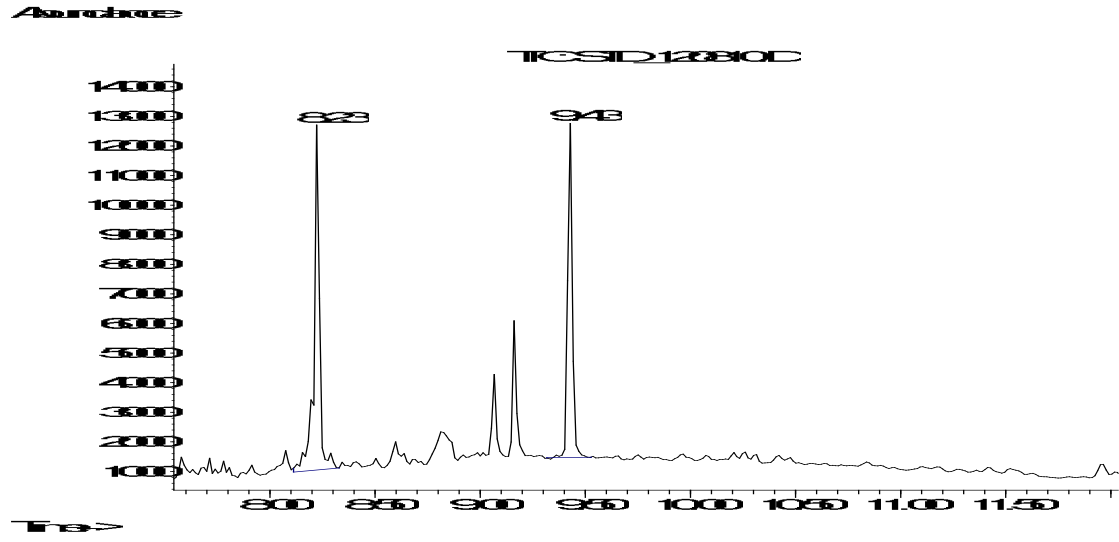
Çizelge 3.5. Analitlerin GC-MS’deki özellikleri

Analit	Alıkonma zamanı (dak.)	Karakteristik iyonlar (m/z)	Nicel analizde kullanılan iyon (m/z)
17 β -estradiol	9.43	416, 326, 285, 232	285
DES	8.23	412, 397, 383	412

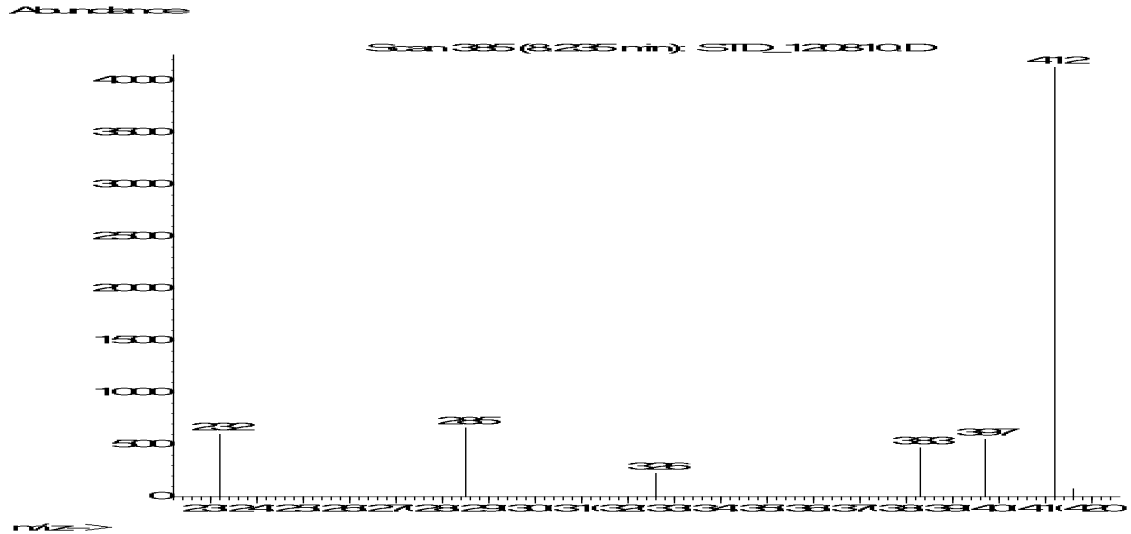
Su örneklerine DES ve E2 eklenerek dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme işlemi uygulanmıştır. Özüt, MSTFA/NH₄I/DTE (1000:4:2) ile türevlendirilmiştir. Türevlendirme ajanının uçurulmasından sonra kuru kalıntı 25 μ L isooktan ile çözülerek tüplere alınmıştır. Otomatik örnek toplayıcısına yerleştirilen vialden otomatik enjektör tarafından 2 μ L alınarak GC’ye enjekte edilmiştir.

Standart örneklerde ise, her bir derişim için su örneklerine eklenen miktar kadar DES ve E2’nin stok standart çözeltisinden türevlendirme tüpüne alınarak çözücü olan etanol uçurulmuştur. MSTFA/NH₄I/DTE (1000:4:2) ile türevlendirme yapılmış olup, bu aşamadan itibaren su örneklerine uygulanan işlemler sırasıyla yapılmıştır. GC-MS analizi sonucu elde edilen kromatogram Şekil 3.1’de gösterilmiştir. DES’e

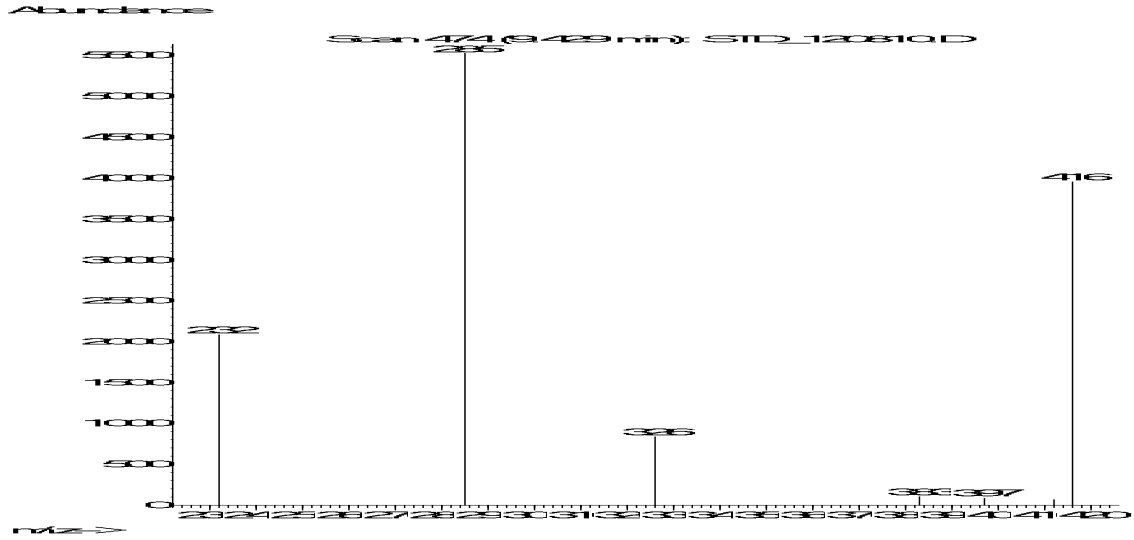
ait kütle spektrumu Şekil 3.2'de, E2'ye ait kütle spektrumu ise Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. DES ve E2 standartlarına ait kromatogram (MSTFA ile türevlendirilmiş)



Şekil 3.2. DES standardına ait kütle spektrumu (MSTFA ile türevlendirilmiş)



Şekil 3.3.E2 standardına ait kütle spektrumu (MSTFA ile türevlendirilmiş)

3.3. Yöntemi Geçerli Kılma Çalışmaları

Yöntemi geçerli kılma çalışmalarının amacı, analitik bir işlemin istenilen amaca uygun olduğunu göstermektir. Analitik işlemin amacı, yöntemi geçerli kılma çalışmaları sırasında değerlendirilecek özellikleri belirleyeceğinden, açık olmalıdır. Tipik bir yöntem geçerli kılma çalışmasında değerlendirilmesi gereken özellikler: doğruluk, kesinlik, özgünlük, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, doğrusallık ve aralıktır (ICH, 2005).

Yöntemi geçerli kılma çalışmamızda özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı incelenmiştir.

3.3.1.Özgünlük

Özgünlük, ortamda olması beklenebilecek maddeler varlığında analitin kesin olarak tayin edilebilme yeteneğidir (ICH, 2005). Yöntemin özgünlüğünü incelemek için, geliştirilen yöntem, boş su örnekleri ile DES ve E2'nin standartlarının eklendiği su örneklerine uygulanmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.3.2.Doğrusallık

Bir analitik işlemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta analitin örnekteki derişimiyle doğru orantılı sonuçlar elde edebilme yeteneğidir (ICH, 2005). Yöntemin doğrusal çalışma aralığını bulmak için su örneklerine 5 farklı derişimde 2 paralel halinde DES ve E2 eklenmiş, yöntemin uygulanmasından sonra GC-MS sistemine

verilmiştir. Analiz sonucunda bulunan pik alanlarının derişime karşı grafiği çizilmiştir.

3.3.3. Doğruluk, geri kazanım ve kesinlik

Doğruluk, ölçümlerin gerçek veya kabul edilen değere yakınlığını belirtir. Kesinlik, ölçümlerin tekrarlanabilirliğini, yani tamamen aynı yolla elde edilen sonuçların yakınlığını gösterir (Skoog vd.,1998).

Kalibrasyon eğrisinden seçilen üç derişim için (1, 5, 10 ng/mL) DES ve E2 su örneklerine eklenmiş ve yöntem 3 paralel halinde uygulanmıştır.

3.3.4. Gözlenebilme sınırı

Bir analitin gözlenebilme sınırı, kör örnek veya zemin gürültüsünden önemli ölçüde farklı bir aletsel sinyalin alındığı derişimdir (Miller and Miller, 2005). Gözlenebilme sınırını belirlemek için çeşitli yöntemler vardır (Ribani et al., 2007). Çalışmamızda analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplama yöntemi uygulanmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD), eşitlik 3.1 (Ribani et al., 2007) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 s_b / b \quad (3.1)$$

s_b :Cevabın standart sapması (kör örneklerden alınan cevaplar)

b : Eğrinin eğimi

3.3.5. Alt tayin sınırı

Alt tayin sınırı, bir yöntemin belirli işlemsel koşulları altında, analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Alt tayin sınırı (LOQ) eşitlik 3.2 (Ribani et al., 2007)'e göre hesaplanmıştır.

$$LOQ = 10 s_b / b \quad (3.2)$$

s_b :Cevabın standart sapması (kör örneklerden alınan cevaplar)

b : Eğrinin eğimi

3.4. Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen yöntemin gerçek örneklerle uygulanabilirliğini incelemek için geliştirilen yöntem Ankara'nın Etlik semtinden alınan ve önceden yaptırılmış analizlerinde içmeye uygun olmadığı belirlenmiş olan kuyu suyu örneklerine uygulanmış ve örneklerde DES ya da E2 tespit edilmemiştir. Bu sudan alınmış örneklerle 4 farklı derişim elde etmek üzere DES ve E2 eklenmiştir. Her derişim iki paralel örnek halinde çalışılmıştır. Pik alanlarının derişime karşı grafiğı çizilmiş, 5 ng/mL (n=3) derişimi için geri kazanım ve tekrarlanabilirlik hesaplanmıştır.

4.BULGULAR

4.1.Yöntem Geliştirme

4.1.1. Özütleme çözücüsünün ve dispersif çözücünün seçimi

Çözücülerin karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3 'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Asetonitrilin dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları

Nicel analizde kullanılan karakteristik iyonun alanı			
Analit	Asetonitril- Karbontetraklorür (n=2)	Asetonitril- Kloroform (n=2)	Standart
DES	60505	78409	94752
17β-estradiol	29077	49935	84764

Çizelge 4.2. Asetonun dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları

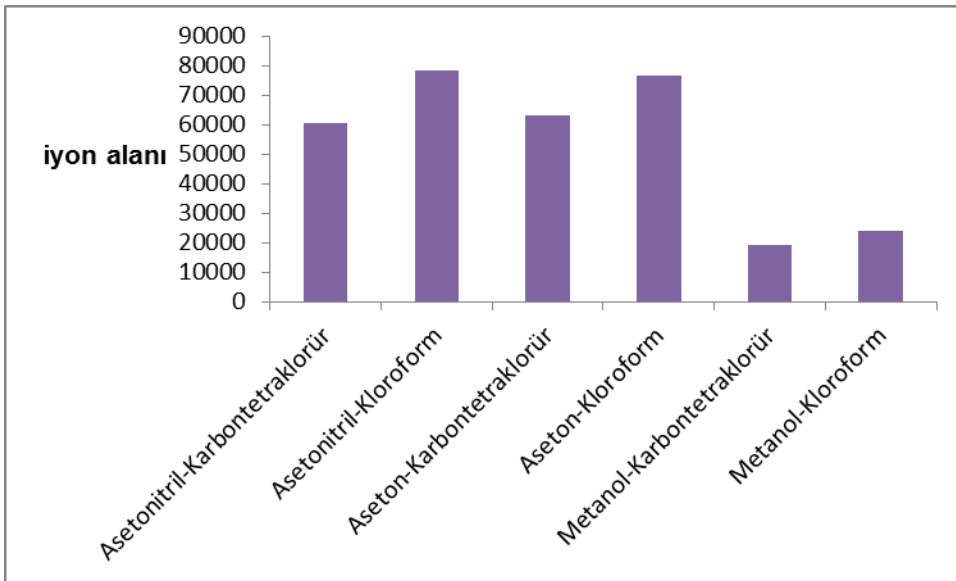
Nicel analizde kullanılan karakteristik iyonun alanı			
Analit	Aseton- Karbontetraklorür (n=2)	Aseton-Kloroform (n=2)	Standart
DES	63165	76533	94752
17β-estradiol	29567	55841	84764

Çizelge 4.3. Metanolün dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmanın sonuçları

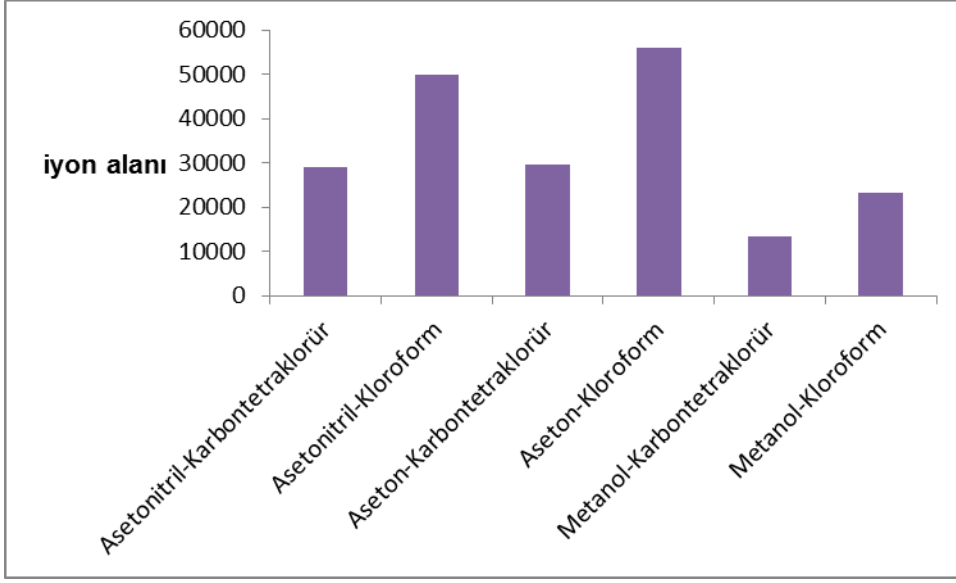
Nicel analizde kullanılan karakteristik iyonun alanı			
Analit	Metanol-Karbontetraklorür (n=2)	Metanol-Kloroform (n=2)	Standart
DES	19240	23963	94752
17β-estradiol	13261	23367	84764

Diklorometan özütleme çözücüsü olarak kullanıldığında her üç dispersif çözücüyle yapılan çalışmalarda, çözücü karışımı örneğe enjekte edildiğinde bulutsu çözelti oluşmamıştır. Ardından yapılan santrifüj işleminden sonra da sediment elde edilememiştir. Bu durum diklorometanın sudaki çözünürlüğünün fazla olmasıyla açıklanabilir.

Çözücü kombinasyonlarının DES'in özütlenmesi için karşılaştırılması Şekil 4.1'de E2'nin özütlenmesi için karşılaştırılması Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çözücü kombinasyonlarının DES'in özütlenmesi için karşılaştırılması



Şekil 4.2. Çözücü kombinasyonlarının E2'nin özütlenmesi için karşılaştırılması

Metanolün dispersif çözücü olarak kullanıldığı çalışmalarda her iki özütleme çözücüsüyle de elde edilen pik alanı (nicel tayinde kullanılan, analite ait bir karakteristik iyonun alanı) çok düşük olmuştur. Her iki analit için de en yüksek pik alanlarını veren çözücü kombinasyonları asetonitril-kloroform ve aseton-kloroform olmuştur. Bu nedenle özütleme çözücüsü olarak denenilen çözücüler arasında, kloroformun en uygunu olduğuna karar verilmiş ve özütleme çözücüsü olarak kloroform seçilmiştir. Öte yandan dispersif çözücüler olan asetonitril ve asetondan elde edilen pik alanları birbirine yakın olduğu için hangi çözücünün dispersif çözücü olarak kullanılacağına karar vermek için geri kazanımları ve tekrarlanabilirlikleri incelenmiştir ve Çizelge 4.4'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir.

Geri kazanım eşitlik 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{C_{\text{sed}}}{C_0} \times 100 \quad (4.1)$$

C_{sed} : Sediment fazdaki analitin iyon alanı

C_0 : Analite ait standart maddenin iyon alanı

Çizelge 4.4. Çözücü kombinasyonlarının DES ve E2'nin özütlenmesi için karşılaştırılması

Geri Kazanım (%)						
Analit	Asetonitril-kloroform	Asetonitril karbontetra-klorür	Aseton-kloroform	Aseton-karbontetra-klorür	Metanol-kloroform	Metanol-Karbontetra-klorür
DES	82,7±6,79	63,8±7,00	80,7±10,11	66,6±5,51	25,2±8,48	20,2±5,02
E2	58,9±0,57	34,3±6,93	65,8±7,00	34,8±1,48	27,6±0,64	15,6±4,81

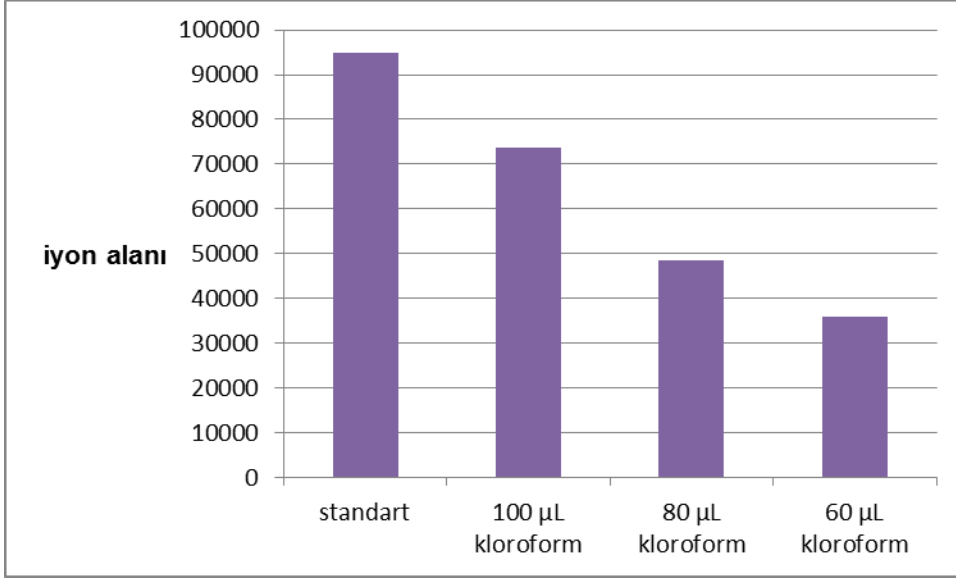
Asetonitril-kloroform, aseton-kloroform kombinasyonları geri kazanım açısından birbirine yakın değerler vermişlerdir. En uygun seçimi yapabilmek için tekrarlanabilirliklerine bakıldığında asetonitril-kloroform kombinasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlikler yüksek olduğu için dispersif çözücü olarak asetonitril seçilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda DES ve E2 'nin DLLME ile özütlenmesi için dispersif çözücü olarak asetonitrilin özütleme çözücüsü olarak da kloroformun kullanılmasına karar verilmiştir.

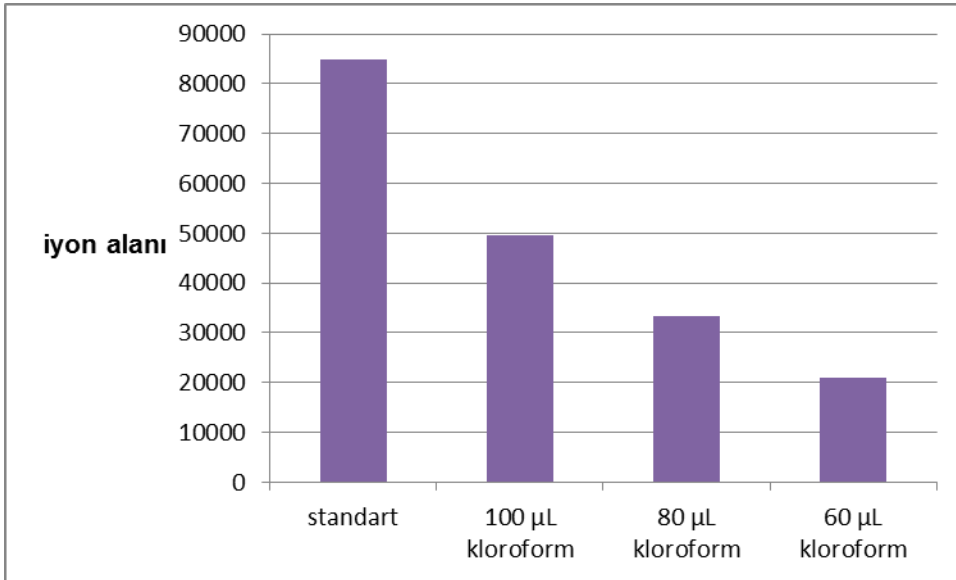
4.1.2. Özütleme çözücüsünün uygun hacminin seçimi

Özütleme çözücüsünün farklı hacimlerde kullanıldığı çalışmaların sonucu Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Özütleme çözücüsü olarak 40 µL kloroform kullanıldığında hem DES hem E2 tespit edilememiştir. Öte yandan özütleme çözücüsü hacminin artmasıyla pik alanlarının (nicel tayinde kullanılan her bir analite özgü karakteristik iyonunun alanı) arttığı gözlenmiştir. 100 µL kloroformun özütleme çözücüsü olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



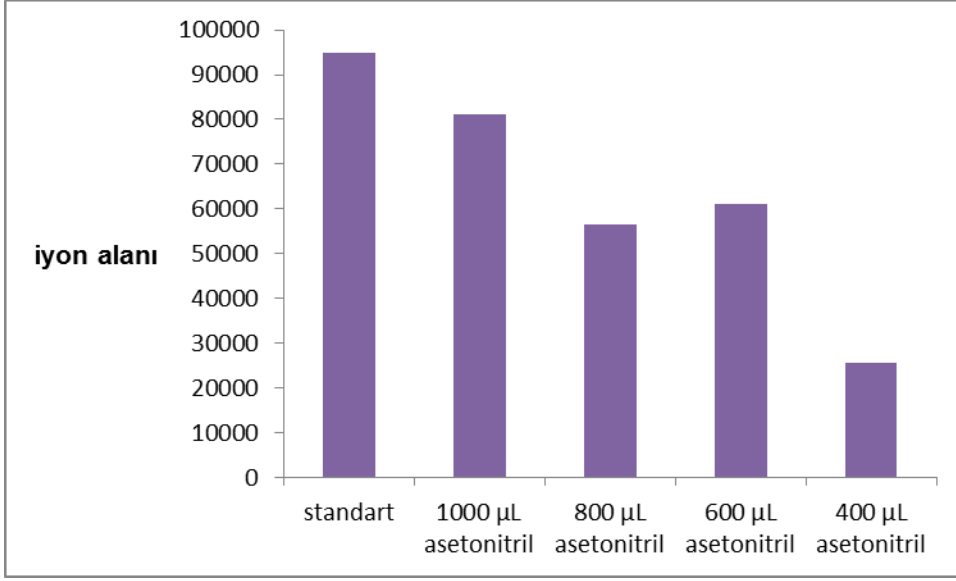
Şekil 4.3. Özütleme çözücüsü hacminin DES'in özütlenmesine etkisi



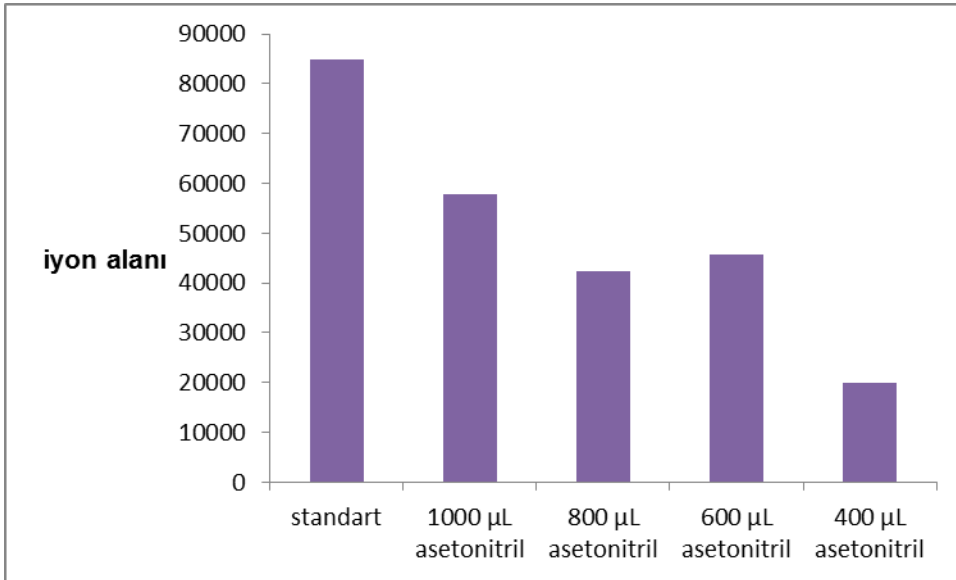
Şekil 4.4. Özütleme çözücüsü hacminin E2'nin özütlenmesine etkisi

4.1.3. Dispersif çözücünün uygun hacminin seçimi

Dispersif çözücünün farklı hacimlerde kullanıldığı çalışmaların sonucu Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. Dispersif çözücü miktarının artmasıyla pik alanlarının arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan karşılaştırmada 1000 µL asetonitrilin kullanılmasıyla daha yüksek pik alanları elde edildiği görülmüştür ve 1000 µL asetonitrilin kullanılmasına karar verilmiştir.



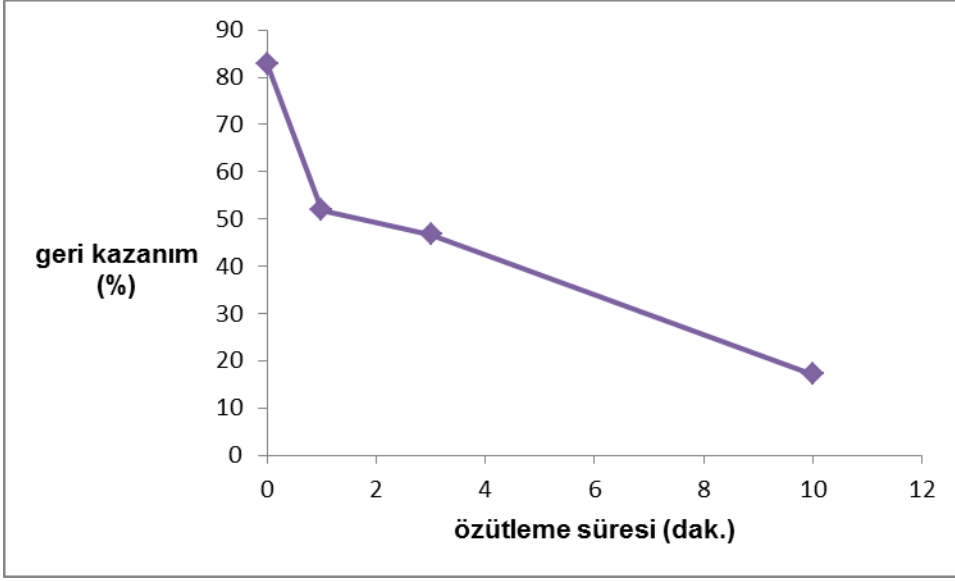
Şekil 4.5. Dispersif çözücü hacminin DES'in özütlenmesine etkisi



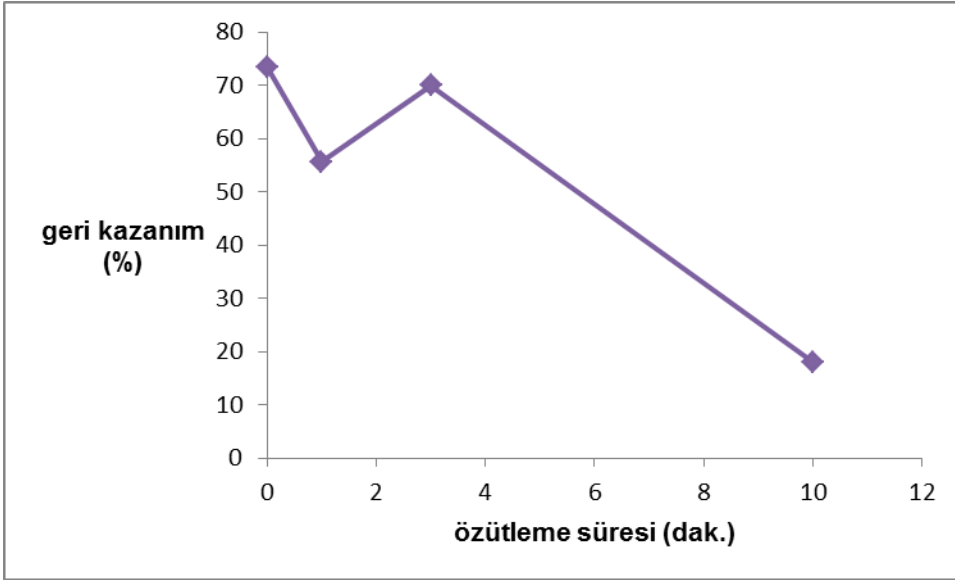
Şekil 4.6. Dispersif çözücü hacminin E2'nin özütlenmesine etkisi

4.1.4. Özütleme süresinin etkisinin incelenmesi

Farklı özütleme sürelerinde yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Özütleme süresinin DES'in özütlenmesine etkisi

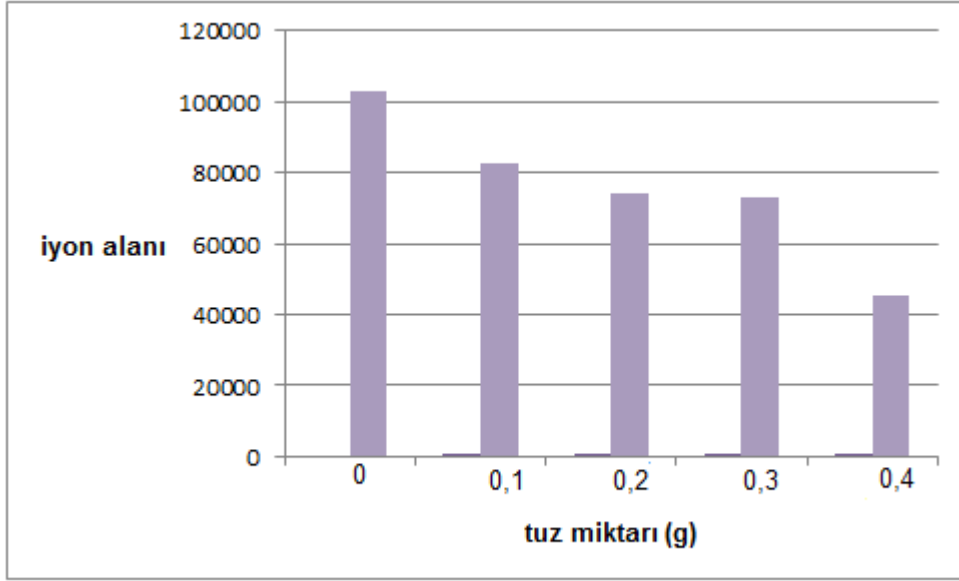


Şekil 4.8. Özütleme süresinin E2'nin özütlenmesine etkisi

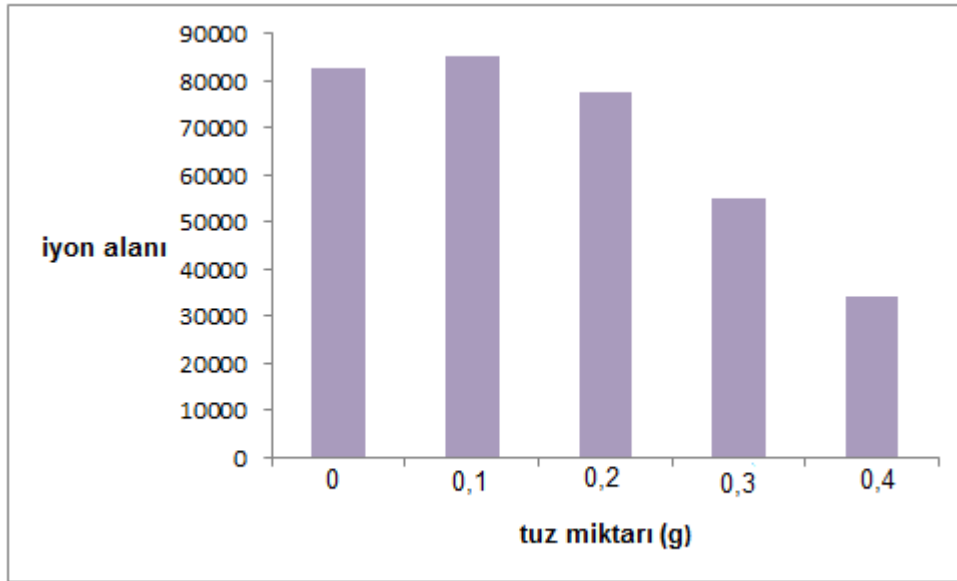
Özütleme süresinin artmasıyla geri kazanım değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Bu nedenle dispersif çözücü-özütleme çözücüsü karışımı örneğe enjekte edildiğinde bekletilmeden santrifüj işlemi yapılmıştır.

4.1.5. İyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

İyonik şiddetin etkisi Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. İyonik şiddetin DES'in özütlenmesi üzerine etkisi



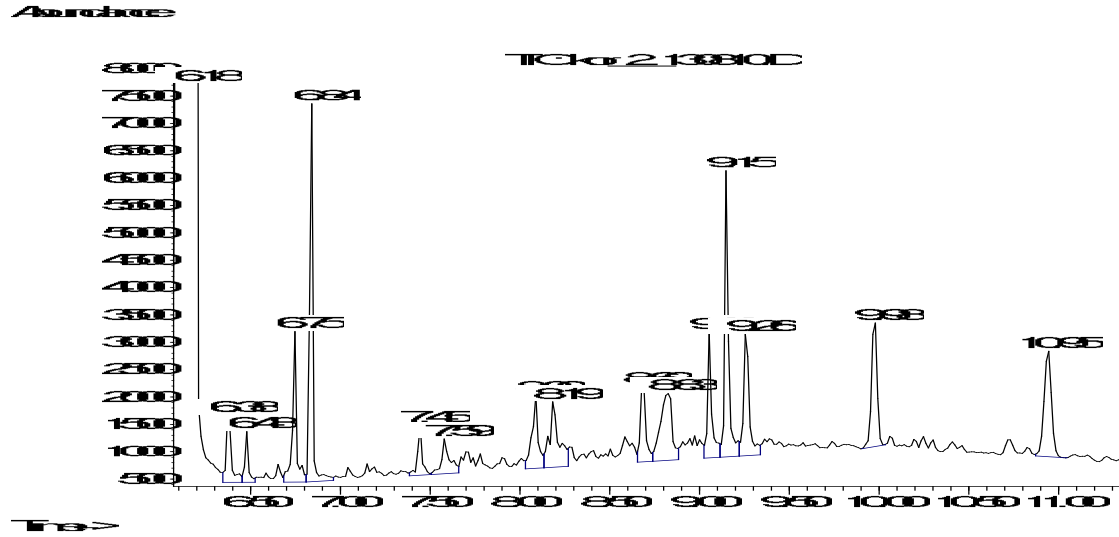
Şekil 4.10. İyonik şiddetin E2'nin özütlenmesi üzerine etkisi

DES için iyonik şiddetin artmasıyla pik alanının azaldığı gözlenmiştir. E2 için ise 0,1-0,2 g tuz eklemenin pik alanını önemli ölçüde değiştirmedığı ancak daha fazlasının pik alanlarında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmalarda örneğe tuz eklenmemiştir.

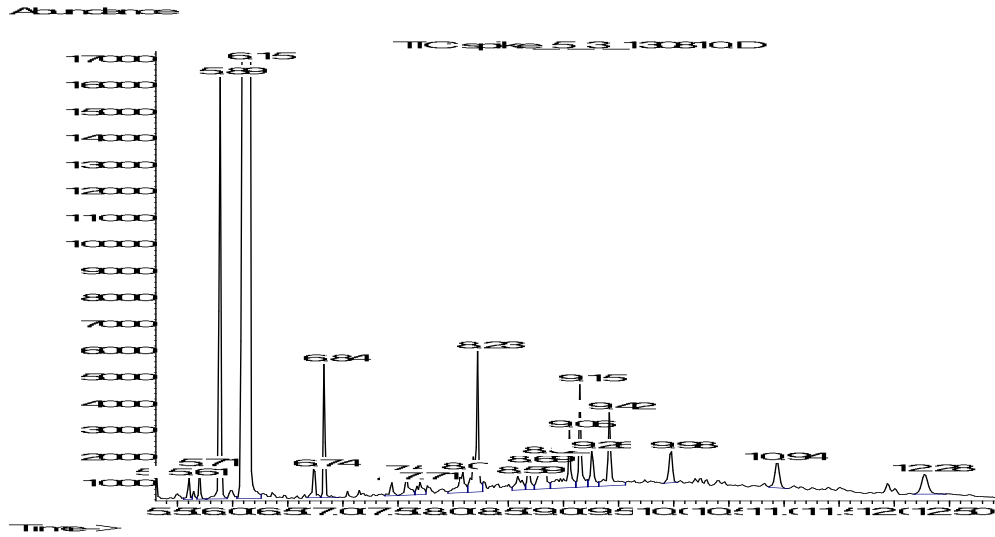
4.2. Yöntemi Geçerli Kılma Çalışmaları

4.2.1. Özgünlük

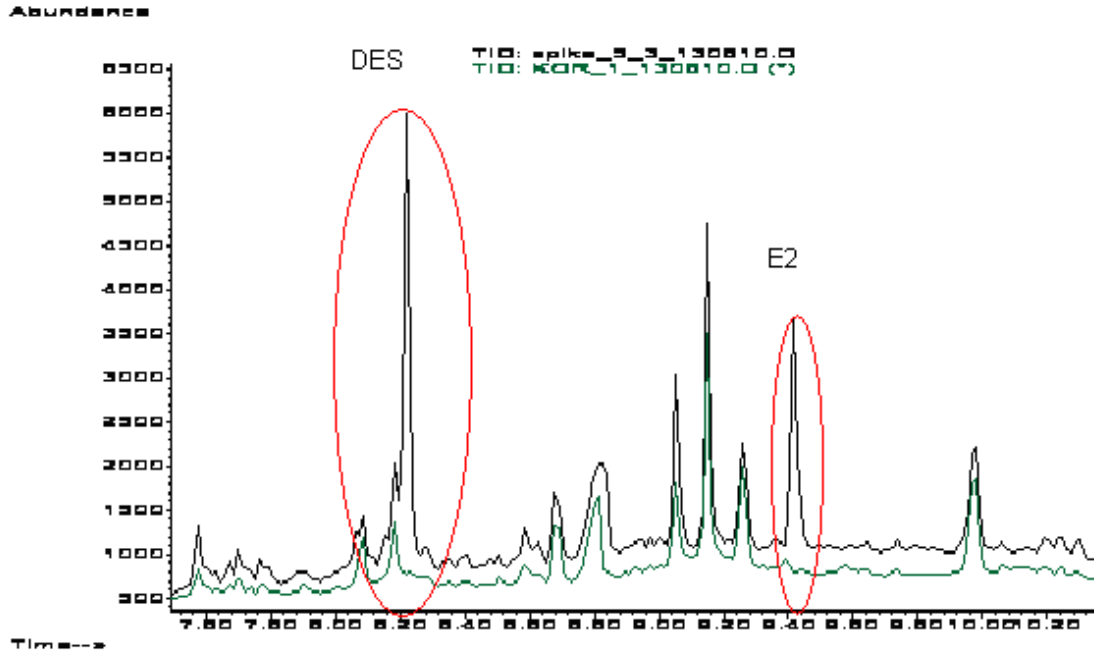
Boş su örnekleri ile DES ve E2'nin standartlarının eklendiği su örneklerine geliştirilen yöntemin uygulanmasının ardından, elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11. ve 4.12'de gösterilmiştir. Kromatogramların karşılaştırılmasıyla analitlerin alıkonma zamanlarında boş su örneklerinden herhangi bir pikin gelmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.13.). Böylece yöntemin özgünlüğü gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Boş su örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram



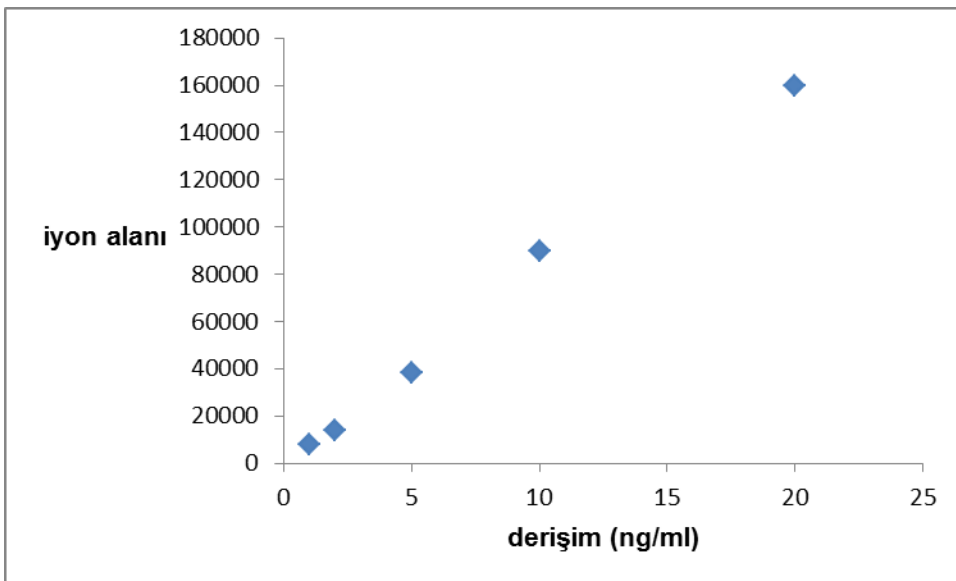
Şekil 4.12. DES ve E2'nin standartlarının eklendiği su örneğinin analiziyle elde edilen kromatogram



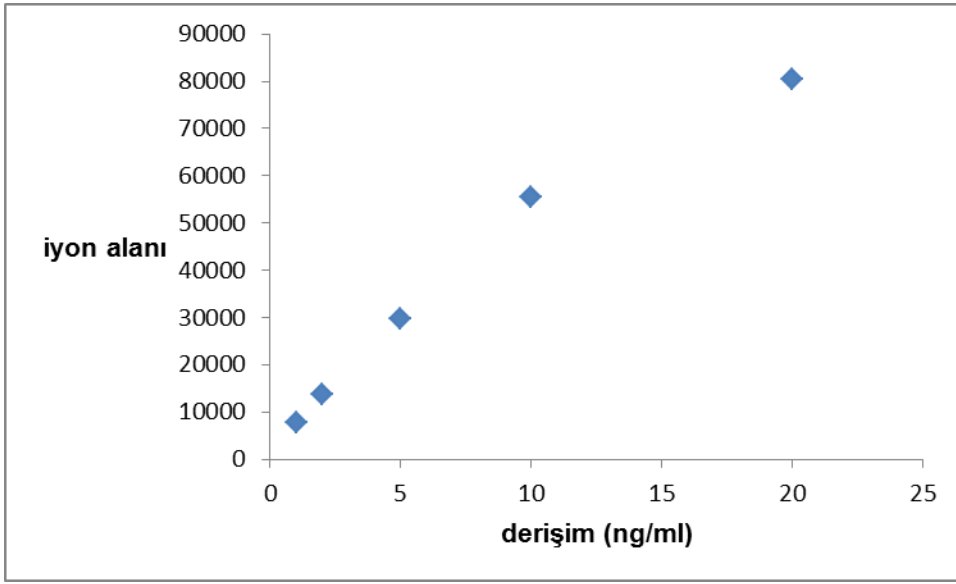
Şekil 4.13. Boş ve ekleme yapılmış örneklerin kromatogramlarının birlikte gösterilişi

4.2.2. Doğrusallık

Boş su örneklerine DES ve E2'nin standartlarının 5 farklı derişimde eklenmesiyle elde edilen örneklerin analiziyle yapılan doğrusallık çalışmasının sonucunda elde edilen regresyon eğrileri Şekil 4.14 ve 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. DES için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi



Şekil 4.15. E2 için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi

DES için tanımlayıcılık katsayısı(r^2) değeri 1-20 ng/mL aralığında 0,994, E2 için 0,963 olarak bulunmuştur. Regresyon eğrisinin özellikleri Çizelge 4.5, 4.6. ve 4.7'de verilmiştir. E2 için 1-10 ng/mL aralığında çizilen regresyon eğrisinin tanımlayıcılık katsayısı ise 0,999'dur. Bu nedenle E2 için çizilen kalibrasyon eğrilerinde bu aralık kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. DES'e ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-20 ng/mL aralığında)

Eğrinin denklemi	Tanımlayıcılık katsayısı(r^2)
$y=8172,4x-142,21$	0,994

y: iyon alanı x: derişim(ng/mL)

Çizelge 4.6. E2'ye ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-20 ng/mL aralığında)

Eğrinin denklemi	Tanımlayıcılık katsayısı(r^2)
$y=3861,5x+7831,9$	0,963

y: iyon alanı x: derişim(ng/mL)

Çizelge 4.7. E2'ye ait regresyon eğrisinin özellikleri (1-10 ng/mL aralığında)

Eğrinin denklemi	Tanımlayıcılık katsayısı(r^2)
$y=5353,3+2297,7x$	0,999

y: iyon alanı x: derişim(ng/mL)

4.2.3. Doğruluk, geri kazanım ve kesinlik

DES ve E2'nin su örneklerine eklenmesiyle üç farklı derişimde hazırlanan örneklere yöntemin uygulanmasıyla bulunan sonuçlar Çizelge 4.8 ve 4.9.'da gösterilmiştir.

Geri kazanım eşitlik 4.2'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Sediment fazdaki analitin derişimi}}{\text{Başlangıç derişimi}} \times 100 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.8. DES için doğruluk ve kesinlik çalışmasının sonuçları

Eklenen derişim (ng/mL)	Bulunan derişim (ortalama,ng/mL)	Kesinlik (S,n=3)	%Geri kazanım	Doğruluk (%bağıl hata)
1	0,89	0,16	88,7 ±16,2	-11,3
5	4,54	0,27	90,8± 5,44	-9,2
10	10,68	0,92	106,8 ± 9,26	6,8

Çizelge 4.9. E2 için doğruluk ve kesinlik çalışmasının sonuçları

Eklenen derişim (ng/mL)	Bulunan derişim (ortalama, ng/mL)	Kesinlik (S,n=3)	% Geri kazanım	Doğruluk (%bağıl hata)
1	0,93	0,09	93,3 ± 9,07	-6,7
5	5,01	1,44	100,2 ± 28,8	0,2
10	10,6	0,62	106,6 ± 6,24	6,6

4.2.4. Gözlenebilme sınırı

Analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplama sonucunda DES için gözlenebilme sınırı 0,42 ng/mL, E2 için 0,71 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.5. Alt tayin sınırı

Analitik eğrinin parametrelerinin kullanıldığı hesaplama sonucunda DES için alt tayin sınırı 1.29 ng/mL, E2 için 2,16 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.3.Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

5 ng/mL derişiminde olacak şekilde DES ve E2 eklenmiş gerçek örneklerle yöntemin uygulanmasıyla, kalibrasyon eğrisinden bulunan sonuçlar Çizelge 4.10 'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. 5 ng/mL derişimindeki gerçek örneklerle ait geri kazanım çalışması

Analit	Eklenen derişim (ng/mL)	Bulunan derişim (ng/mL)	Gerikazanım (%)
DES	5	5,08	101,6 ± 0,04
17β-estradiol	5	4,67	93,4 ± 0,23

5.SONUÇLAR

Östrojenlerin sudan özütlenmelerinde çoğunlukla katı-faz özütlemesi kullanılır. Bu yöntem pahalı, zaman alıcı ve çok organik çözücü gerektiren bir yöntemdir. Çalışmamızda ise bu maddelerin analizi için kolay, düşük maliyetli ve az çözücü gerektiren bir yöntem geliştirilmeye çalışılmış ve bu amaçla son yıllarda ortaya çıkan dispersif sıvı-sıvı mikroözütleme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem pek çok bileşiğe uygulanmakla beraber östrojenik steroidler için uygulaması iki yayında bildirilmiştir (Chang et al., 2010; Du et al., 2010).

DES ve E2'nin çevresel örneklerdeki analizleri genellikle GC-MS ile yapılır ve yüksek bir performans sağlanır. Çalışmamızda da analizler GC-MS ile yapılmıştır. %100 dimetilpolisiloksan kolon kullanılmıştır. DES ve E2'nin GC-MS ile analizlerinde türevlendirme işlemi gereklidir. Bu amaçla DES ve E2'nin türevlendirilmesinde sık kullanılan bir türevlendirme ajanı olan MSTFA kullanılmıştır. MSTFA'ya katalizör olarak NH₄I, türevi kararlı hale getirmek için de DTE eklenerek bir türevlendirme karışımı hazırlanmıştır. Türevlendirme reaksiyonu için gerekli süre ve sıcaklık literatürdeki benzer çalışmalarda belirtilen değerlere göre belirlenmiştir. Türevler su varlığında yıkıma uğradıkları için türevlendirme özütleme ile eşzamanlı olarak yapılmamış, örnek hazırlama işlemi özütleme ve türevlendirme olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. DES ve E2 standartlarının hazırlanan türevleri GC-MS'e verilmiş ve veriler SCAN modunda alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan ve spektrumlarından DES ve E2'nin alıkonma zamanları ve karakteristik iyonları belirlenmiştir. DES için 412 E2 için 285 m/z değeri en yüksek bolluğa sahip iyonlar oldukları için nicel analizde kullanılmak üzere seçilmişlerdir. Dedektör cevabı olarak bu iyonların alanları ölçülmüştür. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde hassasiyeti arttırmak için GC-MS'de SIM modu kullanılmıştır.

DLLME çalışmalarında, yöntemin performansını etkileyen parametreler olan özütleme çözücüsünün türü, dispersif çözücüsünün türü, özütleme çözücüsünün hacmi, dispersif çözücüsünün hacmi karşılaştırma yoluyla belirlenir. Bizim çalışmamızda da bu yol izlenmiş ve en yüksek pik alanlarını veren dolayısıyla da en yüksek geri kazanımları veren çözücü türleri ve hacimleri belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda bu parametreler karşılaştırılırken geri kazanım değerleri

yanında zenginleştirme faktörü de dikkate alınmıştır. Ancak çalışmamızdaki yöntemde, belirtilen yöntemlerin aksine DLLME sonucu elde edilen sediment faz doğrudan analiz edilmez. Sediment faz buharlaştırıldıktan sonra türevlendirme işlemi yapılır ve bunun sonrasında 25 µL isooktanla çözülür. Dolayısıyla bütün çalışmaların son hacimleri eşit olmuş olur.

DLLME'yi etkileyebilecek parametreler olan özütleme süresi ve iyonik şiddetin etkisi de incelenmiştir. Özütleme süresinin artmasıyla geri kazanımların düştüğü görülmüştür. Özellikle 10. dakikada geri kazanımdaki düşüş çok büyük olmuştur. Literatürdeki DLLME ile yapılmış çalışmaların çoğunda sürenin özütlemeye önemli bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Bu durumun nedeni de DLLME'nin doğası gereği denge haline çabuk ulaşılması olarak gösterilmiştir. Öte yandan Du et al.(2010) östrojenlerin analizinde DLLME'yi kullandığı yayınında özütleme süresinin artmasıyla özütleme veriminde düşüş gözlemlenmiştir. Yazara göre bu durumun nedeni tam bilinmemekle birlikte, özütleme süresindeki artış bazı parametreleri değiştirebilir ve daha sonrasında da dağılma katsayısı azalabilir, bunun sonucunda da pik alanı azalır.

İyonik şiddetin etkisini incelemek için örneklere NaCl eklenmiştir. DES için tuz miktarının artmasıyla özütleme veriminin azaldığı gözlenmiştir. E2 için 0,1g ve 0,2 g NaCl eklendiği durumlarda pik alanlarında büyük bir fark gözlenmezken 0,3 g ve fazlasının kullanıldığı durumlarda pik alanlarında düşüş gözlenmiştir. Bu durumun nedeni iyonik şiddetin artmasıyla özütleme çözücüsünün sudaki çözünürlüğünün azalmasıdır. Bu çalışmalar sonucunda DLLME işleminin optimum koşulları belirlenmiştir.

Türevlendirme işleminde kullanılan çözeltiler Gaillard et al.(1999) ,Seo et al.(2005) ve Bowden et al.,(2009) 'in çalışmaları dikkate alınarak hazırlanmıştır.

Geliştirilen yöntemin geçerli kılma çalışmaları yapılmış ve bu kapsamda özgünlük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı parametreleri incelenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla östrojenik maddelerin sudaki analizlerini geçerli kılma çalışmaları için bir rehber olmadığından geçerli kılma çalışmalarında ICH Q2(R1)'de belirtilen yöntem izlenmiştir.

Özgünlük için boş su örneği ile bilinen derişimlerde DES ve E2 eklenmiş su örneklerine ait kromatogramların karşılaştırılması sonucunda su örneklerinin

incelenen analitlerle girişim yapmadıkları görülmüştür. Böylece yöntemin özgünlüğü kanıtlanmıştır.

Doğrusallık çalışmasında ise, 5 farklı derişimde hazırlanan örneklere yöntemin uygulanmasıyla elde edilen pik alanlarının derişimle değişimi grafiği çizilmiştir. Bu çalışmayla, DES 'in kalibrasyon eğrisinin 1-20 ng/mL aralığında doğrusal olduğu görülmüştür. E2'ye ait r^2 değerinin ise 1-10 ng/mL aralığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle E2 için 1-10 ng/mL aralığındaki kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

Bir yöntemin doğruluğu bulunan sonuçla gerçek sonucun birbirine yakınlığıdır. Üç farklı derişimde hazırlanan örneklerin üçer paralel halinde çalışılması sonucunda % bağıl hata DES için 6,8-11,3; E2 için 0,2-6,7 arasında olmuştur. Geri kazanım değerleri ise DES için 88,7-106,8 E2 için 93,3-106,6 arasındadır. Yüksek derişimlerdeki % bağıl hata değeri düşük derişimlere göre daha düşük olmuştur. Kesinlik aynı koşullarda elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Standart sapma değerlerinin DES için 0,16-0,92, E2 için 0,09-1,44 arasında değiştii görülmüştür. Gözlenebilme sınırları DES için 0.42, E2 için 0.71 ng/mL olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı ise DES için 1,29, E2 için 2,16 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu analitlerin analizinde yaygın olarak kullanılan yöntemler ile gözlenebilme sınırları ng/L mertebesinde olmuştur. Bu açıdan geliştirilen yöntem düşük derişimlerde DES ve E2'nin analizine imkan verse de, yaygın olarak kullanılan yöntemler kadar hassas değildir. Ancak geliştirilen yöntem uygulanmadan, doğrudan analitlere ait standartların türevlendirilmesi sonucu da çok düşük derişimlerde cevap alınamamıştır. Bu durum kullanılan GC-MS sisteminin yöntemin hassasiyeti üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür. Öte yandan geliştirilen yöntemin diğer yöntemlere üstünlüğü kolay, düşük maliyetli, hızlı olmasıdır. Ayrıca organik çözücülerin çok az miktarlarda kullanılması yönüyle de diğerlerinden ayrılmaktadır.

Sonuç olarak, sudaki östrojenlerin analizi için geliştirilen yöntemin kesin, doğru, seçici ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006, Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge, *Process Biochemistry* 41, 525-539
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000, Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water, *Environmental Science and Technology* 34, 5059-5066
- Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schafer, A. C., Rijs, G. B. J., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *The Science of the Total Environment* 225, 101-108
- Bodzek, M. And Dudziak. M., 2006, Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes, *Desalination* 198, 24–32
- Bowden, J. A., Colosi, D. M., Mora-Montero, D. C., Garrett, T. J., Yost, R. A., 2009, Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS), *Journal of Chromatography B*, 877, 3237–3242
- Chang, C.C. and Huang, S.D., 2010, Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high - performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 662, 39–43
- Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang J., Liao, L., 2009, Dispersive liquid – liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey, *Analytica Chimica Acta* 632, 80–85
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Oliveira, M.B.P.P., 2009, Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid–liquid microextraction and multidimensional gas chromatography– mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1216, 8835–8844
- Desbrow, C, Routledge, E.J., Brighty, G.C. Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998, Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening, *Environmental Science and Technology* 32, 1549-1558
- Du, X., Wang, X., Li, Y., Ye, F., Dong, Q., Huang, C., 2010, Determination of Estrone and 17 β -Estradiol in Water Samples Using Dispersive Liquid – Liquid Microextraction Followed by LC, *Chromatographia* 71, 405-410

- Farre, M., Kuster, M., Brix, R., Rubio, F., Lopez de Alda, M., Barcelo, D., 2007, Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography – tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography – quadrupole time of flight mass spectrometry for part -per-trillion analysis of estrogens in water samples, *Journal of Chromatography A* 1160, 166–175
- Gaillard, Y., Vayssette, F., Balland, A., Pepin, G., 1999, Gas chromatographic–tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair Application in doping control and meat quality control, *Journal of Chromatography B* 735, 189–205
- Grob, R. L., Barry, E. F., 2004, *Modern practice of gas chromatography*, John Wiley and sons, Inc, New Jersey, 1045p
- Gross, J.H., 2004, *Mass Spectrometry A textbook*, Springer, Germany, 518p.
- Huang, C.H. , Sedlak, D. L., 2001, Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme – linked immunosorbent assay and gas chromatography / tandem mass spectrometry, *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 133-139
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), Current Step 4 version, 2005, 17p
- Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M., 2003, Determination of estrogens and their conjugates in water using solid -phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 984, 195–202
- Kai, F., Pan, X.J., Huang, B., Liu, J.L., Wang, Y., Gao, J.P., 2010, Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography -Mass Spectrometry Analysis, *Chin. J. Anal. Chem.* 38(5), 743–751
- Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Inoue, K., Saito, K., Nakazawa, H., 2004, Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal Desorption – gas chromatography – mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples, *Journal of Chromatography A* 1049, 1–8
- Knapp, D.R., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, 1979, John Wiley and Sons, Canada, 745p
- Kuch, H.M. and Ballschmither K., 2001, Determination of Endocrine - Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range, *Environmental Science and Technology* 35, 3201-3206

- Kuster, M., Lopez de Alda M. J., Barcelo, D.,2004, Analysis and distribution of estrogens and progesterones in sewage sludge, soils and sediments, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23, 790-798
- Lee, M.,2009, Basic skills in interpreting laboratory data, American society of health-system pharmacists, 621p
- Lopez de Alda, M.J. and Barcelo, D.,2001, Use of solid-phase extraction in various of its sediment and water, *Journal of Chromatography A*, 938 145–153
- Lopez de Alda, M. J. and Barcelo, D., 2001, Review of analytical methods for the determination of estrogens and progesterones in waste waters, *Fresenius J Anal. Chem* 371 ,437–447
- Miller, J.N., Miller, J.C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 2005, Pearson Education Limited, England, 253p
- Mills, L. and Chichester, C., 2005, Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?, *Science of the Total Environment* 343 , 1– 34
- Mitani, K., Fujioka, M., Kataoka, H.,2005, Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in - tube solid - phase microextraction coupled with liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1081, 218–224
- Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. L., Perdiz, D., Cargouet, M., Levi, Y., 2003 , Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 26, 105–111
- Nakamura, S., Sian, T. H., Daishima, S.,2001, Determination of estrogens in river water by gas chromatography – negative - ion chemical -ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 919 , 275–282
- Niessen, W. M. A., 2001, *Current Practice of Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, Inc., 507p
- Noppe, H., Le Bizec, B., Verheyden, K., De Brabander, H.F.,2008, Novel analytical Methods for the determination of steroid hormones in edible matrices, *Analytica Chimica Acta*, 611, 1-16
- Pacakova, V., Loukotkova, L., Bosakova, Z., Stulik, K.,2009, Analysis for estrogens as environmental pollutants – A review, *J. Sep. Sci.* 32, 867-882
- Pedersen, J.A., Soliman, M., Suffet, H., 2005, Human Pharmaceuticals, Hormones, and Personal Care Product Ingredients in Runoff from Agricultural Fields Irrigated with Treated Wastewater, *J. Agric. Food Chem.* 53, 1625-1632

- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M., Barcelo, D., 2002, Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples, *Journal of Chromatography A* 974, 23-51
- Qin, F., Zhao, Y.Y., Sawyer, M.B., Li, X.F., 2008, Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography / tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water, *Analytica Chimica Acta* 627, 91-98
- Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Cela, R., 2004, Determination of natural and synthetic estrogens in water by Gas Chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 1024, 177-185
- Ravelo-Perez, L.M., Hernandez-Borges, J., Asensio-Ramos, M., Rodriguez-Delgado, M.A., 2009, Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas, *Journal of Chromatography A* 1216, 7336-7345
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., 2006, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9
- Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M., 2010, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357
- Ribani, M., Collins, C.H., Bottoli, C.B.G., 2007, Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, *Journal of Chromatography A* 1156, 201-205
- Rodriguez - Mozaz, S., Lopez de Alda, M., Barcelo, D., 2007, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, *Journal of Chromatography A* 1152, 97-115
- Roepke, T.A., Snyder, M.J., Chen, G.N., 2005, Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations, *Aquatic Toxicology* 71, 155-173
- Sarmah, A.K., Northcott, G.L., Leusch, F.D.L., Tremblay, L.A., 2006, A survey of Endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand, *Science of the Total Environment* 355, 135-144
- Seo, J., Kim, H.Y., Chung, B.C., Hong, J., 2005, Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1067, 303-309

- Setle, F., 1997, Handbook of Instrumental Techniques for analytical chemistry, Prentice Hall PTR, USA, 994p
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 1996, Analitik Kimya Temelleri 1, (çev:Kılıç, E., Köseoğlu, F.), Bilim Yayıncılık, Ankara, 496s.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., 1998, Enstrümantal Analiz, (çeviri editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.), Bilim Yayıncılık, Ankara, 849s
- Tebbett, I., 1994, Gas chromatography in forensic science, Prentice Hall, 198p.
- Wang, L., Cai, Y.Q., He, B., Yuan, C. G., Chen, D. Z., Shao, J., Jiang, G.B., 2006, Determination of estrogens in water by HPLC – UV using cloud point extraction, Talanta 70 ,47–51
- Watabe, Y., Kubo, T., Nishikawa, T., Fujita, T., Kaya, K., Hosoya, K., 2006, Fully automated liquid chromatography – mass spectrometry determination of 17 β -estradiol in river water, Journal of Chromatography A 1120 252–259
- Watson, J. T. , Sparkman, O. D., 2008, Introduction to Mass Spectrometry, John Wiley and Sons, LTD, 819p
- Wozei, E. , Hermanowicz, S. W., Holman , H.Y. N., 2005, Developing a Biosensor for Estrogens in Water Samples: Study of the Real-time Response of Live Cells of the Estrogen - sensitive Yeast Strain RMY / ER - ERE using Fluorescence Microscopy, Biosensors and Bioelectronics 21, 1654-1658
- Yang, L., Luan, T., Lan, C., 2006, Solid - phase microextraction with on - fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography – mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1104, 23–32
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997, Enstrümantal Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi yayınları A-64, 506s
- Yoon, Y., esterhoff, P., Snyder, S. A., Esparza, M., 2003, HPLC - fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol on powdered activated carbon, Water Research 37, 3530–3537
- Zang, X.-H., Wu, Q. H., Zhang, M. Y., Xi, G. H., Wang, Z., 2009, Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique, Chin J Anal Chem. 37 (2), 161–168
- Zhang, Y. and Zhou, J., 2008, Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater, Chemosphere 73 , 848–853
- Zuo, Y., Zhang, K., Lin, Y., 2007, Microwave - accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic – mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids, Journal of Chromatography A 1148, 211–218

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem KIRMIZIBAYRAK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1995 -1999 Başkent Lisesi (Y.D.A)

Lisans 2002 -2006 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2006.-2010 Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve

Araştırma Enstitüsü, Kimyager