

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞİŞELENMİŞ İÇME SULARINDA ÖSTROJENİK AKTİVİTENİN GEREKLİ
ARAŞTIRILMASI VE ENDOKRİN SİSTEMİNİ BOZUCU MADDELERİN
VARLIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Badel GÜN

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Programı

OCAK 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞİŞELENMİŞ İÇME SULARINDA ÖSTROJENİK AKTİVİTENİN
ARAŞTIRILMASI VE ENDOKRİN SİSTEMİNİ BOZUCU MADDELERİN
VARLIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Badel GÜN
501121740**

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Çevre Bilimleri ve Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif PEHLİVANOĞLU MANTAŞ

OCAK 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 501121740 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi **Badel GÜN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**ŞİŞELENMİŞ İÇME SULARINDA ÖSTROJENİK AKTİVİTENİN ARAŞTIRILMASI VE ENDOKRİN SİSTEMİNİ BOZUCU MADDELERİN VARLIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Elif PEHLİVANOĞLU MANTAŞ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. İsmail TORÖZ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Zehra CAN
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **15 Aralık 2014**
Savunma Tarihi : **20 Ocak 2015**

Soner, Şule, Belemir GÜN ve Refik GÜRBUDAK'a

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca ilminden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim sayın hocam Doç. Dr. Elif PEHLİVANOĞLU MANTAŞ'a, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve güleryüzünden dolayı değerli hocam Araş. Gör. Dr. Egemen AYDIN'a içten teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmalarımda bana yardımcı olan Araş. Gör. Emel TOPUZ'a teşekkür ederim.

Projenin gerçekleşebilmesi için destek olan TÜBİTAK'a ve İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Arkadaşlığın en güzelini yaşatıp, her koşulda yüzümü güldüren, bilimsel alanda kendimi geliştirmeme yardımcı olan ve her an destiğini hissettiren Nilay BİLGİN'e, hoş sohbeti, candan dostluğuyla her anımda yanımda olan Cem CANTEKİN'e, tez yazım aşamasında yardımlarıyla bana destek olan Marcel HÖHN'e ve tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca verdiğim her karar da beni yargılamadan destekleyen, hayallerimi gerçekleştirmek için gerektiğinde kendi hayallerinden vazgeçen, hedeflerime ulaşma yolunda umutsuz olduğum her an bana ışık tutup, yolumu aydınlatan ve varlıklarına her zaman şükrettiğim, benimle gurur duymaları için elimden gelen her şeyi yapacağım babam Soner GÜN, annem Şule GÜN'e ve bana ikinci ebeveyne sahip olma şansını yaratan Ersin ve Yurdanur ÜZMEZ'e,

Büyüyüp abla olmamı sağlayan ve kardeşliğin tüm güzelliklerini yaşatan minik perim Belemir GÜN'e,

Tüm hayatım boyunca gökyüzüne baktıkça yüzünü göreceğim, bana öğrettiği her şeyi sevgi ve saygıyla yapacağım dedem Refik GÜRBUDAK'a çok teşekkür ederim.

Ocak 2015

Badel GÜN
Çevre Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	23
1.1 Çalışmanın Anlam ve Önemi	23
1.2 Çalışmanın Kapsamı	24
2. LİTERATÜR ÖZETİ	25
2.1 Endokrin Bozucu Maddeler ve Östrojenite	25
2.1.1 Endokrin bozucu maddelerin kaynakları	26
2.1.2 Endokrin bozucu maddelerin etkileri	27
2.1.3 Endokrin bozucu madde örnekleri	28
2.1.3.1 Bisfenol A (BPA).....	28
2.1.3.2 Nonilfenol (NP).....	32
2.2 Östrojenik Aktiviteye Neden Olan Maddelerin Varlığı ve Östrojenik Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Yöntemler.....	35
2.2.1 YES biyodeneyi	35
2.2.2 Tekil madde ölçümü için LC-MS/MS	39
2.2.3 Katı faz ekstraksiyonu (KFE)	41
3. MATERYAL-METOT	43
3.1 Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	43
3.2 Numune Alımı.....	43
3.3 Deney Prosedürleri.....	44
3.4 KFE Yöntemi Optimizasyonu	46
3.4.1 Farklı su çeşitlerinin şahit olarak kullanımı ile KFE	49
3.4.2 Farklı kartuş çeşitleri ile KFE	50
3.4.3 Farklı kurutma süreleri ile KFE	50
3.4.4 Dimetil sülfoksit kullanımı	51
3.5 YES Biyodeneyi ile Toplam Östrojenik Aktivite Ölçümü.....	51
3.6 BPA ve NP için LC-MS/MS Ölçüm Yöntemlerinin Geliştirilmesi	53
3.6.1 BPA ve NP için uygun çözücünün seçilmesi.....	53
3.6.2 BPA, NP ve izotop işaretli iç standartlar için MS/MS şartlarının belirlenmesi	53
3.6.3 UPLC’de kromatografi şartlarının belirlenmesi	54
3.6.4 LC-MS/MS ölçüm yöntemi	55
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	59
4.1 Ön Denemeler	59
4.1.1 Katı faz ekstraksiyonu (KFE) ile hazırlanan numune sonuçları	60
4.1.2 YES biyodeneyinde toksisite kontrolü.....	65

4.2 Sonuçlar	66
4.2.1 YES biyodeneyi sonuçları	66
4.2.2 LC-MS/MS lm sonuçları	69
4.2.2.1 LC-MS/MS ile NP lmleri	70
4.2.2.2 LC-MS/MS ile BPA lmleri	73
5. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	95

KISALTMALAR

UPLC	: Ultra Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)
LC	: Liquid Chromatography (Sıvı Kromatografi)
ONPG	: orto-nitrofenil- β - galaktosit
NDMA	: N-Nitrosodimetilamin
USEPA	: United States Environmental Protection Agency (Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı)
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
AB	: Avrupa Birliği
SCF	: Scientific Committee on Food
USFDA	: United States Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu)
E1	: Estron
E3	: Estriol
EE2	: 17 α -etinilestradiol
EBM	: Endokrin Bozucu Madde
LOQ	: Limit of Detection (Metot Sayısallaştırma Limiti)
PET	: Polietilen Tereftalat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
YES	: Yeast Estrogen Screen (<i>In-vitro</i> maya östrojen izleme testi)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
NP	: Nonilfenol
NP-d4	: İşaretli Nonilfenol
BPA	: Bisfenol A
BPA-d16	: İşaretli Bisfenol A
E2	: 17 β -estradiol
KFE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
LC-MS/MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi)

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : BPA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	29
Çizelge 2.2 : NP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri	32
Çizelge 2.3 : Çeşitli su matrislerinde östrojenik aktivitenin incelenmesi	36
Çizelge 3.1 : Numuneyi konsantre hale getirmek için kullanılan KFE yöntemleri ..	47
Çizelge 3.2 : DMSO ilaveli ve DMSO ilavesiz KFE 3 prosedürü sonuçları	51
Çizelge 3.3 : YES testi için kullanılan ortam	52
Çizelge 3.4 : UPLC için hareketli faz gradyan programı	55
Çizelge 4.1 : Farklı santrifüj tüpleri ile yapılan deneme sonuçları	59
Çizelge 4.2 : Farklı kartuş çeşitleri ile elde edilen E2 geri kazanım oranları	59
Çizelge 4.3 : Plastik HLB kartuş ile şahit (BPA içermeyen) numuneler ile yapılan denemelerde KFE 3 uygulamasını takiben ölçülen BPA konsantrasyonları	60
Çizelge 4.4 : (YES/LC) elde edilen şahit su numunesi sonuçları	60
Çizelge 4.5 : Numunelere ön işlem yapılmadan elde edilen östrojenite ölçümü sonuçları	61
Çizelge 4.6 : Farklı KFE prosedürleri ile YES biyodeneyi sonucu elde edilen geri kazanım oranları	64
Çizelge 4.7 : KFE 3 prosedürü	67
Çizelge 4.8 : Numuneler için kullanılan notasyon açıklaması	67
Çizelge 4.9 : Çeşitli marka PET şişeler ve cam damacanalar için 50 kat konsantre edilmiş numunedeki YES biyodeneyi sonucu elde edilen östrojenite değerleri	68
Çizelge 4.10 : Çeşitli marka polikarbonat şişeler için 50 kat konsantre edilmiş numunedeki YES biyodeneyi sonucu elde edilen östrojenite değerleri	70
Çizelge 4.11 : NP ve işaretli NP için denenen iyonlar	70
Çizelge 4.12: Farklı kolisyon enerjileri için elde edilen sinyal şiddetleri	71
Çizelge 4.13 : Farklı m/z'ler için elde edilen kolisyon enerjileri	71
Çizelge 4.14 : NP ölçümü için kullanılan MS/MS parametreleri	72
Çizelge 4.15 : NP için YES ve BPA için optimize edilmiş KFE'ye ilave olarak denenen KFE prosedürleri	74
Çizelge 4. 16 : LC-MS/MS ile elde edilen BPA konsantrasyonları	75
Çizelge 4.17 : Şişelenmiş içme suyu numunelerinde ölçülen östrojenite ve BPA konsantrasyonu sonuçları	76

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : BPA'nın kimyasal yapısı	28
Şekil 2.2 : Polimer hidrolizi ile BPA salınımı mekanizması	30
Şekil 2.3 : NP'nin kimyasal yapısı	32
Şekil 3.1 : Katı faz ekstraksiyonu	44
Şekil 3.2 : Laminer akışlı kabin	45
Şekil 3.3 : LC-MS/MS enstrümanı	45
Şekil 3.4 : Oasis HLB cam kartuş	50
Şekil 3.5 : Oasis HLB plastik kartuş	50
Şekil 3.6 : MS/MS şırınga pompası bağlantısı	54
Şekil 3.7 : Standart çözeltilerle hazırlanan BPA kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 3.8 : Standart çözeltilerle hazırlanan NP kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 4.1 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE3 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları	62
Şekil 4.2 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE4 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları	63
Şekil 4.3 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE6 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları	64

ŞİŞELENMİŞ İÇME SULARINDA ÖSTROJENİK AKTİVİTENİN ARAŞTIRILMASI VE ENDOKRİN SİSTEMİNİ BOZUCU MADDELERİN VARLIĞI İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

ÖZET

Suyun, her canlının yaşamını sürdürebilmesi için temel ihtiyaç olması nedeni ile sudaki kirleticiler, araştırılması gereken en önemli konulardan biridir. İçme sularındaki kontaminasyon gün geçtikçe dikkat çekici bir konu haline gelmiştir. Gerek su kaynaklarındaki kirlilik artışı, gerekse arıtım yöntemi olarak kullanılan klorlamada minerilizasyon adımının tamamlanmaması nedeni ile oluşan yan ürünler, içme sularında kirleticilerin bulunmasına neden olmaktadır (Fan, 2013; Kuruto-Niwa 2005).

Çeşitli doğal ya da sentetik maddeler kimyasal yapıları nedeni ile canlıların endokrin sistemini etkileyebilmekte, bu nedenle “Endokrin Bozucu Maddeler (EBM’ler)” olarak adlandırılmaktadır. Bu kirleticiler, atıksu arıtma sistemlerinin deşarj noktalarından ve çeşitli yayılı kaynaklardan yeraltı ve yüzeysel sulara karışması nedeni ile de içme suyunu kontamine edebilmektedir.

Son yıllarda, şişelenmiş içme sularına olan talep artmış, bu da su kaynağında bulunabilecek kirleticilerin yanı sıra, kullanılan şişe materyalinin içerdiği kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerinin incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Günümüzde şişe materyali olarak en sık kullanılan malzemeler polietilen tereftalat (PET) ve polikarbonattır. Çoğunlukla epoksi reçinelerin ve polikarbonat şişelerin üretim aşamasında plastikleştirici olarak bisfenol A (Vandenberg, 2007) ve yüzey aktif maddeler ve yiyecek ambalaj filmleri gibi çeşitli evsel tüketim ürünlerinde kullanılan nonilfenolün (Guenther, 2002; Uchiyama, 2008; Ying, 2002) östrojen hormonu gibi davrandığı bilinmektedir. Bu EBM’lerin şişe içerisindeki içme suyuna sızma ihtimalinin bulunduğu bilinmekte olup, nanogram seviyesindeki konsantrasyonlarının bile özellikle hormon sisteminin çalışmasını etkilediği düşünülmektedir (Dorival-Garcia, 2012).

Bu EBM’lerin özellikle içme suyu şişelerinin üretiminde kullanılıyor olması konu hakkında birçok çalışma yapılmasını sağlamış ve başta Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya olmak üzere Türkiye’de de halkın dikkatini çekmiştir. Yapılan araştırmaların sonuçları göz önünde bulundurularak, Kanada’da BPA 2008’de insan sağlığına toksik olarak adlandırılmış, Amerika’nın birçok eyaletinde (Mohapatra, 2010), ve, birçok avrupa ülkesinde BPA kullanımına yasaklamalar getirilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, daha önce Türkiye’de hakkında hiçbir araştırma yapılmamış olan şişelenmiş içme sularında östrojenik aktivite ile ilgili araştırma yapılması amaçlanmıştır. Türkiye’de daha önce uygulanmamış olan bir biyodeney, İTÜ Çevre Mühendisliği Laboratuvarları’nda kullanılmaya başlanmıştır. YES

biyodeneyinde kullanılan rekombinan mayaların, insan östrojen reseptörüne sahip olması sebebi ile deney sonucunda elde edilen değerler, içme suları içerisinde bulunabilecek olan tüm endokrin bozucu maddelerin insan hormon sistemi üzerinde oluşturabileceği etkileri yansıtmaktadır. YES biyodeneyine ilave olarak, LC-MS/MS kullanılarak, önceden seçilmiş olan iki endokrin bozucu madde (BPA ve NP) konsantrasyonlarının ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler yapılmadan önce, bu maddelerin konsantrasyonlarını ölçebilecek analitik bir yöntem oluşturulmuştur.

Hem östrojenik aktivite hem de LC-MS/MS deneylerinden önce, ng/L seviyesindeki ya da daha düşük konsantrasyonda olması beklenen EBM' lerin konsantre hale getirilmesi amacı ile katı faz ekstraksiyonu (KFE) metodu oluşturularak, bu yöntem hem biyodeney hem de LC-MS/MS ölçümlerine girişim yapmayacak şekilde optimize edilmiştir. Yapılan optimizasyon sonucunda 50 kez konsantre edilmiş numunelerin BPA için YES testi 2,7 ng/L östrojen eşdeğeri, LC-MS/MS için de 1 ng/L ölçüm limiti elde edilmiş, ancak NP ölçümünün KFE adımıda bazı problemler yaşanmıştır.

Çalışma kapsamında, rastgele seçilen 5 farklı firmanın PET, 12 farklı firmanın polikarbonat ve 2 markanın cam şişe suları numune olarak kullanılmıştır. 50 kez konsantre edilmiş PET şişe su numuneleri 3 farklı markada, polikarbonat şişe su numuneleri 4 farklı markada ve bir cam şişe su numunesinde toplam östrojenik aktivite 2,7 ng/L olan ölçüm limitinin üzerinde çıkmıştır. Bu numunelerin LC-MS/MS ölçüm sonuçlarında 1,8 ile 117,7 ng/L arasında değişen BPA konsantrasyonları tayin edilmiştir. Elde edilen östrojenik aktivite değerinin suda bulunan BPA konsantrasyonu sonucunda oluşabilecek olandan fazla olması başka endokrin bozucu maddelerin de varlığına işaret etmektedir. Cam şişe numunesinde belirlenen östrojenik aktivite, bu etkinin sadece şişe malzemesinden değil, su kaynağında bulunabilecek kirleticiler ya da kirleticilerin suyun arıtım aşamasında oluşabilecek yan ürünler nedeni ile ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma, östrojenik etkinin değerlendirilmesi ve şişelenmiş içme sularında bulunabilecek olan östrojenik aktivite ile endokrin bozucu madde olduğu bilinen ve birçok alanda sıklıkla kullanılan BPA'nın varlığı ile korele edilmesi açısından Türkiye'de bir ilk olmuştur.

ASSESSMENT OF ESTROGENICITY BOTTLED WATERS AND ITS RELATION WITH THE PRESENCE OF ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS

SUMMARY

As water is the fundamental requirement for living organisms to survive, the pollutants in water are amongst the most crucial aspects to be considered. Recently, contaminants in drinking water have become an important issue due to both. Increase in pollution of water sources, as well as the incomplete mineralization in chlorination process leading to disinfection by products.

Natural (estrone and 17β -estradiol) and synthetic (17α -ethynylestradiol) hormones usually stand out among the endocrine disrupting compounds (EDCs) and these compounds can enter the water cycle through their use in hormone therapy or in birth control pills and subsequently, lead to problems in several organisms. In addition to the hormones, organic pesticides such as DDT or atrazine are included among the EDC. Moreover, compounds such as alkylphenols and bisphenol-A, which are used during the production of flame resistant compounds, surface active compounds, as well as polycarbonate and epoxy resins, are examples of EDC.

The effect of endocrine disrupting compounds (EDCs) on the environment and human health is increasingly becoming an important focus for scientific research and communities in the world. EDCs are known for their ability to mimic hormones and disrupt action or pathways of natural hormones, thereby, affecting normal hormonal functions. The presence of endocrine disrupting compounds in drinking and especially bottled water has become a major concern worldwide since they negatively affect wildlife and humans. As a result, EDCs should be effectively treated to eliminate wastewater effluents as one of their sources upon discharge of wastewater effluents into surface waters, which then, can be a source of drinking water.

Unfortunately, since the removal efficiency of EDCs that enter wastewater treatment systems is not very high, the most important pathway for the introduction of EDCs into the water cycle is the treated wastewater discharged from wastewater treatment plants. Nevertheless, since several pesticides are included among the EDCs, not only point sources but also diffuse sources might lead to the pollution of surface waters and groundwater with EDCs. When we think about the water cycle, it is inevitable that the EDCs that might be present in surface water and groundwater contaminate drinking water.

The effects of EDCs on hormonal systems on the basis of only their chemical structure is not possible. Also the appearance of one of the EDCs is not enough to prove estrogenic activity. Nevertheless, at low concentrations, the combination of

some endocrine disturbing compounds is an important issue in ecotoxicology and can have harmful effects on wildlife and humans.

EDCs may possibly have an interference in wildlife and the endocrine system of humans by: i) mimicking natural hormones ii) disrupting action, pathways and synthesis of natural hormones iii) antagonizing the effect of natural hormones or iv) disrupting the synthesis of specific hormone receptors.

Bisphenol A has attracted considerable attention all over the world because of its wide usage. BPA is a synthetic industrial chemical which acts as a building block for polycarbonate materials. More than 2.000 million tons/year of BPA are used in the manufacturing of a wide variety of domestic products. It has been used in the production of epoxy resins, as a protective lining on the inside of metal-based food and beverage cans, polycarbonate plastics, baby bottles, household electronics e.t.c. BPA has been discharged directly or indirectly into the environment and this results in the contamination of water, soil and the atmosphere. Also, it leaches from baby bottles during hydrolysis of the polymer and lacquer-coated cans.

Nonylphenol is classified as an endocrine disrupting compound which is capable of interfering with the hormonal system of some organisms. It is originally produced from the degradation of nonylphenol ethoxylates which are mostly used as industrial surfactants. Substantial quantities of nonylphenol ethoxylates reach sewage treatment works, where they biodegrade into several by-products such as nonylphenol. Due to its physio-chemical characteristics nonylphenol, easily accumulates in environmental compartments. Nonylphenol is often found in matrices such as sewage sludge, effluents from sewage treatment works, river water and sediments, soil and groundwater.

Health Canada proposed classification of BPA as toxic to human health and the environment in April, 2008. In 2011, EC established a specific migration limit for BPA from food plastic of 600 ng/g and a tolerable daily intake (TDI) of 0.05 mg/kg body weight has been set by the European Food Safety Authority (2006). The United States Environmental Protection Agency (USEPA) has established 50 µg/kg per day based on the lowest observable adverse effect level of BPA. In 2011, Sweden announced the ban of BPA in cans containing food for children under the age of three. Turkey banned the usage of BPA in baby bottles and other PC items which are produced for babies on 10 June 2011.

Because of the harmful effects of the degradation of products containing nonylphenol ethoxylates in the environment, the use and production of these compounds have been banned in EU countries and strictly monitored in many other countries including Canada and Japan.

The purpose of this study was to find out the occurrence of endocrine disrupting compounds in bottled waters. There is also evidence of polyethylene terephthalate (PET) and polycarbonate being a source of contamination and estrogenic activity in commercially available bottled waters. The examined compounds were Bisphenol A (BPA) and nonylphenol (NP). The presence of EDCs were investigated in bottled waters from different brands purchased from local markets.

To examine estrogenic activity and the concentration of EDCs in bottled waters, the yeast estrogen screen (YES) and LC-MS/MS analytical methods were used. Because the expected concentration of EDCs in bottled water was in nanograms, samples needed to be highly concentrated. Samples were cleaned-up and preconcentrated by the solid-phase extraction (SPE) procedure using Oasis HLB cartridges. 1 L volume of samples extracted to 10 mL was used for bioassay (YES) and 1 mL of sample was used for liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Extraction was carried out on 17 different water samples of randomly chosen brands.

BPA occurrence in samples which were concentrated 50 times was between 1,8 - 117,7 ng/L. The presence of anti-estrogenic compounds and/or the estrogenic activity of unknown/unidentified contaminants lead to a difference in results between YES and LC-MS/MS. Additionally, glass corboy water from 2 differend brands sample of one brand which had been chlorinated was carried out and estrogenic activity was over the limit of detection. The result shows that estrogenic activity in drinking water can also be a result of an incomplete mineralisation step of chlorination.

YES bioassay optimized and used with the aim of assessing potential estrogenic activity of bottled waters and its relation with the presence of endocrine disrupting compounds was performed (applied) for the first time in Turkey.

1. GİRİŞ

Çevresel koşullar ve hızla gelişen teknoloji, her alanda olduğu gibi içme suyu şişeleri, biberonlar ve plastik yemek kapları gibi ürünlerin üretimde de yeni kimyasallar kullanılmasına neden olmuştur. Bu kimyasalların canlılar üzerindeki etkisi ise son 15-20 yıldır bilim insanlarının araştırma konusu haline gelmiştir.

Su, her canlının yaşamını sürdürebilmesi için ihtiyaç duyduğu esansiyel bileşiktir. Özellikle içme suyunun, canlı bünyesine direk alınması sebebi ile içme suyundaki herhangi bir kirleticinin varlığı, canlı bünyesini ciddi olarak etkilemektedir. Dolayısıyla, geçmişte ve günümüzde bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmış, en katı düzenlemeler içme suyu parametrelerinde uygulanmıştır. Yapılan son çalışmalar, içme suyu şişelerinin üretim aşamasında kullanılan bazı maddelerin insanların farklı sistemleri üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini ortaya koymuştur. Bu maddelerin insanlar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte, özellikle bu maddeleri içeren atıksuların deşarj noktalarında yaşayan kurbağa yavrusu, bazı balık çeşitlerinin endokrin sistemi üzerinde etkileri gözlemlenmiş, bu veriler insan endokrin sistemi üzerinde oluşabilecek etkiler konusunda büyük endişe konusu olmuştur.

1.1 Çalışmanın Anlam ve Önemi

Günümüz koşullarında, şişelenmiş içme sularının kullanımının fazlasıyla yaygın olması, içermeleri olası EBM'ler mikrokirleticiler nedeni ile tüm dünyada tartışmalı bir konu haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında daha önce yapılan araştırmalar göz önünde bulundurularak, şişelenmiş içme suyunda östrojenik aktiviteye neden olan kirleticiler, bu kirleticilerin konsantrasyonları ve belirli konsantrasyonlarda insan endokrin sistemini üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda, toplam östrojenik aktiviteyi belirlemek amacı ile kullanılan *in-vitro* maya östrojen izleme testi (YES) Türkiye'de ilk defa İTÜ Çevre Mühendisliği Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Ayrıca çalışma, YES biyodeneyi ile

belirlenen toplam östrojenik aktiviteye neden olan kirleticiler ve konsantrasyonları, LC-MS/MS ölçümleri ile spesifik olarak belirlenmesi açısından özgündür.

1.2 Çalışmanın Kapsamı

Çalışma kapsamında, farklı firmaların PET ve polikarbonat şişelenmiş içme suları numune olarak kullanılarak, bu sulardaki toplam östrojenik aktivite YES biyodeneyi ile bu östrojenik aktiviteye neden olduğu bilinen bisfenol A ve nonilfenolün varlığı ve numune içerisindeki konsantrasyonları ise LC-MS/MS ile belirlenmeye çalışılmıştır. İçme sularında çalışıldığı için hem LC-MS/MS hem de YES biyodeneyle öncesinde kullanılması zorunlu olan katı faz ekstraksiyonu ile konsantre etme adımı için en uygun şartlar oluşturulmuştur. KFE' nin optimizasyonunun ardından, toplamda 17 farklı marka suyu numunelerinde hem YES hem de LC-MS/MS ölçümleri yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Endokrin Bozucu Maddeler ve Östrojenite

Su canlıları üzerindeki olumsuz etkileri bilinen, endokrin bozucu maddeler (EBM'ler), 1990'lı yıllardan beri toplumsal, politik ve bilimsel bir problem olmuş, tüm dünyada güncel çevresel araştırma konuları arasında yer almış ve her geçen gün birçok madde endokrin bozucu olarak şüpheli listesine alınmaktadır (Guart, 2011; Sun, 2008; Wagner, 2009). EBM'ler, insanların ve hayvanların endokrin sistemini i) içsel hormonların etkilerini taklit ederek ii) içsel hormonların etkisini azaltarak iii) içsel hormonların sentezini ve metabolizmasını bozarak ya da iv) özel hormon reseptörlerinin sentezini engelleyerek etkilemektedir (Colos, 2011; Silva, 2012).

EBM'ler, aralarında siklopentan-peridrofinantren halkası içeren biyolojik açıdan aktif steroid hormonların da bulunduğu çok geniş bir kimyasal grubunu kapsamaktadır. Doğal östrojenlerden estron (E1), 17 β -estradiol (E2) ve estriol (E3) ile sentetik 17 α -etinilestradiol de (EE2) bu grupta yer almaktadır (Silva, 2012). İnsanlar ve hayvanlar aracılığıyla atıksulara karışan bu maddelerin yanı sıra, ticari olarak üretilip kullanılan kimyasallardan bazıları da endokrin bozucu etki göstermektedir. 4-tert-oktilfenol (4-t-OP), 4-kumilfenol (4-CP), 4-nonilfenol (4-NP) ve BPA gibi fenolik yapıdaki EBM'ler, steroid yapıdakilere kıyasla daha düşük bir östrojenik aktiviteye sahip olsa da (yaklaşık olarak 10000 kat daha az, (Maggioni, 2013; Ying, 2008), bulundukları konsantrasyonlar itibari ile sulardaki varlıkları önem taşımaktadır. Nitekim, literatürde de, su kalitesi ile ilgili gelecekte yapılacak çalışmalarda, doğal hormonların dışındaki endokrin bozucu maddelerin de izlenmesi önerilmektedir (Grover, 2011). Örneğin, BPA, USEPA World Wide Fund for Nature tarafından "endokrin bozucu" (Cooper, 2011) olarak tanımlanmış ve nonilfenol de AB tarafından Su Çerçeve Direktifi'nde öncelikli maddeler listesine dahil edilmiş ve yasalarla kontrol altına alınmıştır (Comission, 2008).

Mevcut veriler, içme suyuna karışan östrojenik kirleticilerin insanlar üzerinde fizyolojik olarak etki edebileceği sınırın çok altında olduğunu gösterse de içme

suyunun kalitesi ve su arıtma sistemlerinin verimliliği birçok ülkede endişe konusudur (Falconer, 2006). Bu kirleticilerin varlığının ve konsantrasyonunun potansiyel etkisi gözlemlenmelidir. Avrupa’da, içme suyunda artık pestisit konsantrasyonu, Avrupa Birliği (European Commission) tarafından tek bir pestisit çeşidi için 100 ng/L, toplam pestisit konsantrasyonu ise 500 ng/L olarak sınırlandırılmıştır (EC 1998). Yüzeysel sularda, çevresel kalite standartları ise, atrazin için 0,6 g/L, nonilfenol için 0,3 µg/L, oktilfenol için 0,1 µg/L, ve simazin için 0,1 µg/L (EC 2008), ve sonrasında sırasıyla 17α-ethinylestradiol ve 17β-estradiol için 35 ve 400 pg/L içeren birincil kirleticileri de (doğrudan kaynaktan gelen) içeren yıllık ortalama kalite standartları belirlenmiştir (EC 2012). Buna ek olarak, yiyecek plastik kaplarından geçen BPA konsantrasyonu için 600 ng/g (EC 2011) ve Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (2006) tarafından da kabul edilen günlük alım olarak ise 0,05 mg/kg olarak belirlemiştir (Maggioni, 2013).

2.1.1 Endokrin bozucu maddelerin kaynakları

EBM’lerin, plastik şişeler, deterjanlar, alevlenmeyi geciktiriciler, oyuncaklar, polikarbonat şişeler, biberonlar, plastik yiyecek kapları, spor malzemeleri, diş dolgu malzemeleri, kozmetikler, pestisitler gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır (Jurado, 2012).

Doğal hormonlar, bitkisel ilaçlar, tıbbi ilaçlar ve pestisitler, alkil fenoller, ftalatlar, BPA gibi bazı endüstriyel kimyasallar da EBM olarak bilinmektedir. Bu kimyasalların birçoğu endüstrilerde, dünya çapında polikarbonat şişelerin ve epoksi reçinelerin yapımında plastik monomeri ve plastikleştirici (yumuşatıcı) olarak en fazla kullanılan yüzey aktif alkil fenol polietoksilatlar (APEs) ve BPA’nın bozunma ürünleri olan alkil fenoller, nonilfenoller (NP) ve oktilfenoller (OPs) dir. (Vandenberg, 2007).

Çevre kaynaklı östrojenler, endokrin bozucu bileşikler olarak bilinen bileşiklerin önemli bir çeşitidir. EBM’lerin potansiyel çalışma mekanizması, endojen hormonların biyosentezi, taşınması ya da kullanılabilirlik yönleri de dahil olmak üzere endokrin fonksiyonu modülasyonu ve metabolizmayı içerebilir. Buna ek olarak, EBM’ler hormon reseptörleri ve sinyal prosesinin karşılıklı etkileşmesine neden olarak hormonların aktivitesini etkileyebilmektedir.

Atıksu arıtımı sonrası suyun yeteri kadar uzaklaştırılmaması, tarım kaynaklı sular ya da noktasal kirlenme, yüzeysel ve yeraltı sularında insan kaynaklı kirleticilerin varlığına neden olmaktadır. Bu kirleticilerin, doğal yaşam ve içme suyu kaynakları üzerindeki potansiyel etkisi geniş çaplı araştırma konusudur.

EBM'lerin su sistemlerine karışmasının bir diğer yolu da, hayvan ve insanlar tarafından salgılanan doğal hormonlarca zengin olan evsel atıksulardır. Alkil fenoller, BPA, steroid östrojenler ve triazin herbisitler, farklı ülkelerin içme suyunda 0,5 - 25 ng/L aralığında tespit edilmiştir (Stavarakakis, 2008; Loos, 2007; Kuch, 2001; Donald, 2007; Casajuana, 2003).

Yapılan son çalışmalar, insan kaynaklı kontraseptif gibi sentetik EBM'lere, ilaç etken maddeleri ve kişisel bakım ürünlerine, BPA, pestisit, alkali fenol içeren birçok endüstriyel kimyasallara odaklanmıştır (Dorival-Garcia, 2012).

2.1.2 Endokrin bozucu maddelerin etkileri

EBM'lerin etkileri oldukça tartışmalı bir konudur (Patisaul, 2010). İnsan kaynaklı bazı kimyasalların omurgasız hayvanlar (Oehlmann, 2003), sürüngenler (Guillette, 2000) ve balıklarda (Jobling, 1998; Kidd, 2007; Nash, 2004) üreme organ fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. İnsanlarda ise benzer etkinin östrojen benzeri endokrin bozucu bileşiklerin etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Nanogram seviyesinde bile EBM'lerin insan sağlığı ve çevre üzerinde etkileri bilimsel araştırmalarda git gide önem kazanmaktadır. EBM'lerin halk sağlığı üzerindeki muhtemel etkileri tartışmalara yol açan bir konu haline gelmektedir. Her ne kadar toksisite araştırmalarında potansiyel etki olarak cinsel farklılaşma (Swan, 2005), doğurganlıkta azalma (Skakkebaek, 2003), doğuştan üreme sistemi bozuklukları (Sharpe, 1993; Toppari, 1996), östrojene duyarlı dokularda artan kanser olasılığı (Dorival-Garcia, 2012) ve erkek bebeklerde feminizasyon (Swan, 2005) EBM'lerin başlıca etkisi olarak görülse de, bu maddelerin metabolik, bağışıklık, büyüme, davranış ve hafıza üzerinde de etki yaratabilme ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca, son zamanlarda yapılan araştırmalar, EBM'lerin kalp ve damarlara ilişkin (kardiyovasküler) rahatsızlıklara, diyabete (Lang, 2008) ve obeziteye (Grun, 2009) neden olabileceğini de göstermektedir.

Biyoakümülayonu da mümkün olan EBM'lerin insan ve diğler canlılar tarafından bünyelerine alınma yollarından en yaygın olanı oral yolla almaktır (Magi, 2010).

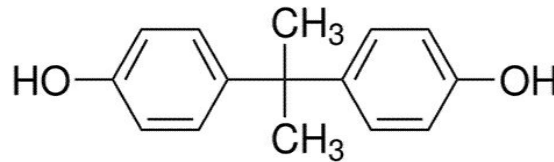
EBM'lerin doğada görülen en büyük etkilerinden biri ise, evsel ve kağıt fabrikaları atıksuyu deşarj noktalarında yaşayan birkaç farklı balık türünde üreme bozukluklarının görülmüş olmasıdır. BPA, NP, estron (E1), 17β- estradiol (E2), estriol (E3) ve 17α-etinilestradiol (EE2) bu su ortamlarında ana kirleticiler olarak bulunmuştur (Fernandez, 2009).

2.1.3 Endokrin bozucu madde örnekleri

2.1.3.1 Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A [2,2-bis(4- hidroksifenil) propan], dünya üzerinde üretim hacmi en yüksek olan kimyasallardan biridir (Vandenberg, 2010), ve çok sayıda tüketici ürününde kullanılan polikarbonat olarak bilinen sert, şeffaf plastiğı elde etmek için kullanılır (Fiege, 2000). Bunun yanı sıra, pestisit üretiminde, ateşe dayanıklı ürünlerde, evsel yüzey aktif maddelerde, kağıt üretiminde reaktif madde olarak, ateşe dayanıklı ürünlerde (Beck, 2006; Huang, 2012; Li, 2010; Liscio, 2009; Patrolecco, 2004; Sun, 2008; Ying, 2008), sağlık ve diş sağlığı cihazlarında (Liao, 2012) spor malzemelerinde kullanılmaktadır. Şekil 2.1'de kimyasal yapısı verilen BPA ayrıca, metal bazlı yiyecek kaplarının (konserve) ve paketleme malzemelerinin iç tabakasında koruyucu olarak kullanılan epoksi reçinelerde bulunmaktadır.

BPA, doğada (Kang, 2007), insan sıvılarında ve dokularında belirlenmiş (Calafat, 2008; Jiménez-Díaz, 2010), ve toksisitesi üzerinde 1970li yıllardan beri çalışılmaktadır. Doğal östrojen olan 17β-estradiol'e (E2) kıyasla östrojenik aktivitesi az olmasına karşın, deney hayvanlarında yapılan araştırmalar sonucu üreme sisteminde dikkat çeken etkileri gözlemlenmiştir (Richter, 2007).



Şekil 2.1 : BPA'nın kimyasal yapısı.

BPA, suda orta derecede çözünebildiğı ve düşük buhar basıncına sahip olduğı için (Çizelge 2.1), evsel ve endüstriyel atıksu arıtma tesisi çıkış sularının alıcı ortama deşarj edilmesiyle ve katı atık depolama sahalarının sızıntı sularında plastiklerin

hidrolizi ya da polikarbonat plastiklerin doğal olarak parçalanması sonucunda sulara karışmaktadır.

Çizelge 2.1 : BPA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (EC 2003, 2008).

Moleküler Ağırlığı	228,29 g/mol
Erime Noktası	155°C
Kaynama Noktası	360°C (101,3 kPa)
Bağıl Yoğunluk	1,2 g/cm ³ (25°C)
Buhar Basıncı	5,3E-09 kPa (25°C)
Suda Çözünürlük	300 mg/L (25°C)
Oktanöl-Su Dağılım Katsayısı (Log Kow)	3,4

Yapılan birçok çalışmada, şişelenmiş sularda plastikleştirici olarak kullanılan maddelerin; (a) şişelenme tesisinde su ile kontaminasyonu, (b) her ne kadar şişe üretiminde kullanılan ana madde ve teknolojiye bağlı olsa da plastikleştiricinin şişe materyalinden suya geçişi, (c) kullanılan birçok plastikleştiriciye bağlı olarak analitik prosedür sırasında karşılıklı kirletme (çapraz kontaminasyon) sonucu suya geçtiği düşünülmektedir.

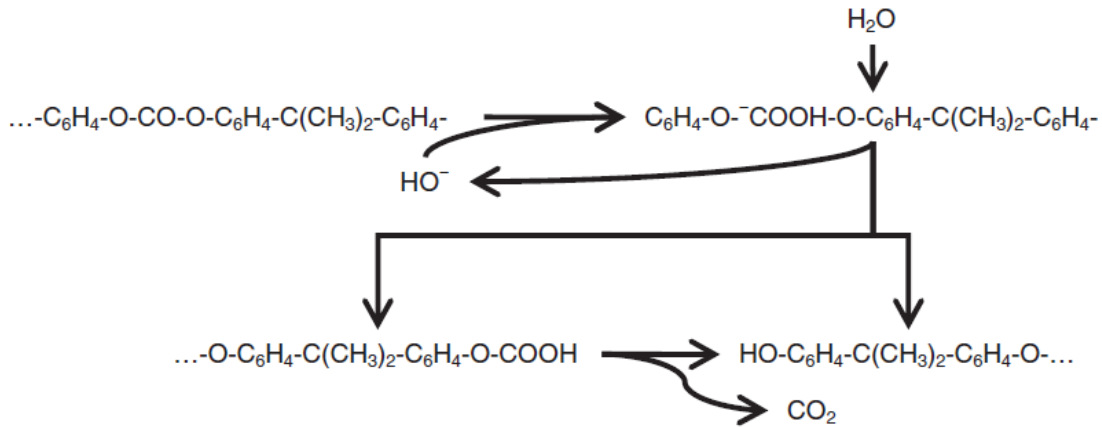
Şişe yüzeyindeki ya da şişe yüzeyine yakın bulunan BPA'nın kolaylıkla çözünüp sızabileceğini rapor edilmiştir (Le, 2008). Yapılan bir araştırmada birkaç farklı markanın PET şişe kaynak suyu numunelerinde 3 – 10 ng/L konsantrasyonda BPA ölçülmüştür (Toyo'oka, 2009). BPA'nın polikarbonat şişelerden suya sızdığı ve yüksek sıcaklığın bu sızma oranını ortalama 55 kat arttırdığını bulunmuştur (Le, 2008).

Her yıl 2.000 milyon ton BPA, polikarbonat şişelerin üretiminde kullanılmaktadır. BPA'nın yaygın kullanım alanları düşünüldüğünde, insanlar birçok farklı yolla BPA'ya maruz kalabilmektedir (Dorival-Garcia, 2012).

BPA salınımı esas olarak şişe yapımı sonrasında şişede kalan BPA miktarına bağlı olup bu miktar standartlara uygun üretilmiş şişelerde 1-140 mg/kg arasında olmakla birlikte, standart dışı üretimlerde şişede kalan BPA konsantrasyonu 380-600 mg/kg'a çıkabilmektedir (Hoekstra, 2013). Şişe hammaddesinden difüzyon ile salınım ek olarak yiyecek ya da içecek maddesi ile temas sonucunda polimerin hidrolizi de diğer bir BPA salınım mekanizmasıdır Şekil 2.2' de verilmiştir (Hoekstra, 2013).

2013 yılında yayınlanmış olan kapsamlı bir literatür taraması makalesinde, polikarbonat şişelerden BPA salınımında, öne çıkan faktörler olarak temas süresi, sıcaklık ve pH belirtilmektedir (Hoekstra, 2013). Polikarbonat şişelerden BPA salınımının alkali hidroliz yoluyla olması sebebiyle, alkali deterjanlarla yapılan yıkamaların bile BPA salınımını artırabileceği öne sürülmektedir (Hoekstra, 2013). Sert su kullanımından kaynaklanan yüksek pH değerleri polikarbonattan BPA salınımını 5 kattan daha fazla arttırmaktadır (Biedermann-Brem, 2009).

Biberonlardan su matrisine geçen BPA miktarı hem sıcaklık hem de temas süresine göre değişmekle birlikte, kısa süre için çok yüksek sıcaklıklarda salınan BPA miktarı, orta sıcaklıkta ancak uzun süreli temas sonucunda salınan BPA miktarından daha düşüktür (Hoekstra, 2013). Bu da özellikle 19 L'lik su damacanelerinin uzun sürede tüketildiği durumlarda suya geçebilecek BPA miktarının önemli olacağını düşündürmektedir. Polikarbonat şişenin/damacanelerin kaçınıcı kez kullanıldığı da BPA salınımını etkilemek olup şişelerin ardışık kullanımları sonucunda suya geçen BPA miktarı azalmaktadır (Hoekstra, 2013).



Şekil 2.2 : Polimer hidrolizi ile BPA salınımı mekanizması.

BPA'nın polikarbonat şişelerden sızması ve insana geçmesi ile ilgili en yeni ve en kontrollü çalışma, 2013 yılında Çin'de gerçekleştirilmiştir (Li, 2013). İdrardaki BPA konsantrasyonunun polikarbonat ve seramik şişe/bardak kullanan 25 kişide 3 hafta boyunca ölçülmesi sonucunda polikarbonat şişeden su içilmediği durumlarda idrardaki konsantrasyon düşmüş ve tekrar polikarbonat şişeye dönüldüğünde yükselmiştir. Tekrar kullanılabilir polikarbonat şişelerden suya geçen BPA konsantrasyonu, şişenin kaçınıcı kullanımı ile ilişkili olup yeni şişelerden suya geçen BPA konsantrasyonu daha yüksektir (Colin, 2014).

İçme sularının dezenfeksiyonu için klorlama ya da ozonlama gibi prosesler kullanıldığı düşünüldüğünde, insanların sadece EBM'ler değil; bu maddelerin klorlanması sonucunda oluşacak klorlanmış yan ürünlere de maruz kalabilme ihtimali ortaya çıkmaktadır. Ozonlama sonucunda çoğu organik maddenin ve dolayısıyla EBM'lerin son ürünlere kadar oksitlenmesi mümkün olsa da, son birkaç yılda yapılan çalışmalar çeşitli EBM'lerin klorlanması sonucunda oluşacak ürünlerin östrojenik aktivitelerinin de çok önemli olabileceğini ortaya koymuştur (Fan, 2013; Kuruto- Niwa, 2005). Özellikle monokloro-BPA, konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, östrojenik aktivitenin çoğunluğuna sebep olabilir (Fan, 2013).

Su ortamı, BPA'nın en yaygın olarak bulunduğu ortamdır (Cousins, 2002). Son 10 yıl boyunca bu konuda kapsamlı araştırmalar yapılmış ve farklı ortamlarda BPA'nın ölçümleri rapor edilmiştir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da, doğada BPA'ya maruz kalma sonuçları istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Klecka, 2009). Temiz yüzey sularında ortalama BPA konsantrasyonu sırasıyla 0.081- 0.01 mg/L'dir. Yüzey sularının aksine, sedimentler ve deniz ekosistemi için pek fazla veri bulunmamaktadır (Melcer, 2011).

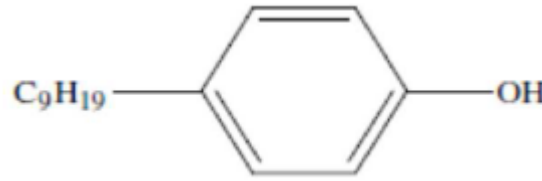
BPA'nın biberonlardan bebeklerin bünyesine geçme ihtimali sebebiyle bebek ürünlerinde BPA kullanımı 2008 yılında Kanada'da, sonra AB ülkelerinde (European Union, 2013) ve 2011 yılında ülkemizde (Mevzuat, 2013) yasaklanmıştır. Amerika'nın eyaletlerinde de BPA için çeşitli yasalar çıkartılmıştır (Mohapatra, 2010). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), fetüs ve yeni doğan bebekler gibi hassas alt grupların da dahil olduğu tüketici grubu için günlük tolere edilebilir BPA'ya maruz kalma dozunu 0.05 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. Avustralya ve Yeni Zelanda da Avrupa ülkelerinin uygulamasını benimsemiştir. Ancak Asya ve Afrika ülkelerinde BPA ile ilgili bir kontrol mekanizması henüz geliştirilmemiştir (Bach, 2012).

Ayrıca, Avrupa Birliği (EC, 2011), biberonlarda BPA kullanımını kısıtlayıcı bir madde ekleyerek Direktif 2002/72/EC'yi düzenlemiştir. Mevcut durumda, 2013 yılı itibari ile 3 yaşının altındaki çocuk yiyecek kaplarında BPA'nın kullanımının yasaklanması Fransız Senatosunda kabul görmüş, 2015 yılı itibari ile ise ülkedeki tüm yiyecek paketlerinde BPA kullanımı yasaklanmış olacaktır. Fransa Millet Meclisi, BPA için yapılacak olan tüm yasaklamalar nedeni ile 1 Temmuz 2014 yani yasaklamanın başlamasından 6 ay önce, BPA yerine kullanılabilecek diğer

alternatiflerin potansiyel toksik etkisi ile ilgili bir rapor hazırlanması için hükümete başvurmuştur (Molina, 2013).

2.1.3.2 Nonilfenol (NP)

Nonilfenol [4-(2,4-dimetilheptan-3-yl)fenol], en çok nonilfenol etoksilatlı yüzey aktif maddelerin (%65), antioksidanların, yağlama yağı katkılarının üretiminde kullanılan ksenobiyotik bileşiktir (USEPA, 1990). Nonilfenol etoksilatlar, ucuz ve etkili olmaları nedeni ile deterjan, emülsiyonlaştırıcı, sulandırıcı ve çözücü maddeler, statik elektrik önleyici maddeler gibi birçok endüstriyel, ticari malzemeler ve ev eşyalarında kullanılmaktadır (Fiege, 2000; Langford, 2002; Lorenc, 2003). NP'nin, NP polietoksilatlar göre daha kalıcı ve zehirli olup endokrin bozucu madde olarak davrandığı birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Stephanou, 1982; Jobling, 1996; 1998; Gray, 1997; Comber, 1993; Yadetie, 2002; Hemmer, 2002). Şekil 2.3'te kimyasal yapısı verilen NP, doğal ortamda yaygın olarak bulunup, çeşitli çevresel ortamlarda da (Bennie, 1999; Ying, 2002) bulunabilmektedir.



Şekil 2.3 : NP'nin kimyasal yapısı.

NP'nin Çizelge 2.2'de verilen fiziksel ve kimyasallar özellikleri, BPA'ya benzerlik göstermese de, doğal kimyasal yapısı nedeni ile tıpkı BPA gibi östrojen reseptörüne bağlanıp, östrojen hormonu salgılanmasına dolayısıyla östrojenik aktiviteye neden olabilecek bir kirleticidir.

Çizelge 2.2 : NP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Soares, 2008).

Moleküler Ağırlığı	220,34 g/mol
Erime Noktası	-2°C
Kaynama Noktası	293°C
Bağıl Yoğunluk	0,952 g/cm ³ (25°C)
Buhar Basıncı	2,07E-02 kPa (25°C)
Suda Çözünürlük	4,9 mg/L (25°C)
Oktanöl-Su Dağılım Katsayısı (Log Kow)	4,48

Nonilfenolün 1940'da ilk sentezinden itibaren üretimi neredeyse katlanarak artmıştır (Anonymous, 2001; Manzano, 1998). Yıllık nonilfenol üretimi, Amerika Birleşik Devletleri'nde 154.200 ton (Anonymous, 2001), Avrupa'da 73.500 ton (HELCOM, 2002), Japonya'da 16.500 ton (JME, 2001) ve Çin'de 16.000 tondur (Anonymous, 2004).

NP özellikle en çok su ortamında bulunup, atıksulardaki konsantrasyonu yüzey sularından çok daha yüksektir (Ahel, 1994a; Farre, 2002; Fujita, 2000). Nonilfenol etoksilat ve ayrışma ürünlerinin, öncülerine göre su hayatı için daha toksik olduğundan ilk olarak 1983-84 yılında İsviçreli bilim adamı Giger ve arkadaşları tarafından bahsedilmiştir (Giger, 1984). Ardından Soto ve arkadaşları (1991), tesadüf sonucu nonilfenolün göğüs tümörü hücrelerinin çoğalmasına neden olabileceğini bulmuştur (Soto, 1991). Nonilfenol, doğal hormon olan 17 β -estradiol gibi davranıp, östrojen reseptörüne bağlanmak için doğal östrojen ile rekabet etmektedir (Lee, 1996; White, 1994).

Yapılan araştırmalarda nonilfenolün endokrin bozucu etkisi 4 hafta boyunca 0,96 mg/L konsantrasyonda nonilfenole maruz kalan deniz canlılarında testis morfolojisinin bozulması olarak görülmeye başlanmış (Kinnberg, 2000), dişi proteinlerinin salgısının artışı neden olması ise ancak 20,3 mg/L gibi çok yüksek konsantrasyonda meydana gelmiştir (Jobling, 1996).

Nonilfenol etoksilatların endüstriyel olarak çok fazla kullanılmaları sebebi ile, bu maddeler atıksu arıtma tesisleri girişinde yüksek konsantrasyonda bulunur ve atıksu arıtma tesisi boyunca da tamamen olmasa da nonilfenole dönüşür (Ahel, 1994a; Johnson, 2005; Koh, 2005; Nakada, 2006; Shao, 2003). NP'nin kanalizasyon suyundan giderimi genellikle çamur partiküllerine adsorpsiyonu sayesinde olmaktadır ve yapılan çalışmalar bu partiküllerin anaerobik ya da yeteri kadar oksijenin bulunmadığı şartlarda sedimente ve biyotaya karıştığını göstermektedir (Ekelund, 1990; Jobling, 1996; Shang, 1999). Bu yüzden, nonilfenolün doğadaki asıl kaynağı, arıtma sistemi çıkışıdır (Ahel, 1994b; Fries, 2003; Langford, 2005a; Petrovic, 2002a; Petrovic, 2002b; Sabik, 2003).

Nonilfenolün atıksulardan arıtımı bölgeye ve arıtma prosesine bağlı olarak büyük değişiklikler (%9–94) gösterebilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen

veriler, arıtım çalışmalarının bazı EBM'lerin giderilmesi için kısmen etkili olduğunu göstermektedir.

Nonilfenol, atmosfere girdikten sonra, yağışla birikme yoluyla kara ve su ekosistemine transfer olur (Fries, 2004). Doğal suların yüzeylerindeki nonilfenol konsantrasyonu Güneş ışığı sayesinde fotolize uğrayarak azalmaktadır (Ahel, 1994c), ancak sedimentte tahmin edilen yarılanma süresi 60 yıldan daha fazladır (Shang, 1999).

Düşük çözünürlük ve yüksek hidrofobik gibi fiziksel-kimyasal özellikleri nedeni ile nehir sedimentleri ve arıtma çamuru gibi yüksek organik içerikli çevresel ortamlara kolaylıkla girişim yapabilen nonilfenol, 8,2 µg/L gibi düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları yavrularının yaşam sürecini ve dişi doğurganlık oranını etkilemektedir. Son yıllarda, NP'nin ayrıca erkeklerin normal gelişimi için gerekli olan androjenin salgılanmasına ve üreme sistemine müdahale ederek antiandrojenik etki yarattığı belirlenmiştir (Soares, 2008).

Bu endişe verici gözlemler nedeni ile, Avrupa ülkeleri öncelikle endüstriler ve hükümet arasında nonilfenol türevlerinin kullanımının azaltılması için gönüllü anlaşmalar önererek nonilfenolik bileşiklerin kullanımına karşı önlem almaya başlamıştır (PARCOM 92/8, 2000). Ardından, nonilfenol ve etoksilatları Su Çerçeve Direktifinde (Water Framework Directive) öncelikli tehlikeli madde olarak belirtilmiş (Directive 2000/60/EC, 2000) ve birçok kullanım alanında düzenlemeler yapılmıştır (Directive 2003/53/EC, 2003).

EPA, nonilfenolün kullanımının risk teşkil ettiğini kabul etmiş, temiz su kaynaklarında nonilfenol konsantrasyonunun 6,6 µg/L, tuzlu sularda ise 1,7 µg/L konsantrasyonun altında olması gerektiğini belirten bir yönerge hazırlamıştır (Brooke, 2005). Buna rağmen, Çin, Hindistan ve bazı Güney Amerika ülkelerinde nonilfenolik bileşiklerin üretimi ve kullanımı yüksek hacimde olup, kullanımını azaltan ya da yasaklayan bir sınırlama bulunmamaktadır. Avrupa'nın birçok ülkesinde, Kanada'da ve Japonya'da nonilfenol etoksilatların yerine başka surfaktanlar (yüzey aktif maddeler) kullanılmaya başlanmıştır. Bu surfaktanlar, daha az etkili olmalarına rağmen daha çabuk bozunmaktadır ve çevresel olarak daha güvenlidir (Campbell, 2002).

Yapılan bir şişelenmiş içme suyu EBM belirlenmesi araştırmasında İtalya'nın 35 şehrinden en çok satılan 5 markanın PET şişelerdeki içme suları yerel marketlerden alınmış ve numune olarak kullanılmıştır. Araştırmada bu tez çalışması kapsamında da uygulanan KFE ile numuneler konsantre edilmiş, hedef kirleticilerin varlığının saptanması ve konsantrasyonun belirlenmesi için YES ile benzer temele dayanan HELN ve HELN-ER α biyodeneyi ve LC-MS/MS analitik ölçümü kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada, numunelerden 2 farklı markanın şişelenmiş içme suyunda 0,83 ile 1,13 ng/L konsantrasyon aralığında BPA tayin edilirken, NP ölçüm limiti olan 7,7 ng/L'nin altındadır. BPA'nın PET şişe üretiminde kullanılmadığının bilinmesi nedeni ile belirlenen BPA'nın şişe kapağı, geri dönüştürülmüş PET şişe kullanımı ya da su kaynağından geldiği düşünülmektedir (Maggioni, 2013). PET şişe suyu numunelerinde NP, ancak şişe kapağı materyalinin NP içermesi durumunda belirlenmiştir (Guart, 2011).

Almanya'da PET şişe su numunelerinde yapılan bir araştırmada ise YES biyodeneyi kullanılmış, sonuçların bazıları ölçüm limitinin altında iken bazı numunelerde 75 ng/L E2 eşdeğer östrojenite değerine kadar çıkmaktadır. Sonuçlar cam şişe suyu numuneleri ile kıyaslandığında doğal östrojen hormonu gibi davranan maddelerin plastik paketlenme malzemesi, su kaynağı ya da üretim prosesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Wagner, 2009).

2.2 Östrojenik Aktiviteye Neden Olan Maddelerin Varlığı ve Östrojenik Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Yöntemler

2.2.1 YES biyodeneyi

Sularda mevcut olabilecek EBM'lerin varlığı ve etkisi iki farklı şekilde araştırılabilir. İlk yaklaşım suda bulunabilecek EBM'lerin tahmin edilerek, bu maddelerin konsantrasyonlarının ölçülmesidir. İlk yaklaşımın eksik yönü, sadece araştırılan maddeleri ölçebilecek ancak su östrojenik etki gösterebilecek olsa dahi ölçümü yapılmayan/yapılamayan maddeleri ve dolayısıyla toplam östrojeniteyi belirleyememesidir. EBM'lerin yapılarının birbirinden çok farklı olması sebebiyle potansiyel östrojenik aktivitenin tahmin edilmesi için, sadece kimyasal yapıyı baz alarak bir değerlendirme yapılması yerine (Bergamasco, 2011), ikinci bir yaklaşım olarak, doğrudan bir biyodeney kullanılması ile suda bulunan bütün maddelerin ortaya çıkaracağı östrojenitenin ölçümü yapılabilir. Memeliler ya da balıklarla

yapılacak *in-vitro* biyolojik deneyler sayesinde, doğrudan endokrin bozucu etki ile ilgili veri alınabilmekte olmasına rağmen, bu deneylerin protokolleri, çok sayıda numunenin kısa sürede ölçümünü gerektiren su kalite izleme programları için oldukça zaman alıcı ve zahmetlidir (Beck, 2006). Kısa süreli testler arasında, insan östrojen reseptörüne sahip rekombinan maya testleri, sudaki östrojenik aktivitenin belirlenmesi açısından önemlidir (Routledge, 1996). *In-vitro* maya östrojen izleme testi (YES), çevresel numunelerdeki östrojenik aktivite ölçümü için kullanılabilen ortalama maliyetli, güvenilir, hızlı ve hassas bir yöntemdir (Beck, 2006; Colosi, 2011). İkinci yaklaşımın kullanılması ile çeşitli su matrisleri için elde edilen östrojenite verileri Çizelge 2.3’ de verilmektedir

Çizelge 2.3 : Çeşitli su matrislerinde östrojenik aktivitenin incelenmesi.

Su matrisi	Östrojenik aktivite ölçümü	Sonuç/Yorum	Referans
Baltık denizi	YES	Kıyıya yakın bölgelerde daha yüksek östrojenite tespit edilmiş, ancak toplam EEQ değeri genelde <1 ng/L olarak bulunmuştur.	Beck, 2006
Atıksu	YES	Giriş atıksuyunda çıkış atıksuyuna göre daha yüksek aktivite mevcuttur. Ayrıca dekonjugasyon sonrası östrojenik aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Bu da atıksulardaki EBM’nin konjuge yani inaktif bir formda olduğunu göstermektedir.	Bistan, 2012

Çizelge 2.3 (devam) : Çeşitli su matrislerinde östrojenik aktivitenin incelenmesi.

Arıtılmış atıksu ile yeraltı suyu beslemesi	YES	Atıksular sadece östrojenik aktivite değil, antiöstrojenik aktivite gösteren maddeler de içermektedir ve bunların S eğrisinin şeklini etkilediği için fark edilebilmektedir. Bu maddeler yeraltında tutulunca çıkış suyu giriş suyundan daha yüksek östrojenik aktivite sonucu çıkmıştır.	Conroy, 2005
Arıtılmış atıksu	YES	Ölçülen maksimum E2 eşdeğeri 32 ng/L' dir. Elde edilen östrojenite eşdeğerleri LC-MS/MS'te ölçülen hormonların getireceğinden daha fazladır.	Krein, 2012
Yüzeysel su	YES	0,63- 20,77 ng/L aralığında E2 eşdeğeri östrojenik aktivite bulunmuştur.	Krein, 2012
İçme suyu kaynağı ve su şebekesi	YES	ABD' de 0,19-0,72 ng/L E2 eşdeğeri östrojenik aktivite, Güney Afrika'da is 0,63- 2,48 ng/L östrojenik aktivite tespit edilmiştir.	Maggioni, 2013

Çizelge 2.3 (devam) : Çeşitli su matrislerinde östrojenik aktivitenin incelenmesi.

Şişelenmiş su	YES	Numunelerin %60'ında östrojenik aktivite belirlenmiş. Maksimum östrojenik aktivite: 75,2 ng/L E2 eşdeğerindedir.	Wagner, 2009
Şişelenmiş su	YES	Araştırılan 18 numunenin 11'inde östrojenik aktivite tespit edilmiştir (1,9-12,2 pg EEQ / L). PET şişelerdeki sular, cam şişe sularına kıyasla 3 kat daha fazla östrojenik aktivite göstermiştir.	Wagner, 2011
Şişelenmiş su	YES	Numunelerin %38'inde östrojenik aktivite tespit edilmiştir.	Plotan, 2013

Biyodeneý kullanılarak sudaki östrojenitenin incelenmesinde, incelenen matriste, kimyasalların birbirini olumsuz ya da olumlu etkilemesi sonucunun belirlenmesi mümkündür. Örneğin, yapılan çalışmalar, atıksu numunelerinin %90'ında, sadece atıksularda bulunan hormon konsantrasyonlarının ölçülmesi ve bunlardan gelen östrojenitenin hesaplanmasının suda doğrudan östrojenite ölçümü yapılması sonucunda bulunan östrojeniteden daha küçük olduğunu göstermiştir (Krein, 2012).

YES testi gibi biyodeneýlerin kullanılması ile östrojenite ile ilgili doğru bilgiler elde edilse de, yine de, mühendislik açısından hangi maddelerin giderimine önem verilmesi gibi sorunların çözümüne yönelik veri elde etmek mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, östrojenik aktivitenin belirlenmesi için YES biyodeneýi ile birlikte gaz kromatograf ya da sıvı kromatograf gibi analitik bir tekniğin kullanılması, analiz edilen numunede östrojenik aktiviteyi oluşturan maddelerin de belirlenmesini sağlayabilecektir (Beck, 2006).

2.2.2 Tekil madde ölçümü için LC-MS/MS

LC-MS/MS ile yüksek hassasiyette ve türevlendirme işlemlerine gerek kalmadan EBM ölçümü mümkün olabilmektedir (Capriotti, 2013). LC/MS-MS kullanılarak yapılacak ölçümler için hem MS, hem de ayırım parametrelerinin ölçülecek maddeye göre optimize edilmesi gerekmektedir. MS parametrelerinin optimizasyonu için cihaza genellikle doğrudan yüksek konsantrasyonlarda madde enjekte edilmektedir. LC-MS/MS ölçüm yönteminin geliştirilmesi, yapılan her çalışmada kullanılan cihaz ve kolona da bağlı olarak spesifik bir şekilde ortaya konduğu ve bir bütün olduğu için bu çalışmalar makale bazında özetlenmiştir.

Dorival-Garcia ve diğ. (2012) Agilent 1200 seri (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) sıvı kromatograf ile bağlı API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tandem kuadropol kütle spektrometresi kullanarak analiz yapmıştır. Gemini C18 kolon (100x2,0 mm, 3 µm partikül çapı) kullanılarak 40°C’de 350 µL/dakika akış hızı ile enjeksiyon yapılmıştır. %0,025 amonyaklı sulu çözelti ile %0,025 metanol içinde amonyak hareketli faz olarak kullanılmıştır. İlk 3,5 dakikada %60 oranında %0,025 metanol içinde amonyak geçirilirken 3,5 ile 4 dakika arasında bu oran kademeli olarak %100 seviyesine getirilmiş, 4. ve 5. dakikalar arasında %100 oranında %0,025 metanol içinde amonyak sabit kalmış ve 1 dakika içerisinde başlangıç koşullarına dönmüştür. Atmosferik basınç iyonizasyon ile negatif modda iyonlaşma gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağının sıcaklığı 350°C’ye, iyon spray voltajı -3 kV’a, “collision energy” parametresi 10 psi değerine ayarlanmıştır. MS enjeksiyonunda BPA maddesinin moleküler ağırlığı 227,2 m/z olarak belirlenmişken parçalanma iyonları 212,2 ve 132,9 m/z olarak tespit edilmiştir. BPA-d16 maddesinin moleküler ağırlığı ise 241,2 m/z iken parçalanma ürünü 142 m/z olarak belirlenmiştir.

Fan ve diğ. (2013) tarafından Acquity Ultra Performance sıvı kromatograf (Waters, Milford, MA, U.S.) ve Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 µm partikül büyüklüğü) kolon kullanılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. Kolon 40°C’de şartlandırılmış ve hareketli faz 300 µL/dakika hızla kolondan geçirilmiştir. %0,1 formik asit ile asetonyitril hareketli faz olarak kullanılmıştır. %60 asetonyitril ile başlayan gradyan akış 0,5 dakika içinde %75 seviyesine lineer olarak yükselirken 6 dakika içinde %80’e, ardından 0,5 dakika içinde %95 seviyesine, 2 dakika içinde ise %100’e çıkartılmakta ve 2 dakika sabit olarak geçirilmektedir. Premier XE tandem

quadrupol kütle spektrometresi kullanılmıştır. BPA, pozitif modda elektrospray arayüzle iyonlaştırılmıştır. Kapiler voltajı 3,2 kV, iyon kaynağı sıcaklığı 120°C'ye ayarlanmıştır.

Krein ve diğ. (2012) Ultimate 3000 Intelligent marka sıvı kromatograf ile yapılan ölçümlerde ZORBAX Eclipse Plus C-18, (150 x 2,1 mm, 3,5 µm partikül büyüklüğü) kolon kullanmıştır. API 3200 (Applied Biosystem/MDS Sciex, Rotterdam, The Netherlands) kütle spektrometresi ile iyonlaşma kaynağı olarak negatif modda electrospray iyonizasyon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ise 10 mM amonyum asetat ve asetronitril kullanılmıştır. İlk 1 dakika %20 asetronitril ile başlayan gradyan 15 dakikada %70, 16 dakikada ise %95 seviyesine yükselmiş ve 1 dakika içinde başlangıç koşullarına geri dönmüştür. Hareketli faz, 250 µL/dakika akış hızı ile 40°C'de şartlandırılmıştır. Kapiler voltajı -4500 V, "collision energy" 5 psi olarak belirlenmiştir.

Liao ve Kannan (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ölçümler Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) serisi sıvı kromatograf ile bağlanmış olan Applied Biosystems API 5500 elektrospray triple kuadrupol kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Betasil C18 kolon (100 × 2,1 mm, 5 µm; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) ile ayırım gerçekleştirilmiştir. %15 metanol ve %85 10 mM amonyum asetat ile başlamış, ilk 2 dakika sabit kaldıktan sonra 0,5 dakika içerisinde %75 metanole çıkarılmış ve 5-10 dakika arasında %99 metanol seviyesine ulaşılmıştır. Daha sonra %15 metanol seviyesine dönülerek sabit tutulmuştur. BPA maddesi 227 m/z olarak tespit edilirken parçalanma ürünü 212 m/z olarak bulunmuştur.

Maggioni ve diğ. (2013) ise Perkin Elmer serisi 200 HPLC cihazını Applied Biosystem-SCIEX API 3000 tandem kuadrupol kütle spektrometresine bağlayarak çalışmıştır. LUNA C18 kolondan (50×2 mm, 5 µm partikül büyüklüğü, Phenomenex, Torrance, CA, USA) asetronitril ve %0,05 trietilamin geçirilmiştir. İlk 6 dakika içerisinde asetronitrilin oranı %70 değerine kadar arttırılmakta ve 7 dakika içerisinde oran %100 olmaktadır. İyon kaynağının sıcaklığı 350°C'ye, iyon spray voltajı -360 V değerine ayarlanmıştır. BPA, 227,1 m/z değerinden 93,1 ve 133,1 m/z değerine parçalanırken, NP 219,2 m/z değerinden 133,1 ve 161,1 m/z değerine parçalanmaktadır.

Petrie ve diğ. (2013) çalışmalarında Waters Acquity (Waters, Manchester, UK) ultra performans sıvı kromatograf ile Acquity UPLC BEH C18 (100×2,1 mm, 1,7 µm partikül büyüklüğü; Waters, Manchester, UK) kolon kullanarak kromatografik ayırım gerçekleştirmiştir. Kolon 30 °C sıcaklıkta şartlandırılmış ve %0,1 amonyum hidroksit içeren su ile %0,1 amonyum hidroksit içeren metanol hareketli faz olarak kullanılmıştır. İlk 4 dakika metanol %20 oranında sabit tutulurken 5 dakika içerisinde %80 civarlarına çıkartılmıştır. Bu koşullar 12 dakika boyunca sabit tutulurken 3 dakika içerisinde başlangıç koşullarına dönmüştür. Dedektör olarak Waters Quattro Premier (Micromass, Watford, UK) kütle spektrometresi kullanılmıştır. Kapılar voltaj 3200 V (pozitif mod) ve iyon kaynağı sıcaklığı 120°C tutulmuştur.

Stavarakakis ve diğ. (2008), ölçüm çalışmalarında Surveyor sıvı kromatografa bağlı TSQ Quantum Discovery kütle spektrometre (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) kullanmıştır. Kromatografik ayırım Purospher Star RP 18 (125 mm x 2 mm, 5 µm partikül çapı, Merck) kolonu ile 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Gradyan programı %40 metanol ile başlamış 1 dakika içerisinde %80 civarına getirilmiştir. 1-3 dakika arasında sabit tutulan program 8. dakikaya kadar lineer artışla %100 metanol seviyesine getirilmiştir. BPA için ana iyon 227,1 m/z iken parçalanma ürünleri 212 m/z ve 133 m/z olarak belirlenmiştir. NP ise 219,1 m/z iyonundan 106 m/z iyonuna parçalanmıştır.

2.2.3 Katı faz ekstraksiyonu (KFE)

Katı faz ekstraksiyonu (KFE), kromatografi için sıkça kullanılan bir numune hazırlama tekniğidir. Sıvı çözeltilere uygulandığında, sıvı kromatografi (LC) ile birçok benzerlikleri bulunmaktadır. Katı fazdaki maddeler için kullanılan en yaygın yöntem, içine sorbent yerleştirilmiş, genellikle polipropilen ya da cam gibi ölçüme girişim yapmayan maddeden yapılmış dar bir kolondan hedef kirleticiyi içeren numunenin geçirilmesidir. Kolonun içerisindeki sorbent, hedef kirleticiyi içerisinde tutacak şekilde seçilmelidir. Her ne kadar bu sınırların dışında sorbent içeren kolonlar bulunsun da genellikle kolon 50 mg ile 10 g arasında sorbent içermektedir. Sorbent, kolon içerisindeki filtre kağıdı ya da gözenekli polipropilen gibi iki geçirgen disk arasında bulunmaktadır. Böylece, sıvı kolaylıkla ya da çok az bir basınç farkı yardımıyla sorbent içerisinden geçebilmektedir. Basınç farkı, kolonun üst

noktasından az bir gaz basıncı ile, ancak sıklıkla alt bölgesine vakum uygulanarak sağlanmaktadır. KFE, numunelerdeki az miktardaki kirleticileri bile tutmak için yüksek verimli (üstün) bir prosedürdür. KFE sonunda elde edilen numune hacmi genellikle düşük miktardadır.

Kolonlar, kullanılmadan önce solvent ile şartlandırılmalıdır. Bu solventler, su ya da metanol olabileceği gibi, eğer ekstraksiyonu yapılacak olan numune su ise, hidrofobik özelliği yüksek solvent ile şartlandırmaya başlanıp ardından hidrofilik solventler ile şartlandırma adımı tamamlanabilir. Bu adımdan sonra, ekstraksiyonu yapılacak numune ince borular (tubing) vasıtasıyla düşük basınç (600 mm Hg ~0,8 bar) altında kolonlardan geçirilir. Ardından sorbent içerisinde sıvı kalmaması amacı ile kolonlar 30-60 dk arasında yüksek vakum altında (~2 bar) kurutulur. Sorbent içerisinde tutulan kirletici, genellikle şartlandırma adımı kullanılan solventler kullanılarak kirletici tekrar sıvı faz içinde tüplere toplanır. Son adım olarak solventler, genellikle azot gazı kullanılarak basınç altında uçurularak, kirletici ekstrakte edilmiş olur. Analit, tüplerde toplanır (Fontanals, 2012).

3. MATERYAL-METOT

3.1 Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

KFE prosedüründe kullanılan etil asetat (%99,8) , etanol (%99,9) ve DMSO (%99,9), Merck Inc., plastik 6cc, 200 mg ve cam 5cc, 200 mg cam HLB kartuşlar Waters Oasis Inc., LC-MS/MS ölçümlerinde kullanılan BPA, işaretli BPA, NP ve işaretli NP ana stokları (1000mg/mL) Absolute Inc.'den temin edilmiştir. YES biyodeneyinde kullanılan Yeast azot bazı, adenin, diklorometan (%99,8) ve SDS (%98,5) Sigma Aldrich, isolusin ($\geq$ %99,0), valin ($\geq$ %99,0), arjinin . HCl, lisin . HCl ($\geq$ %99,0), metionin, fenilalanin, treonin($\geq$ %99,0), tirosin ($\geq$ %99,0), histidin . HCl, leusin ve glikoz, Merck Inc.'den alınmıştır.

LC-MS/MS'te yapılan ölçümlerin değerlendirilmesi için gereken kalibrasyon eğrisini elde etmek amacı ile BPA, işaretli BPA, NP ve işaretli NP ana stokları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlanmıştır.

Ayrıca, YES biyodeneyinde elde edilen sonuçların değerlendirilebilmesi açısından 17 β -estradiol (E2) ile farklı konsantrasyonda ara stoklar hazırlanmıştır.

3.2 Numune Alımı

Çalışmaya, 0.33L, 0.5L, 1L, 1.5L ve 5L hacimlerinde PET şişelerdeki numuneleri ile başlanmıştır. Öncelikle 2 farklı markanın PET şişe numuneleri ve bir firmanın polikarbonat şişe numunesi KFE prosedürü uygulanmadan YES biyodeneyine tabii tutulmuş, ardından 5 farklı firmanın PET ve yapılan literatür taraması sonucu, BPA'nın en sık polikarbonat damacanelerin üretiminde kullanıldığı göz önüne alınarak; 13 farklı firmanın polikarbonat şişe suları KFE prosedürü uygulandıktan sonra numune olarak kullanılmıştır. Numune alınan firmalar seçilirken, farklı kaynak/üretim tesisinden dolum yapan firmalardan numune alınmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca, dezenfeksiyon yöntemi olarak klorlama kullanılan cam damacana numunelerinin deneyleri yapılarak, östrojenik aktiviteye neden olan kimyasal/kimyasalların su kaynağından gelme ihtimali de araştırılmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm malzemelerin teflon/cam olması, cam malzemelerin yakılması ve YES biyodeneyi süresince ortam havasıyla temasın önlenmesiyle, sonuçlarda pozitif hata olması engellenmiştir. Alınan numunelerde östrojenik aktivite belirlenmiş olan markalardan tekrar (rasgele) numune alınıp, deney yapılmasıyla ise ölçüm sonuçlarında pozitif bir hatanın olup/olmadığı tespit edilmek istenmiştir.

3.3 Deney Prosedürleri

Çalışmada, Türkiye’de ilk defa şişelenmiş içme sularında östrojenik aktivite araştırılmıştır. Hedef kirleticilerin beklenen konsantrasyonlarının nanogram seviyesinde olması sebebi ile, öncelikle alınan numuneler Şekil 3.1’ de gösterilen KFE ile konsantre hale getirilmiş, ardından YES biyodeneyi ile numunelerdeki toplam östrojenik aktivite E2 eşdeğeri olarak belirlenmiş ve LC-MS/MS ile yapılan ölçümler sonucu; numunelerdeki östrojenik aktiviteye neden olan kirletici spesifik olarak belirlenip, konsantrasyonu hesaplanmıştır.



Şekil 3.1 : Katı faz ekstraksiyonu.

YES biyodeneyine kullanılan malzemelerin bir bölümü tek kullanımlık teflon malzemelerdir. Bunun dışında kullanılan tüm volumetrik cam malzemeler öncelikle asetonitril ve çift distile su ile yıkanmış, volumetrik olmayan cam malzemeler ise kül fırınında 550°C'de 3,5 saat boyunca yakılmış ve otoklavda 40 dakika boyunca steril

edilmiştir. YES biyodeneyi boyunca Şekil 3.2’ de gösterilen laminar akışlı kabin ile çalışılarak kullanılan malzemelerin genel ortam havası ile teması engellenmiş, böylece deneylerde kontaminasyon olasılığı en aza indirilmiştir.



Şekil 3.2 : Laminar akışlı kabin.

YES biyodeneyi sonucunda elde edilen toplam östrojenik aktivite değerine neden olabilecek spesifik maddeler LC-MS/MS ile ölçülmüş, LC-MS/MS enstrümanı Şekil 3.3’ te verilmiştir.



Şekil 3.3 : LC-MS/MS enstrümanı.

3.4 KFE Yöntemi Optimizasyonu

KFE yönteminin şartlandırma ve toplama adımlarında kullanılan solventler, kartuş çeşidi, kartuşları kurutma süresi, uçurma prosedürü gibi değişkenler, yöntemin verimini (kullanılabilirliğini) fazlasıyla etkilemektedir. KFE yöntemi, ekstrakte edilmesi hedeflenen maddeye bağlı olarak her adımında değişiklik yapılabilecek bir yöntemdir. Bu tez çalışması kapsamında, KFE ön işlemine tabii tutulan numuneler hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS analitik ölçümleri yapılması nedeni ile özellikle çözücülerin uygun olarak ayarlanması gerekmektedir. Dolayısıyla, çalışmada en iyi sonuçları elde edebilmek amacı ile 7 farklı KFE yöntemi denenmiş, bu prosedürler Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Numuneyi konsantre hale getirmek için kullanılan KFE yöntemleri.

Şartlandırma	Yıkama	Kurutma	Toplama	Uçurma	Seyreltme	no.
diklorometan 2*2 mL	aseton:çift distile su (1:9) 5 mL	30 dakika	aseton 2*2 mL	Toplanan ekstraktın içine 50 uL DMSO eklenir, 50 uL kalana kadar	10 mL'ye çift distile su ile	1
aseton 2*2 mL			diklorometan 2*2mL			
çift distile su 2*2 mL						
diklorometan 2*2 mL	etanol:çift distile su (1:9) 5 mL	30 dakika	etanol 2*2 mL	Toplanan ekstraktın içine 50 µL DMSO eklenir, 50 µL kalana kadar	10 mL'ye çift distile su ile	2
etanol 2*2 mL			diklorometan 2*2 mL			
çift distile su 2*2 mL						
etil asetat 2*2 mL	etanol:çift distile su (1:9) 5 mL	30 dakika	etanol 2*2 mL	Toplanan ekstraktın içine 50 µL DMSO eklenir, 50 µL kalana kadar	10 mL'ye çift distile su ile	3
etanol 2*2 mL			etil asetat 2*2 mL			
çift distile su 2*2 mL						
aseton 2*4 mL	—	30 dakika	2*4 mL aseton	Toplanan ekstraktın içine 100 µL DMSO eklenir, 100 µL	1 mL'ye çift distile su ile	4
çift distile su 2*2 mL						

Çizelge 3.1 (devam) : Numuneyi konsantre hale getirmek için kullanılan KFE yöntemleri.

metanol 3*5 mL	2*5 mL çift distile su ile	30 dakika	2*5 mL metanol	Tamamen uçurulur	1 mL'ye metanol ile	5
çift distile su 3*5 mL						
etil asetat 2*2 mL	etanol:çift distile su (1:9) 5 mL	30 dakika	etanol 2*2 mL	Toplanan ekstraktın içine 50 µL DMSO eklenir, 50 µL kalana kadar	1 mL'ye çift distile su ile	6
etanol 2*2 mL			etil asetat 2*2 mL			
çift distile su 2*2 mL						
metanol 3*5 mL	çift distile su 2*5 mL	30 dakika	metanol 2*5 mL	Tamamen uçurulur	1 mL'ye etanol-distile su (1:9) ile	7
çift distile su 3*5 mL						

Tüm prosedürler E2 enjeksiyonlu deneme numunelerine uygulandıktan sonra hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS ölçümlerinde başarılı ve birbiriyle tutarlı sonuç veren KFE 3 prosedürünün kullanılmasına karar verilmiştir. Uygulanacak KFE prosedürü belirlendikten sonra; KFE prosedürünün geri kazanım oranı, kullanılan kartuş çeşidi ve kurutma süresi gibi değişkenlerden etkilenmesi sebebi ile farklı kartuş çeşidi ve kurutma süreleri denenerek, seçilen prosedür optimize edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, çalışmanın biyodeney de kapsaması nedeni ile KFE’de kullanılan solventlerin biyodeneyde kullanılan mikroorganizmalar üzerinde toksik etki göstermemesine dikkat edilmiştir. Numune hazırlanmasının son adımı olan toplama solventlerinin uçurulması adımıyla ise koruyucu olarak (hedef kirleticiyi içine alıp, uçmasına engel olacak) dimetil sülfoksitin kullanılıp kullanılmamasının etkileri de araştırılmıştır.

3.4.1 Farklı su çeşitlerinin şahit olarak kullanımı ile KFE

Yapılan her deneysel çalışmada şahit numune ihtiyacı olduğu gibi KFE’de de şahit numune sonuçları, gerçek numune sonuçlarını doğru bir şekilde değerlendirmek açısından gereklidir. KFE sonunda elde edilen numune hacminin düşük olması, numunenin YES biyodeneyinde kullanılması için seyreltme ihtiyacını doğurmaktadır. Seyreltme adımıyla kullanılan suyun matrisinin YES biyodeneyini pozitif ya da negatif etkileyecek bir madde/maddeler içerip içermediğini belirlemek amacı ile farklı su çeşitleri şahit olarak kullanılmış ve denemeler yapılmıştır. Aynı şekilde şahit numune LC-MS/MS için de kullanılarak, yapılan deneylerde kullanılan alet-edevat ve çözeltilerden bir kirlilik gelip gelmediği anlaşılmaya çalışılmıştır.

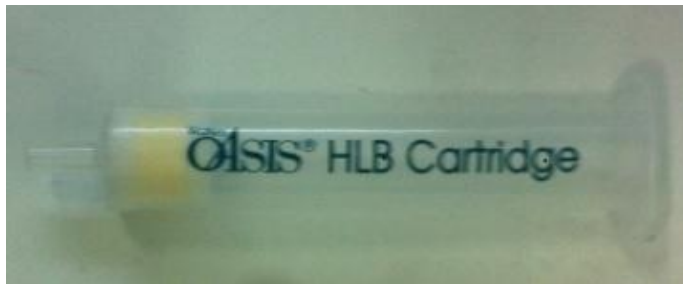
Seyreltme adımıyla kullanımı mümkün olan çeşme suyu, çift distile su ve steril su KFE’ye tabii tutulmuş, elde edilen sonuçlar çift distile ve steril suyun deneyde kullanımının uygun olduğunu göstermiştir. Ancak çift distile su prosesinin laboratuvar koşullarında olması nedeni ile daha az kontrollü olduğu göz önüne alınarak, parametrelerinin değişiklik gösterme ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle her iki suyun da şahit numune olarak birçok kez deneyleri yapılmış, elde edilen sonuçlar her iki suyun da seyreltme adımıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, KFE’nin seyreltme adımıyla deneylere etki etmeyen ve ekonomik açıdan kullanımı daha uygun olan çift distile su kullanılmıştır.

3.4.2 Farklı kartuş çeşitleri ile KFE

KFE'nin geri kazanım oranını etkileyen en önemli faktörlerden biri kartuş çeşitidir. Kartuşun markası, sorbentin fiziksel/kimyasal özellikleri, uzunluğu, kalınlığı gibi değişkenler, hedef mikrokirleticinin tutulma ve salınma oranını fazlası ile etkilemektedir. Bu nedenle, östrojenik aktivite için kullanılabilecek KFE hakkında literatür araştırılması yapılmıştır. Araştırma sonucunda; hedef kirleticiler için Evolute ABN, Waters C18 ve Oasis HLB kartuş çeşitleri ile çalışılabileceği bulunmuş ve bu 3 farklı kartuş çeşidi ile denemeler yapılmıştır. Sonuç olarak Oasis HLB kartuş ile en yüksek geri kazanım elde edildiği görülmüştür. Ancak, cam kartuşların maliyeti nedeni ile plastik ve cam HLB kartuşlar kullanılarak deneyler yapılmış, elde edilen sonuçlar plastik HLB kartuşların sonuçları etkilemediğini ortaya koymuştur. Yine de, YES biyodeneyinin güvenilirliğini etkilememek amacı ile bu biyodeney için yapılan KFE'lerde cam, kullanılan şahit ile kartuştan sızacak olan BPA'nın ölçülmesinin mümkün olması sebebiyle de, LC-MS/MS ölçümü için yapılan KFE'lerde plastik HLB kartuş kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılan kartuşlar Şekil 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.4 : Oasis HLB cam kartuş.



Şekil 3.5 : Oasis HLB plastik kartuş.

3.4.3 Farklı kurutma süreleri ile KFE

KFE'de kartuşların kurutulması için gereken süre, kısa olması durumunda uçurma öncesi elde edilen numunenin su muhtevasını etkilemesi ya da fazla uzun olması

halinde hedef mikrokirleticinin geri kazanım oranını düşürmesi nedeniyle dikkatle seçilmelidir. Bu nedenle, literatür araştırması sonucu öngörülen 30 ve 60 dakikalık kurutma süreleri denenmiş, muhtemel iki problemle de karşılaşılması sebebi ile kurutma adımı için 30 dakika uygun görülmüştür.

3.4.4 Dimetil sülfoksit kullanımı

KFE’de solvent ile toplanan EBM’nin hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS ölçümleri için toplama solventinin uçurulup, hedef EBM’nin dimetil sülfoksitin (DMSO) içinde tutulması gerekmektedir. Bu nedenle, KFE’nin toplama adımında kullanılan solventler azot gazı altında uçurulmuştur. Her ne kadar hedef EBM uçucu özelliğe sahip olmasa da, sonuçların en doğru biçimde elde edilmesi açısından birkaç farklı yöntem denenmiştir. Bunlardan biri; toplama adımı sonunda, solventler uçurulmadan önce; uçucu olmayan, deneylerin herhangi bir adımında toksik etki göstermediği bilinen ve hedef EBM’yi kendi içerisinde çözerek, uçmasını engelleyen dimetil sülfoksitten (DMSO) 50 µL toplanan eluente eklenip, ardından 50 µL numune kalana kadar uçurmaktır. Denenen diğer yöntem ise: toplama adımı sonunda elde edilen eluenti tamamen uçurup, ardından hacimce %1’lik etanol-steril su karışımı ile numunenin seyreltilmesidir. Her iki yöntem için %100 geri kazanımda 50 ng/L E2 ölçülecek şekilde enjeksiyon yapılmış, YES biyodeneyi sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2’ de verilmiş, sonuçlar değerlendirildiğinde DMSO kullanımına karar verilmiştir.

Çizelge 3.2 : DMSO ilaveli ve DMSO ilavesiz KFE 3 prosedürü sonuçları.

KFE 3 Prosedürü	Ölçülen E2 eşdeğeri (ng/L)
DMSO ilaveli	52.2 ± 6
DMSO ilavesiz	23.5 ± 3

3.5 YES Biyodeneyi ile Toplam Östrojenik Aktivite Ölçümü

YES biyodeneyinde normalde östrojen reseptörü içermeyen *Saccharomyces cerevisiae* rekombinan maya suşuna insan östrojen reseptörü ilave edilerek östrojenik aktivitesi ölçülmek istenen maddenin, östrojen reseptörlerine bağlanma kapasitesine bakılır.

Rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinin Çizelge 3.3’ de verilen ortamda üstel büyüme evresine gelmesi sağlandıktan sonra, maya hücreleri östrojenik aktivitesi ölçülmek istenen numunelere ilave edilir. Numune 16-18 saat boyunca inkübe edilerek maya hücrelerinin numune içindeki östrojenik aktiviteye neden olabilecek maddeler ile teması sağlanır.

Çizelge 3.3 : YES testi için kullanılan ortam.

Madde Adı	Madde Konsantrasyonu
Yeast Azot Bazı	6.7 g/L
Glikoz	%40
Isolusin (Ile)	30 mg/L
Valin (Val)	250 mg/L
Adenin (Ade)	50 mg/L
Arjinin . HCl (Arg.HCl)	20 mg/L
Lisin . HCl (Lys.HCl)	30 mg/L
Metionin (Met)	20 mg/L
Fenilalanin (Phe)	50 mg/L
Treonin (Thr)	200 mg/L
Tirosin (Tyr)	30 mg/L
Histidin . HCl (His.HCl)	200 mg/L
Leusin (Leu)	100 mg/L

Östrojenik maddelerin varlığında salgılanan β - galaktosidaz enzimi, maya hücre duvarları parçalanarak hücre dışına çıkartılır ve numuneye bu enzimle temas halinde renk değişimine (renksiz $\rightarrow$ sarı) neden olan orto-nitrofenil- β -galaktosit (ONPG) eklenir. Renklenmenin durdurulmasını takiben, hücre duvarlarının parçalanması sonucu oluşan kalıntılar santrifüjlenerek çöktürülür. Numunede 420 nm ve 600 nm dalgaboyunda absorbans değerleri okunarak inkübasyon tüplerindeki hücre yoğunluğu belirlenir. Testin sonuçları aşağıda verilen östrojenite miktarı hesaplama denklemi kullanılarak hesaplanır ve Miller Birimi olarak rapor edilir.

$$MU = \frac{OD_{420} * 1000}{t * V * OD_{620}} \quad (3.1)$$

MU: Miller Birimi

OD420: 420 nm dalgaboyundaki absorbans

OD600: 600 nm dalgaboyundaki absorbans

t: Kromojenik reaksiyon süresi

V: Testte kullanılan kültür hacmi

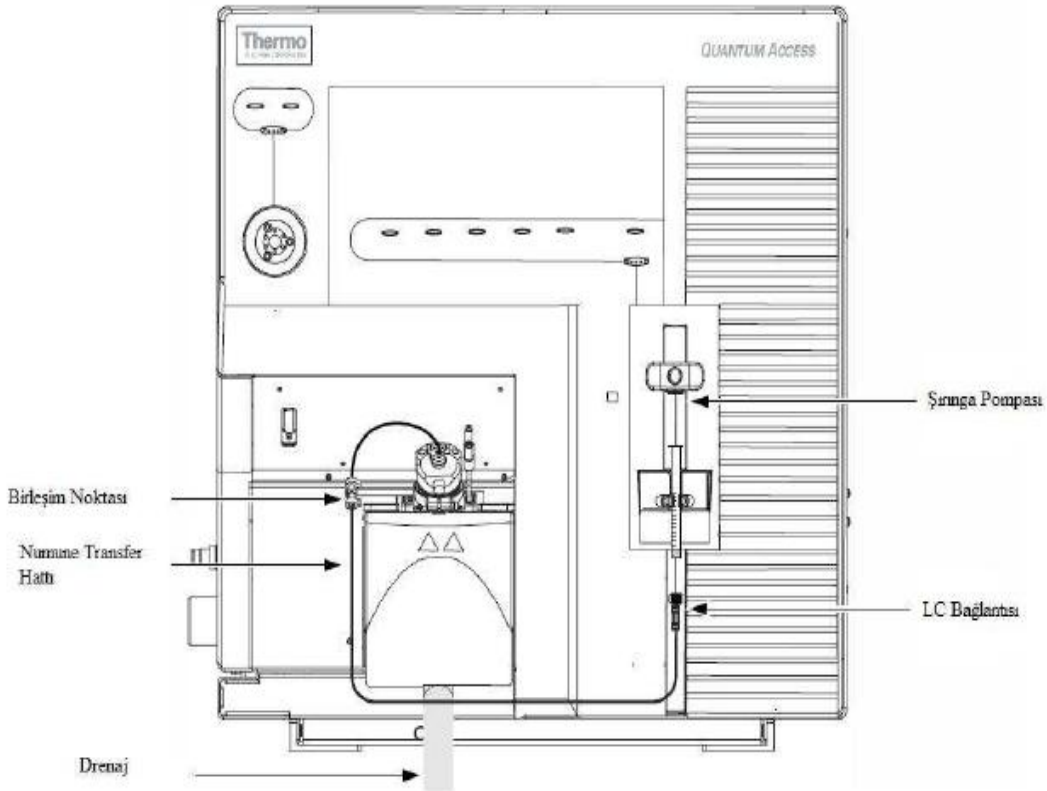
3.6 BPA ve NP için LC-MS/MS Ölçüm Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.6.1 BPA ve NP için uygun çözücünün seçilmesi

BPA ve NP maddelerinin iyonlaşma koşullarının ve parçalanma ürünlerinin belirlenmesi için 1 mL'lik, sırasıyla; 2000 mg/L ve 1000 mg/L konsantrasyonunda metanolde çözülmüş BPA ve NP çözeltisinden yaklaşık 100 µg/L konsantrasyonunda çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla ana stoktan 10 µL alınıp 5 mL'ye seyreltilerek 10 mg/L konsantrasyonunda ara stok çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiden 50 µL alınarak 5 mL'ye seyreltilmek suretiyle 100 µg/L konsantrasyonunda çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin tümünde çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Bununla birlikte bu maddelerin negatif iyonlaşmasını kolaylaştırmak için çalışma çözeltisine son hacim verilmeden önce, 10 mM olacak şekilde amonyum hidroksit eklenmiştir.

3.6.2 BPA, NP ve izotop işaretli iç standartlar için MS/MS şartlarının belirlenmesi

Tüm standart maddeler, iyonlaşma ürünlerini tespit etmek üzere tek tek LC-MS/MS'in MS/MS kısmına enjekte edilmiştir. Herbir maddenin çalışma çözeltisi MS/MS'in üzerinde bulunan şırınga pompası ve 500 µL'lik Hamilton marka şırınga kullanılarak 20 µL/dakika akış hızında doğrudan cihaza enjekte edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 : MS/MS şırınga pompası bağlantısı.

Bu aşamada BPA, NP, BPA-d16, ve NP-d4 standartlarının oluşturduğu iyonların sırasıyla 227 m/z, 241 m/z, 219 m/z ve 223 m/z civarında olması beklenmektedir. Ancak parçalanma ürününün belirlenmesi için bu iyonların daha hassas analiz edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda çalışma standartları ve saf etanolün oluşturduğu spektrumlar karşılaştırılarak BPA, NP, BPA-d16, ve NP-d4 maddelerinin iyonlarının sırasıyla, 227 m/z, 241 m/z, 219 m/z ve 223,1 m/z olduğu tespit edilmiştir.

3.6.3 UPLC’de kromatografi şartlarının belirlenmesi

Herhangi bir maddenin ölçümünde, UPLC için gradyan akış şemasının oluşturulması en önemli aşamadır. Bu aşamada, başlangıç organik çözücü kuvvetinin ve çözücü yüzdelerinin değişim hızının optimize edilerek düzgün ve yüksek sinyal/gürültü oranlı pik şekillerinin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Enjeksiyonu yapılan numunedeki organik çözücü kuvveti, gradyan akışın başlangıcında organik çözücü kuvvetine eşit ya da ondan yüksek olacak şekilde yüksek olacak şekilde gradyanın başlangıç koşulları belirlenmelidir. Çözücü oranlarındaki değişim, ölçülen

maddelerin bir süre kolonda tutulmasını ve normal dağılıma sahip bir pik şeklinde sinyal elde edilebilecek hızda bırakılmasını sağlamalıdır.

Tampon çözelti kuvveti ve tampon kapasitesi ise pik şekillerini ve büyüklüklerini etkileyen bir diğer önemli faktördür. Tampon çözelti (NH₄OH) konsantrasyonu önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak 10 mM olarak belirlenmiştir. Tampon çözelti, suyun içine ilave edilmiş ve ölçülecek maddenin iyonlaşma derecesine göre gradyan belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Organik çözücünün başlangıç yüzdesi ve gradyan hızı da maddelerin polarlık derecelerine göre değişmektedir.

Çizelge 3.4 : UPLC için hareketli faz gradyan programı.

Zaman (dakika)	10 nM NH₄OH (suda, %)	Asetonitril (%)
0	50	50
0,1	50	50
4	10	90
5	10	90
6	50	50
9	50	50

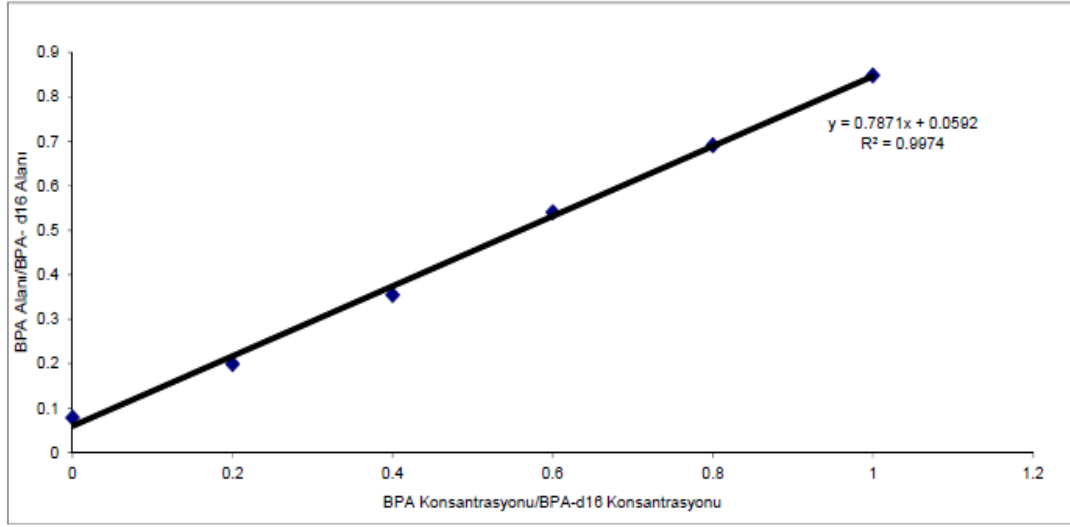
Enjeksiyon hacmi, akış hızı ve kolon sıcaklığı ise UPLC optimizasyonunda göz önünde bulundurulması gereken diğer parametrelerdir. Normal dağılıma uyan, düzgün şekilli pikler için 50 ile 400 µL/dakika arasındaki akış hızları denenmiş olup 300 µL/dakika ile en uygun pikler elde edilmiştir. Dolayısıyla akış hızı 300 µL/dakika olarak belirlenmiştir. Kolon 25-60°C arasında farklı sıcaklıklarda ısıtılarak denenmiş olup optimum sinyal/gürültü oranı 40°C kolon sıcaklığında elde edilmiştir.

3.6.4 LC-MS/MS ölçüm yöntemi

LC-MS/MS’ de numune ölçümlerinin yapılabilmesi için işletim koşullarının belirlenmesinin ardından lineer bir kalibrasyon eğrisi elde etmek amacı ile numunelerde beklenen konsantrasyonları kapsayacak şekilde belirlenmiş birbirinden farklı BPA ve NP konsantrasyonları ve sabit bir BPA-d16 ve NP-d4 konsantrasyonları içeren standartlar hazırlanmıştır.

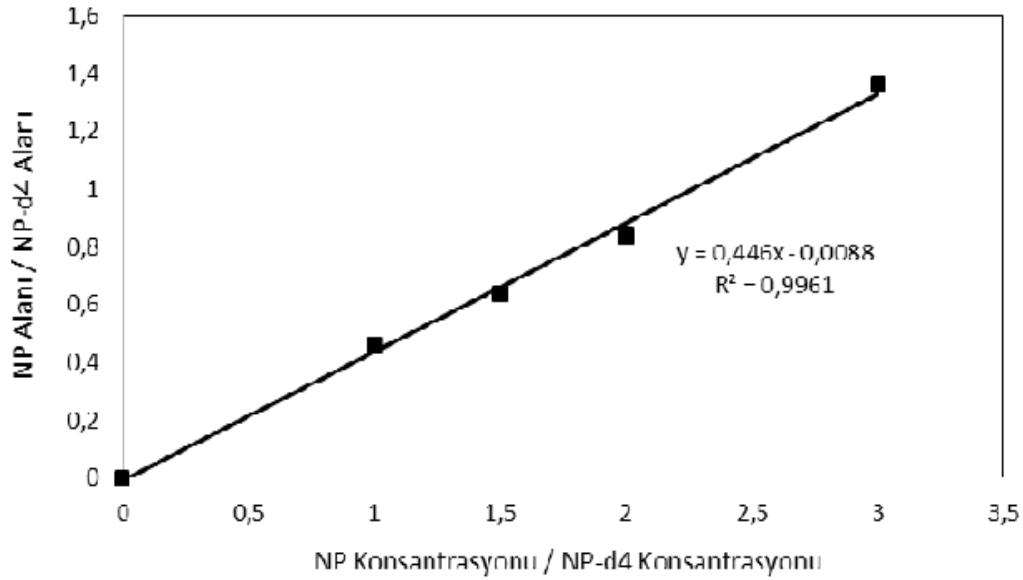
Hazırlanan standartların ölçümünün ardından “x” eksenine standartın BPA konsantrasyonunun BPA-d16’ ya oranı, “y” eksenine de kromotagramda elde edilen

iyonlaşma iyonlarının (BPA ve BPA-d16 için) pik alanlarının oranlarının yerleştirilmesi ile Şekil 3.7’ de örneği verilen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 3.7 : Standart çözeltilerle hazırlanan BPA kalibrasyon eğrisi.

Aynı prosedür NP konsantrasyonunu belirlemek için kullanılmış, elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8 : Standart çözeltilerle hazırlanan NP kalibrasyon eğrisi.

Numunelerin LC-MS/MS’ te ölçülmesinin ardından kromatogramda elde edilen alan oranları denklemde y teriminin yerine koyularak x değeri hesaplanmış ve bu şekilde numunelerdeki NP konsantrasyonuna geçiş yapılmıştır.

Numunelerde izotop işaretililerin iç standart olarak kullanılmasınn nedeni KFE prosedüründe oluşabilecek konsantrasyon kaybının en doğru şekilde sonuçlara yansıtılabilmesidir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Ön Denemeler

Her ne kadar yapılan tüm deneylerde kullanılan tüm malzemelerin cam ya da teflon olmasına özen gösterilse de bazı materyallerin cam/teflon olması mümkün olmamaktadır ya da ekonomik olarak yüksek maliyetlidir. Östrojenik aktiviteye neden olabilecek kirleticilerin plastik malzeme kullanımı durumunda elde edilen sonuçları etkileme ihtimali nedeni ile yapılan çalışmanın bazı adımlarında kullanılan santrifüj tüpü ve farklı kartuş çeşitleri ile denemeler yapılmıştır. Denenen 3 farklı santrifüj tüpü deney sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Farklı santrifüj tüpleri ile yapılan deneme sonuçları.

Santrifüj Tüpü	E2 eşdeğeri olarak östrojenite (ng/L)
Tüp 1	<2.7 ng/L
Tüp 2	<2.7 ng/L
Tüp 3	<2.7 ng/L

Ayrıca, hedef mikrokirleticiler için uygun olduğu bilinen asidik/bazik/nötr özelliğinde 3 farklı marka kartuş denenmiş, elde edilen sonuçlar kartuş tipinin geri kazanım oranını dikkat çekecek şekilde etkilediğini göstermiştir. Deneme sonuçları Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Farklı kartuş çeşitleri ile elde edilen E2 geri kazanım oranları.

Kartuş Adı	Ortalama E2 Geri Kazanım Oranı
Biotage ABN	%40
Waters C18	%36
Oasis HLB	%85

Bunun yanı sıra, kullanılmasına karar verilen Oasis HLB kartuşun cam ve plastik çeşitlerinin bulunması ve cam kartuş fiyatının yüksek olması nedeni ile plastik kartuşların LC-MS/MS ölçümleri için kullanılıp kullanılamayacağı denenmek istenmiştir. Deneylerde uygulanan KFE3 prosedürü kullanılarak E2 enjekte edilmiş

özel gradient-grade Merck su ve çift distile su ile şahit deneyler yapılarak plastik kartuştan BPA sızıp sızmadığı LC-MS/MS’de ölçüm yapılarak belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.3’ te verilmiştir. Şahit olarak kullanılan numunelerde çok yüksek olmasa da bir miktar BPA’ ya rastlanmıştır. BPA için her deneyde şahit koyularak, gerekirse elde edilen sonuçtan çıkartılacak şekilde çalışılmıştır. Nitekim, elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde BPA konsantrasyonlarının plastik kartuştan etkilenmediği görülmektedir.

Çizelge 4.3 : Plastik HLB kartuş ile şahit (BPA içermeyen) numuneler ile yapılan denemelerde KFE 3 uygulamasını takiben ölçülen BPA konsantrasyonları.

Numune	BPA konsantrasyonu (ng/L)
Çift distile su	1,9 ± 0,14
Gradient grande su	9,5 ± 2,77

4.1.1 Katı faz ekstraksiyonu (KFE) ile hazırlanan numune sonuçları

Yapılan çalışmada öncelikle numuneler hiçbir ön işleme tabii tutulmadan YES biyodeneyi yapılmıştır. Ancak, elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, numunelerdeki östrojenik aktivite oluşturabilecek kirletici/kirleticilerin konsantrasyonunun YES biyodeneyindeki ölçüm sınırının altında olduğu gözlemlenmiştir. Şişelenmiş içme suyunun konsantre hale edilmeden numune olarak kullanıldığı deney sonuçları Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Numunelere ön işlem yapılmadan elde edilen östrojenite ölçümü sonuçları.

Numune Kodu	E2 eşdeğeri olarak östrojenite (ng/L)
II. A2-1	<2,7
IV. A2-1	<2,7
X. B5-1	<2,7

Elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak, hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS ölçümleri yapılmadan önce numunelerin katı faz ekstraksiyonunun (KFE) yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Farklı KFE prosedürleri ile YES biyodeneyi sonucu elde edilen geri kazanım oranları Çizelge 4.5’ te verilmiştir.

YES biyodeneyi ile LC-MS/MS ölçüm sonuçlarının en doğru şekilde birbirleri ile ilişkilendirilebilmeleri için bu ölçümlerden önce gerçekleştirilecek olan KFE prosedürünün de mümkün olduğunca benzer olması gerekmektedir. Bu nedenle, öncelikle farklı KFE prosedürleri belirlenmiştir. Sonrasında belirlenen KFE prosedürleri, ekstraksiyon sonrasında 100 ng/L konsantrasyonda E2 olacak şekilde enjeksiyon yapılmış numunelere uygulanmış, ardından da bu prosedürlerin hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS ölçümleri için uygun olup olmadığı değerlendirilmiştir.

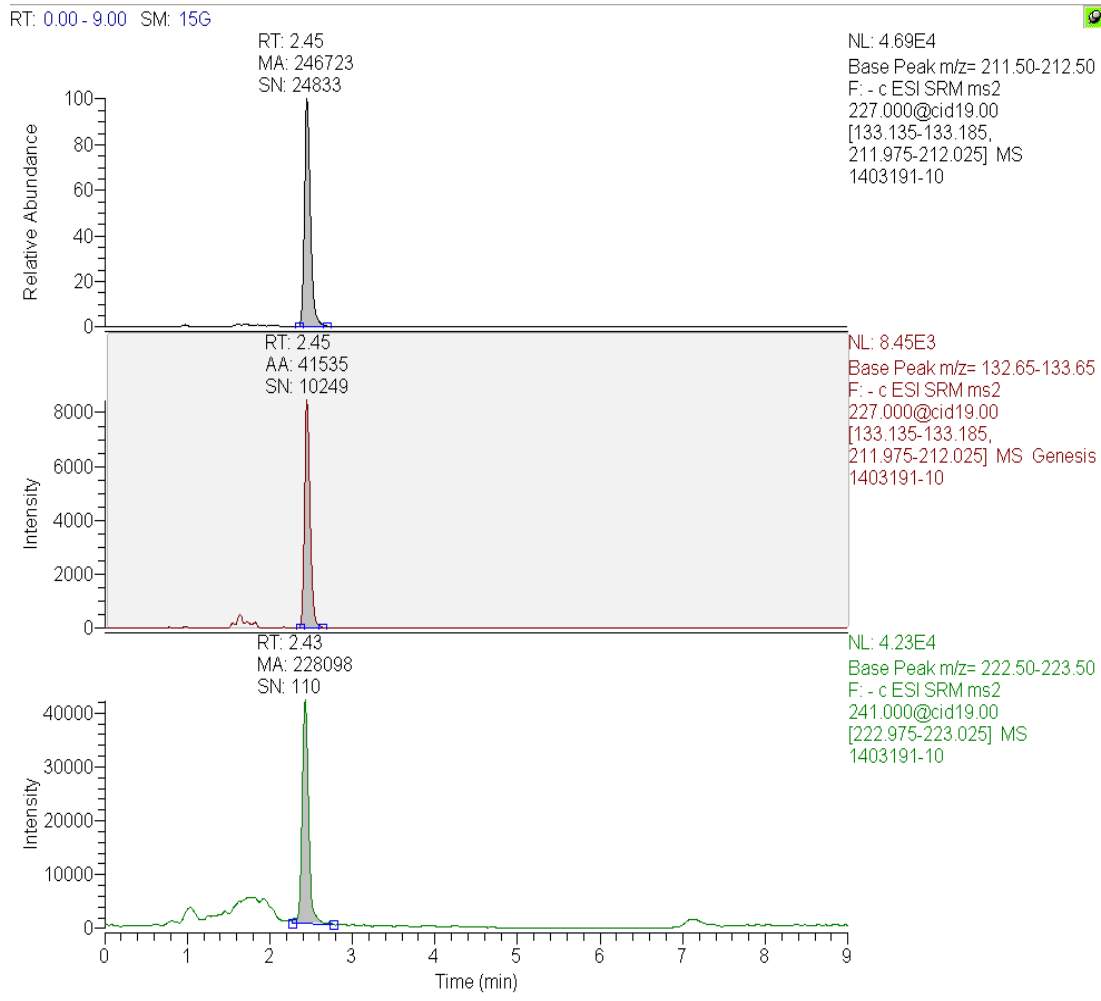
Çizelge 4.5 : Farklı KFE prosedürleri ile YES biyodeneyi sonucu elde edilen geri kazanım oranları.

KFE Numarası	Ortalama Geri Kazanım Oranı
KFE 1	%70
KFE 2	%65
KFE 3	%92
KFE 4	%80
KFE 5	%45
KFE 6	%75
KFE 7	%40

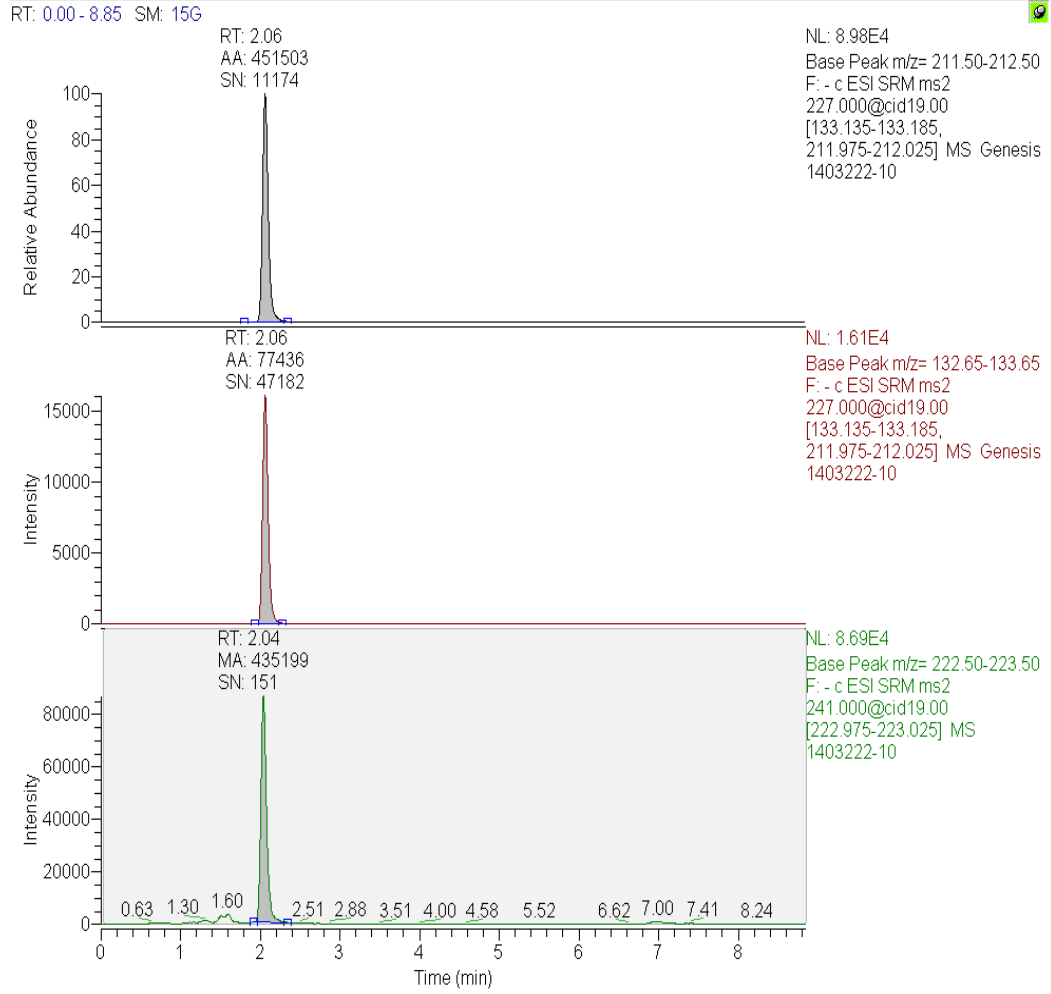
Elde edilen sonuçlar: KFE1, KFE 2, KFE 3, KFE 4 ve KFE 6 prosedürlerinin YES biyodeneyi için kullanılabileceğini göstermiş olsa da, LC-MS/MS ölçümlerinde diklorometan ve aseton kullanılan KFE1 ve diklorometan ve etanol kullanılan KFE2 yöntemleri piklerin dağılmasına neden olurken sadece aseton kullanılan KFE4 yöntemi ile etil asetat ve etanol kullanılan KFE3 yöntemi en yüksek geri kazanım oranlarını vermiştir. Bu durumda, diklorometan ve metanolün BPA ve NP piklerinin dağılmasına neden olduğu söylenebilir. Buna karşılık; aseton, etil asetat ve etanol kombinasyonun BPA ve NP geri kazanımı için uygun olduğu açıktır.

Birçok referansta şartlandırma ve toplama adımlarında metanol kullanıldığı bilinmektedir (Krein, 2012; Liao, 2012; Plotan, 2013; Vega-Morales, 2010; Wagner, 2013; Wang, 2012; Zhang, 2013a) Ancak, KFE5 ve KFE7 prosedürleri ile hazırlanan numunelerin LC-MS/MS ile yapılan ölçümlerde pik dağılımına neden olduğu hem de YES biyodeneyinde yeterli geri kazanım oranı elde edilemediği için metanol solventini içeren KFE prosedürleri ile çalışılmamaya karar verilmiştir.

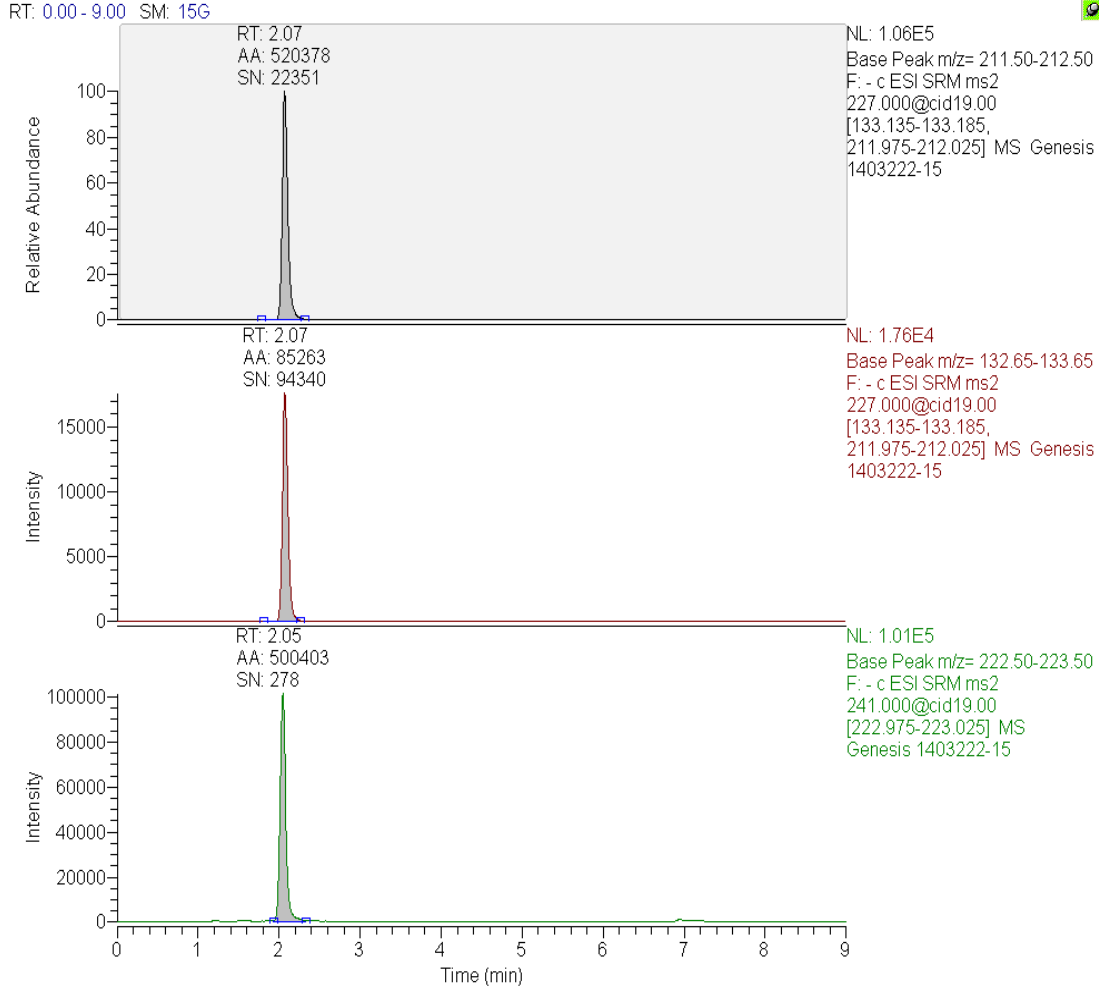
Toplama çözücüsünün uçurulduktan sonra kalan analitin çözünmesi için kullanılan çözücü için de çift distile suyun yeterli olduğu görülmektedir. Toplama çözeltilerinin ise toplamda 10 mL olarak kullanılmasının uygun olduğu görülmektedir. Daha yüksek hacimler çözücü sarfıyatını arttıracak gibi toplama adımını takip eden çözücü uçurma adımının da süresini uzatacaktır. Ayrıca, uzun süreli çözücü uçurma işlemi, analitin nispeten uçucu olması durumunda da problem yaratacaktır. KFE3, KFE4 ve KFE6 kullanımı sonrasında ölçülmüş standart çözelti kromatogramları, sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.1 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE3 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları.



Şekil 4.2 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE4 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları.



Şekil 4.3 : 100 µg/L BPA ve 100 µg/L BPA-d16 içeren standart çözelti için KFE6 yönteminden sonra LC-MS/MS ölçümünde elde edilen kromatogramları.

Sonuç olarak, hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS ölçümlerinde uygun geri kazanım oranı ve birbirleri ile tutarlı sonuçlar veren KFE 3 prosedürü ile çalışılmış, KFE 3 prosedürü Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 : KFE 3 prosedürü.

Şartlandırma	Yıkama	Kurutma	Toplama	Uçurma	Seyreltme
etil asetat 2*2 mL	etanol:çift distile su (1:9) 5 mL	30 dakika	etanol 2*2 mL	Toplanan ekstraktın içine 50 µL	10 mL’ye çift distile su ile
etanol 2*2 mL			etil asetat 2*2 mL	DMSO	
çift distile su 2*2 mL				eklenir, 50 µL kalır	

4.1.2 YES biyodeneyinde toksisite kontrolü

BPA ve NP'nin ana stokları (1000mg/L) metanol içerisinde bulunmaktadır. Metanolün birçok bileşik için toksik etki yaratabilecek bir madde olması sebebi ile YES biyodeneyi ile BPA ve NP için toksisite kontrolü yapılması gerektiği düşünülmüştür. Bu amaçla, BPA ve NP'nin ara stokları hazırlanırken yapılan farklı hacimlerde enjeksiyon içeren 2 mg/L konsantrasyonlu BPA ve NP (400 µL enjeksiyonlu) ~ 200 ng/L E2 eşdeğeri olduğu için E2 serisi 3a standardı (271 ng/L) eşdeğer miktarda metanol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol amaçlı 3a; 0,5 mL 2a (2710 ng/L) + 0,5 mL aseton/metanol (500 kat seyreltilmiş) + 4 mL steril su eklenerek hazırlanmıştır. Burada metanolün 500 kat seyreltilme sebebi: 2 mg/L konsantrasyonlu stok hazırlanırken; 1000 mg/L (aseton/metanol içerisinde) stoğun 50 kez seyreltilerek (5 mL'ye 100 µL) 20 mg/L konsantrasyonlu stok hazırlanması + 2 mg/L konsantrasyonlu stoğun hazırlanırken 10 kez (4 mL'ye 400 µL) seyreltilmesidir.

Bu konsantrasyon aralığında yapılan toksisite deneyi sonucunda, metanol içeren 3a numunesindeki mayaların büyümesinde herhangi bir sorun olmadığı gözlemlenmiş ancak metanolün daha yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yaratmaya başlayabileceği düşünülerek daha yüksek hacimli metanol enjeksiyonlu numuneler YES biyodeneyine tabii tutulmuştur. Bu deneyde, YES biyodeneyinde yapılan en yüksek hacimde enjeksiyonu içeren 100 mg/L konsantrasyonlu BPA (200 µL enjeksiyonlu) ~ 10.000 ng/L E2 olduğu için E2 serisi 1a standardı (27100 ng/L) ve 2a (2710 ng/L) eşdeğer miktarda metanol içerecek şekilde hazırlanarak kontrol numunesi hazırlanmıştır. Kontrol amaçlı hazırlanan 1a ve 2a'nın hazırlanışı; 1 mL metanol ile 9 mL steril sudan oluşan 10 mL'lik çözeltiye 11 µL E2 ara stoğundan (50 mg/L) enjekte edilerek 1a, 9 mL steril su ile 1 mL 1a çözeltisi karıştırılarak 2a kontrol stoğu hazırlanmıştır. Bu deneyde, YES biyodeneyi 2.günü sonunda kontrol amaçlı hazırlanan 1a ve 2a numunelerindeki mayaların büyümediği, hatta 2.gün sonundaki maya miktarının, ilk gün aşılana maya miktarından daha az olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; ana stok nedeniyle YES biyodeneyindeki numunelere karışan metanolün miktara bağlı olarak YES biyodeneyinde kullanılan rekombinan *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri üzerindeki toksik etki yaratabileceği kanıtlanmıştır. Ancak, şişelenmiş su numunelerinde beklenen BPA ve NP

konsantrasyonları BPA ve NP standartları için yüksek miktarda metanol gerektirmeyecek kadar düşük olduğu için sonuçların değ erlendirilmesinde kullanılan YES biyodeneyi S shape in oluşturulmasında herhangi bir probleme sebep olmamaktadır.

4.2 Sonuçlar

4.2.1 YES biyodeneyi sonuçları

Numunelerde östrojenik aktiviteye neden olabilecek kirleticilerin varlığ ının araştırılması amacı ile yapılan YES biyodeneyi Türkiye’de ilk defa bu tez kapsamında İTÜ Çevre Mühendisliği Laboratuvarları’nda denenmiştir. YES biyodeneyinin uygun olarak uygulandığ ının kontrol edilmesi amacıyla, farklı konsantrasyonlarda 17 β -estradiol (E2) ile çözeltiler hazırlanmıştır. Östrojenik aktivitenin konsantrasyona bağı lı olarak değ işimini gösteren grafikler hazırlanmış, elde edilen eğrilerin beklediğı şekilde, literatürde verilen sonuçlara benzer çıkması ile YES biyodeneyinin kullanılır hale getirildiğı ortaya konmuştur.

Rastgele seçilmiş olan 17 farklı marka şişelenmiş iç me suyu numune olarak kullanılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarında; polikarbonat şişelerin BPA iç erdiği belirlenmiş (Fiege, 2000), bu nedenle numune sayısı olarak polikarbonat şişelere ağırlık verilmiştir. Bunun dışında belirlenen bazı firma numunelerinin farklı hacimlerdeki polietilen tereftalat (PET) şişe numunelerinde de östrojenik aktivite deneyleri yapılmıştır. Ayrıca, östrojenik aktiviteye neden olduğı bilinen bileşikleri içeren şişeler dışında 2 farklı firmanın cam damacana numuneleri de bu kirleticilerin su kaynağından gelme ihtimalini belirlemek amacı ile numune olarak kullanılmıştır.

6 farklı markadan 11 kez PET şişe numunesi, 11 farklı markadan 17 kez polikarbonat şişe numunesi ve 2 farklı markadan birer kez cam damacana numunesi alınmıştır. Bu seçim, ilk deney sonucunda östrojenik aktivite gösterdiği belirlenen numunelerin tekrar deneylere tabii tutularak elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacı ile yapılmıştır.

Deney sonuçları: bu kirleticilerin su kaynağından ya da şişe çeşidine, şişenin üretim ve dolum tarihine bağı lı olarak şişe iç erisindeki suya karışmaları değ işebildiğini göstermiştir.

Firma isimleri; gizlilik açısından verilmemiş, notasyon ile her bir numune kodlanmıştır. Notasyon açıklaması Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Numuneler için kullanılan notasyon açıklaması.

Numune Firması	I, II, III, IV...
Şişe Yapısı	A.PET
	B.Polikarbonat
	C.Cam
Şişe Hacmi	0,33L: 1
	0,5L: 2
	1,5L: 3
	5L: 4
	10L: 5
Numune No	-1, 2...

Katı faz ekstraksiyonu ile 50 kat konsantre hale getirilmiş numunelerin bazılarında ölçülebilir miktarda (>2.7 ng/L-ölçüm limitinin üzerinde) östrojenite görülmüştür. Ekstraksiyon uygulanmış olan numunelerin östrojenite değerleri Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’ da verilmiştir.

Çizelge 4.8 : Çeşitli marka PET şişeler ve cam damacaneler için 50 kat konsantre edilmiş numunedeki YES biyodeneyi sonucu elde edilen östrojenite değerleri.

Numune Kodu	E2 eşdeğeri olarak östrojenite (ng/L)
V. A3-1	<2.7
VIII. A3-1	<2.7 ng/L
VIII. A4-1	3.5 ± 0.5
VIII. A4-2	32 ± 4
VIII. A4-3	<2.7
VI. A3-1	<2.7
XII. A1-1	16.5 ± 4
XII. A1-2	<2.7
XII. A1-3	<2.7

Çizelge 4.8 (devam) : Çeşitli marka PET şişeler ve cam damacaneler için 50 kat konsantre edilmiş numunedeki YES biyodeneyi sonucu elde edilen östrojenite değerleri.

XIII. A2-1	$5 \pm 0,5$
XIII. A2-2	<2.7
XV. C5-1-1	28 ± 9
XVI. C5-1-1	<2.7

Çizelge 4.9 : Çeşitli marka polikarbonat şişeler için 50 kat konsantre edilmiş numunedeki YES biyodeneyi sonucu elde edilen östrojenite değerleri.

Numune Kodu	E2 eşdeğeri olarak östrojenite (ng/L)
VIII. B5-1	4 ± 1
VIII. B5-1	<2.7
VI. B5-1	<2.7
I.B5-1	<2.7
I.B5-2	<2.7
IX. B5-1	<2.7
IX. B5-2	<2.7
IX. B5-3	<2.7
III. B5-1	<2.7
III. B5-2	<2.7
II. B5-1	<2.7
II. B5-2	8 ± 5
XI. B5-1	<2.7
XI. B5-3	5 ± 4
XI. B5-2	<2.7
X. B5-1	3 ± 1
VII. B5-1	<2.7
XIV. B5-1	<2.7
XIV. B5-1	<2.7
XVII. B5-1	<2.7
XVII. B5-2	<2.7

YES biyodeneyi sonucunda hem PET, hem polikarbonat hem de cam şişe numunelerinin bazılarında toplam östrojenik aktivitenin 2,71 ng/L'den yüksek ölçülmüştür. Bu aktivitenin nedeni BPA ve/ya da BPA gibi östrojen mimikleyen maddeler/maddelerin kombinasyonun etkisi olduğu düşünülmüş, belirlenen östrojenik aktivite ile bu maddelerin varlığı arasında korelasyon olup olmadığını belirlemek amacı ile LC-MS/MS analitik ölçümlerinin yapılmasına karar verilmiştir. Ancak, literatürde östrojenik aktiviteye neden olabilecek birçok EBM çeşidi bulunup, hepsinin tek tek belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, bu etkiye neden olduğu en yaygın şekilde bilinen BPA hedef EBM olarak seçilmiş ve LC-MS/MS ölçümleri ile YES biyodeneyi sonuçları korele edilmiştir. Ayrıca, şişe yapısında östrojenik aktiviteye neden olduğu bilinen bileşikleri içermeyen PET ve cam şişe numunelerinin bazılarında ölçüm limitinin üzerinde östrojenik aktivite belirlenmiştir. Bu da numune için ölçülen östrojenitenin PET ya da camdan kaynaklanmadığı bilinen BPA'dan değil de su içinde olabilecek başka maddelerden geleceği düşünülmektedir. Ancak LC-MS/MS ölçümü sadece hedef maddeyi incelemek için gerçekleştirilebilir. Bu nedenle sadece LC-MS/MS ile spesifik EBM'nin değil YES biyodeneyi ile toplam östrojenitenin ölçümü de önemlidir.

4.2.2 LC-MS/MS ölçüm sonuçları

YES biyodeneyi ile numunelerdeki toplam östrojenik aktivite ölçülmektedir. Ancak, bu aktiviteye neden olan mikrokirleticilerin tayin edilebilmesi için LC-MS/MS ölçümlerinin yapılması gerekmektedir. Böylece elde edilen sonuçlar değerlendirilirken numunedeki toplam östrojenik aktivite ve bu aktiviteye neden olan mikrokirletici/mikrokirleticileri ve konsantrasyonunu belirlemek mümkün olacaktır.

LC-MS/MS ile yapılan ölçümlerin doğruluğu ve hassasiyetini sağlamak üzere gerekli kalite kontrol parametreleri belirlenmiştir. Sayısallaştırmada kalibrasyon eğrisi kullanıldığı için kalibrasyonun lineer olduğu bölge önem taşımaktadır. BPA ve NP için lineer aralık 0-500 µg/L arasında tespit edilmiştir. Hesaplamalarda R^2 değeri >0,99 olan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır. Tüm ölçümlerde aynı numune üç kez enjekte edilmiş ve her numuneden çift hazırlanmıştır. Elde edilen konsantrasyonlar standart sapmalarıyla rapor edilmiştir. Rapor edilen tüm sonuçların göreceli standart sapmaları (standart sapma/ortalama değer) %20'nin altında kalmıştır ve tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Ölçümlerin doğruluğunu göstermek üzere yapılan

çalışmalarda, bilinen miktarlarda BPA ve NP distile suya enjekte edilmiş ve ölçülen konsantrasyonlarla oranlanarak geri kazanım hesaplanmıştır.

4.2.2.1 LC-MS/MS ile NP ölçümleri

NP ölçümü için yapılan denemelerde, numunelerin ölçümü sırasında LC-MS/MS'te bir pike rastlanmamıştır. Bunun iki sebebi olabileceği için öncelikle LC-MS/MS ile NP'nin yeterince hassas ölçülüp ölçülmediği ile ilgili çalışmalar yapılmış, sonrasında da kullanılan KFE prosedürü ile NP'nin numuneden geri kazanılıp kazanılmadığına bakılmıştır. İlk adımı, NP'in daha iyi bir şekilde pik vermesini sağlamak üzere, LC-MS/MS'in kütle spektrometresi kısmında değişik şartlar denenmiştir. Bunlar:

- Literatürde bulunan ve Çizelge 4.10'da ayrıntılı bir şekilde verilen farklı m/z'ye sahip iyonlar ve kolisyon enerjileri

Çizelge 4.10 : NP ve işaretli NP için denenen iyonlar.

NP			İşaretli NP		
Kütle (m/z)	Kolisyon Enerjisi (mv)	Pik Durumu	Kütle (m/z)	Kolisyon Enerjisi (mv)	Pik Durumu
106,1	22 ve 24	✓	100,11	19 ve 24	✓
119,0	22 ve 14	X			
133,0 ve 147,0	24 ve 30	X	123,3	19 ve 24	X
161,0	36 ve 24	x			

✓ :pik elde edildiğini, x: pik elde edilemediğini göstermektedir.

- Kullanılan ana madde kütlesi için full scan modunda tarama yapılarak, ana madde için 219.0 elde edilmiştir. Ana kütle maddesi SRM ve SIM modlarında 219 olarak yazılarak, tarama yapılmış, kullanılan farklı kolisyon enerjileri ile elde edilen sinyal şiddetleri Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11: Farklı kolisyon enerjileri için elde edilen sinyal şiddetleri.

Kütle (m/z)	Kolisyon Enerjisi	Sinyal Şiddeti
106,1	25 – 30	1000
119	25 – 30	2000
133,14	25	10000

Çizelge 4.11 (devam) : Farklı kolisyon enerjileri için elde edilen sinyal şiddetleri.

147,14	25	10000
147,21	30	1000
147,21	30	1000

- Bir önceki adımı takiben bileşik optimizasyonu (compound optimization) yapılarak, farklı m/z'ler için elde edilen kolisyon enerjileri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 : Farklı m/z'ler için elde edilen kolisyon enerjileri.

Kütle (m/z)	Kolisyon enerjisi (mv)
133,140	25 – 30
133,21	25 – 30
161,0	25 – 30
119,0	25 – 30
147,14	25 – 30
147,21	25 – 30
106,1	25 – 30

Problem giderilemediği için, tube lens offset değeri tekrar optimize edilmiş ve NP için kolisyon enerjisi değerleri bu sefer daha geniş bir aralık (19-35 mv) için tekrar taranmıştır.

Sonuç olarak, Çizelge 4.13'te verilen şartlarda, şırınga ile başlanan denemeler, standartların viallere konularak okunması şeklinde tamamlanarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Böylece, LC-MS/MS'in hem NP hem de işaretli NP maddelerini okumak üzere ayarlanabildiği ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.13 : NP ölçümü için kullanılan MS/MS parametreleri.

NP için m/z oranları	219 m/z
NP parçalanma ürünleri	106,1 ve 172,8 m/z
İşaretli NP için m/z oranları	223,1
İşaretli NP parçalanma ürünleri	110, 110 ve 123,30 m/z

Çizelge 4.13 (devam) : NP ölçümü için kullanılan MS/MS parametreleri.

Sprey voltajı	4000
Sheath gaz basıncı	20
İyon alma (sürtünme) gaz basıncı	2
Aux Gas Pressure	15
Boru sıcaklığı	246
Tube Lens Ofset	-70
Kolisyon basıncı	1,5
Kolisyon enerjisi	24

Ancak, numune ölçümlerine geçildiğinde, sonrasında numuneye enjekte edilmiş olan işaretli NP piki bile görülmediği için; ikinci olasılık olan, KFE'den geri kazanım olmama ihtimalinin araştırılmasına geçilmiştir. Aslında, kullanılan prosedürü yeni kirleticiler için kullanılan çok genel bir prosedürün, YES testinde de kullanımını sağlamak adına farklı bir ek çözücü kullanan versiyonudur. Çok benzer yöntemlerin numunede NP zenginleştirmesi için kullanıldığı bilinmektedir. Dolayısıyla, kullanılan prosedürü ile düşük bile olsa bir geri kazanım beklenmektedir. YES testi ve BPA için optimize edilmiş olan prosedürü ile yüksek konsantrasyonlarda bile LC-MS/MS ile pik elde edilmemesi sonucunda, yine literatür taraması ile belirlenen ve şartları Çizelge 4.14' te belirlenen prosedürleri de denenmiştir. Literatürde bazı çalışmalarda toplama adımı metanol ve suyun (Cespedes, 2006; Jonkers, 2005; Wang, 2012) ya da metanol ve etil asetatın kullanıldığı (Loos, 2007; Maggioni, 2013) bazı çalışmalara rastlanmış olmakla birlikte, numune içinde kalan metanolün LC-MS/MS ölçümünde pik şekillerini bozduğu için bu çözücünün kullanılması denenmemiştir.

Çizelge 4.14 : NP için YES ve BPA için optimize edilmiş KFE'ye ilave olarak denen KFE prosedürleri.

	Numune pH'ı	Şartlandırma	Yıkama	Toplama	Kurutma
Yeni KFE1	x	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	50 µL DMSO

Çizelge 4.14 (devam) : NP için YES ve BPA için optimize edilmiş KFE'ye ilave olarak denenen KFE prosedürleri.

Yeni KFE 2	x	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Tamamen kurutuldu
Yeni KFE 3	x	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Yıkama adımı yok	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	50 µL DMSO
Yeni KFE 4	x	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Etanol pH:2	50 µL DMSO
Yeni KFE 5	pH=2	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	Optimize edilmiş prosedür ile aynı	50 µL DMSO

x : Numune pH'ı değiştirilmedi.

LC-MS/MS ölçümlerinde KFE ön işlemine tutulmadan kalibrasyon eğrisi için hazırlanan NP standartlarında NP'nin ölçümü yapılabilmesine karşın; NP enjeksiyonu yapıp, KFE ön işlemine tutulan numunelerde NP ölçüm limitinin altında çıkmıştır. Bu, KFE prosedürünün NP için geri kazanım veriminin düşük olduğunu göstermiştir. NP'nin ölçümleri sırasında yaşanan bu problem, çalışılan diğer mikrokirleticiler (NDMA, kafein, çeşitli farmasotikler) ile yaşanmamıştır (Taş, 2014; Topuz, 2014). Bu da, yaşanan ölçüm sorunlarının bu maddeye spesifik olduğunu göstermektedir.

4.2.2.2 LC-MS/MS ile BPA ölçümleri

BPA'nın östrojenik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle alınan numunelerdeki BPA konsantrasyonunun tayin edilmesi amacı ile numunelerde LC-MS/MS analitik yöntemi kullanılarak BPA varlığı ve varlığı durumundaki konsantrasyonunun ölçümü yapılmıştır. Belirlenen numunelerde yapılan ölçümler ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15' te verilmiştir.

Çizelge 4. 15 : LC-MS/MS ile elde edilen BPA konsantrasyonları.

Numune Kodu	BPA konsantrasyonu (ng/L)
X. B5-2	5,5 ± 0,1
VI. B5-1	37,3 ± 0,4
XIV. B5-2	117,7 ± 2,9
XV. C5-1	4,7 ± 1,3
XVI. C5-1	4,5 ± 0,1
XVII. B5-1	1,8 ± 0,1
XVII. B5-2	1,8 ± 0,5
VIII. A3-3	10,8 ± 0,1
VIII. A3-3	17,0 ± 0,1
V. A3-3	4,5 ± 0,9
V. A3-3	17,0 ± 4,6

LC-MS/MS sonuçları değerlendirildiğinde, bir markanın iki farklı polikarbonat damacana numunesinde BPA konsantrasyonu yaklaşık olarak 40 ve 120 ng/L bulunmuştur. BPA'nın östrojenik etkisinin doğal östrojen hormonu E2'ye kıyasla ortalama olarak %0,1 olduğu bilinmektedir (Balaguer, 1999; Riu, 2011). Bu kabul ile konsantrasyonu ortalama olarak 0,004 ng/L ve 0,012 ng/L eşdeğer östrojeniteye denk gelmektedir. Ayrıca, farklı markaların bazı PET ve cam damacana şişelerindeki numunelerde 1ng/L olan ölçüm limitinin üzerinde BPA konsantrasyonu bulunmuştur. Cam damacana içerisinde ölçülen BPA konsantrasyonu, numunede ölçülen östrojeniteyi oluşturmaya yetecek kadar yüksek değildir. Dolayısıyla, numune içerisinde ölçülen östrojenik aktiviteyi yaratacak başka kirletici/kirleticilerin bulunması muhtemeldir. Cam damacana içerisindeki numunenin, ozonlanmayıp klorlandığı göz önüne alındığında, östrojeniteye sebep olan kimyasal/kimyasalların, suyun klorlanması aşamasında oluşan klorlu yan bileşikler olma ihtimalinin de bulunduğu düşünülmektedir (Dorival-Garcia N., 2012).

BPA'nın insan sağlığı üzerindeki etkilerinin tahmin edilmesi açısından etkinin memelileri aynı doğrultuda etkileyeceği varsayımı ile fareler üzerinde deneyler yapılmıştır. Günlük 2,42 µg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonun üreme ve gelişim bozuklarına (USFDA, 2008), 0,2 µg/kg vücut ağırlığı seviyesinde alımın obeziteye (EFSA, 2006) ve 2,3 µg/kg vücut ağırlığı alımın ise uterus, serviks (rahim boynu) ve vajinada büyümeye (SCF, 2002) neden olduğu tespit edilmiştir.

YES biyodeneyi ve LC-MS/MS ölçümleri sonucunda her numune için elde edilen ölçüm sonuçları Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16 : Şişelenmiş içme suyu numunelerinde ölçülen östrojenite ve BPA konsantrasyonu sonuçları.

Numune Kodu	E2 eşdeğer konsantrasyonu (ng/L)	BPA konsantrasyonu (ng/L)
I.B5-1	< 2,7	7 ± 2
I.B5-2	< 2,7	< 1
II.B5-1	< 2,7	228 ± 83
II.B5-2	8 ± 5	222 ± 40
III.B5-1	< 2,7	24 ± 2
III.B5-2	< 2,7	< 1
V.A3-1	< 2,7	< 1
V.A3-2	< 2,7	10,7 ± 5
V.A3-3	< 2,7	4,5 ± 0,9
V.A3-3	< 2,7	17 ± 4,6
VI.A3-1	< 2,7	< 1
VI.B5-1	< 2,7	37,3 ± 0,4
VII.B5-1	< 2,7	86 ± 0,2
VIII.A3-1	< 2,7	< 1
VIII.A3-2	< 2,7	4,78 ± 0,1
VIII.A4-1	< 2,7	< 1
VIII.A4-2	32 ± 4	< 1
VIII.A4-3	< 2,7	< 1
VIII.B5-1	4 ± 1	12 ± 5
IX.B5-1	< 2,7	196 ± 1
IX.B5-2	< 2,7	< 1
IX.B5-3	< 2,7	< 1
X.B5-1	3 ± 1	83 ± 27
X.B5-2	< 2,7	5,5 ± 0,1
XI.B5-1	< 2,7	87 ± 3
XI.B5-2	< 2,7	79 ± 1
XI.B5-3	5 ± 4	< 1
XII.A1-1	< 2,7	< 1
XII.A1-2	< 2,7	< 1

Çizelge 4.16 (devam) : Şişelenmiş içme suyu numunelerinde ölçülen östrojenite ve BPA konsantrasyonu sonuçları.

XII.A1-3	< 2,7	< 1
XIII.A2-1	5 ± 0,5	< 1
XIII.A2-2	< 2,7	< 1
XIV.B5-1	< 2,7	< 1
XIV.B5-2	< 2,7	117,7 ± 2,9
XV.C5-1	28 ± 9	4,7 ± 1,3
XVI.C5-1	< 2,7	4,5 ± 0,1
XVII.B5-1	< 2,7	1,8 ± 0,1
XVII.B5-2	< 2,7	1,8 ± 0,5

Yapılan araştırmalar sonucunda BPA'nın E2 eşdeğerinin ortalama 10^{-4} olduğu kabul edilmiştir (Witorsch, 2002). Bu kabüle dayanarak numunelerdeki toplam östrojeniteyi oluşturan EBM'nin BPA olup olmadığı, BPA ise bu etkiye ne kadar katkısı bulunduğu hesaplanarak Çizelge 4. 17'de verilmiştir. NP'nin ise BPA'ya göre ortalama 4-6 kat daha az östrojenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Beck, 2006).

Çizelge 4.17 : YES biyodeneyi sonucu ölçülen E2 eşdeğerini oluşturacak BPA konsantrasyonları.

Numune Kodu	Numunelerde ölçülen E2 eşdeğer konsantrasyonu (ng/L)	Numunelerdeki BPA konsantrasyonu (ng/L)	Numunelerdeki BPA konsantrasyonunun (ng/L) takabül ettiği E2 konsantrasyonu
I.B5-1	< 2,7	7	0,0007
II.B5-1	< 2,7	228	0,0228
II.B5-2	8	222	0,0222
III.B5-1	< 2,7	24	0,0024
V.A3-2	< 2,7	10,7	0,00107
V.A3-3	< 2,7	4,5	0,00045
V.A3-3	< 2,7	17	0,0017
VI.B5-1	< 2,7	37,3	0,00373
VII.B5-1	< 2,7	86	0,0086
VIII.A3-2	< 2,7	4,78	0,000478

Çizelge 4.17 (devam) : YES biyodeneyi sonucu ölçülen E2 eşdeğerini oluşturacak BPA konsantrasyonları.

VIII.A4-2	32	< 1	< 1
VIII.B5-1	4	12	0,0012
IX.B5-1	< 2,7	196	0,0196
X.B5-1	3	83	0,0083
X.B5-2	< 2,7	5,5	0,00055
XI.B5-1	< 2,7	87	0,0087
XI.B5-2	< 2,7	79	0,0079
XI.B5-3	5	< 1	< 0,0001
XIII.A2-1	5	< 1	< 0,0001
XIV.B5-2	< 2,7	117,7	0,01177
XV.C5-1	28	4,7	0,00047
XVI.C5-1	< 2,7	4,5	0,0045
XVII.B5-1	< 2,7	1,8	0,00018
XVII.B5-2	< 2,7	1,8	0,00018

*YES biyodeneyi sonucunda elde edilen toplam östrojenik aktivitenin kaynağının sadece BPA olması durumunda olması gereken BPA konsantrasyonu (seyrelme faktörü 50).

Çizelge 4. 17 değerlendirildiğinde,YES biyodeneyi sonucunda ölçüm limiti olan 2.7 ng/L E2 eşdeğerinin üzerinde toplam östrojenik aktivite gösteren numunelerde ölçülen BPA konsantrasyonları, bu toplam östrojenik aktiviteyi oluşturmaya yetecek kadar yüksek değildir. Ayrıca, bazı numune sonuçlarında yine YES biyodeneyinde ölçülen toplam östrojenik aktivite 2.7 ng/L E2 eşdeğeri üzerinde olmasına rağmen, BPA konsantrasyonu ölçüm limiti 1 ng/L'nin altındadır. BPA'nın elde edilen toplam östrojenik aktiviteyi oluşturacak konsantrasyonda olmaması, incelenen numunelerde östrojenik aktiviteye neden olan başka EBM'lerin olduğunu kanıtlamaktadır.

YES biyodeneyi ile toplam östrojenik aktivite ölçümü Türkiye'de ilk defa bu tez çalışması kapsamında kullanılmaya başlanmış, toksisite sonuçları uygun bir S eğrisi göstermiş, içme suyu numunelerine uygulandığında da literatürdeki sonuçlara benzer şekilde çok yüksek olmayan hatta ölçüm limitinin altında değerler elde edilmiştir. S eğrisinin literatüre uygun bir şekilde elde edilmesi testin başarılı bir şekilde yapıldığı göstermektedir.

5. DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, farklı firmaların şişelenmiş içme suları incelenerek dularında östrojenik aktivitenin varlığı araştırılmıştır. Östrojenik aktivitenin tespiti için kullanılan biyodeneye ek olarak, plastik ve özellikle polikarbonat şişelerde satılan sularda östrojenik aktivite yaratabilecek olan en önemli bileşenlerden biri olan bisfenol-A'nın varlığı ve konsantrasyonu LC-MS/MS ölçümü ile belirlenmiştir. Farklı marka numunelerin yanı sıra, aynı markanın farklı cins şişeleri için de deneyler yürütülmüş olup dezenfeksiyonu için klorlama ve ozonlama kullanılan numuneler de incelenmiştir. Bu şekilde su kaynağında bulunabilecek östrojenite yaratma ihtimali bulunan maddelerin varlığının yanı sıra, şişe materyalinden kaynaklanacak östrojenitenin de izlenebilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada öncelikle 2 farklı markanın PET ve bir markanın polikarbonat damacana şişe numunelerinin KFE prosedürü uygulanmadan deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen sonuçlar YES biyodeneyi ölçüm limiti olan 2,7 ng/L E2 eşdeğerinin altındadır. Bu sonuçlara ve östrojenik aktiviteye neden olan mikrokirleticilerin ng/L seviyesindeki konsantrasyonlarda olmaları verisine dayanarak numunelerin KFE uygulanarak konsantre hale getirilmesine karar verilmiştir. KFE'deki birçok değişkenin prosedürün verimini etkilemesi sebebi ile ekstraksiyon süresince kullanılan solventler, farklı toplama adımları, kartuş çeşidi gibi değişkenler denenerek hem YES biyodeneyi hem de LC-MS/MS analitik ölçümleri için yüksek geri kazanım oranı sağlayan KFE prosedürü optimize edilmiştir.

KFE optimizasyonun ardından toplamda 17 farklı markanın şişe suyu numunelerinde hem YES biyodeneyi ile numunedeki toplam östrojenik aktivite belirlenmiş hem de LC-MS/MS ölçümleri ile östrojenik aktiviteye neden olduğu bilinen BPA'nın numunelerdeki varlığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Her iki deneyin sonuçları korele edilerek, numunelerde ölçülen toplam östrojenik aktivitenin sadece BPA'dan kaynaklanıp kaynaklanmadığı, BPA konsantrasyonunun ölçülebilecek bir östrojenite değeri verip vermediği belirlenmiştir.

Çalışma süresince 13 farklı markanın polikarbonat şişe suyunun 4 farklı marka numunesinde toplam östrojenik aktivite YES biyodeneyi ölçüm limiti olan 2,7 ng/L'nin üstünde, BPA konsantrasyonu ise LC-MS/MS'te BPA ölçüm limiti olan 1 ng/L'nin üzerinde çıkmıştır. 5 farklı markadan alınan PET şişe numunelerinin ise 3 tanesinde toplam östrojenik aktivite 2,7 ng/L'nin üstünde, 2 numunesinde de BPA konsantrasyonu 1 ng/L'nin üstündedir. Ancak hiçbir numunede ölçülen BPA konsantrasyonları, YES testi ile ölçülen toplam E2 eşdeğer konsantrasyonunu oluşturmak için yeterli değildir. Bu sonuç, özellikle biyolojik bir etki incelenmek istendiğinde, çok hassas yöntemler kullanılsa dahi, seçilen maddenin ölçülmesi yolu ile yapılan kimyasal analizlerin yetersiz kalacağını işaret etmektedir.

Ayrıca, su kaynağından gelmesi muhtemel östrojenik aktiviteye neden olabilecek mikrokirleticilerin varlığının belirlenmesi için 2 farklı markadan temin edilen cam damacana su numunelerinin deneyleri yapılmıştır. Bir numunenin toplam östrojenik aktivitesi (cam kartuş, YES biyodeneyi) 28 ng/L E2 eşdeğeri, LC-MS/MS ölçüm sonucu ise (plastik kartuş) 4,7 ng/L BPA'dır. Diğer numunenin ise toplam östrojenik aktivitesi <2.7 ng/L E2 eşdeğerinin altında, LC-MS/MS sonucu ise 4,5 ng/L BPA olarak ölçülmüştür.

İleriki çalışmalarda su numunesinin deneyleri yapıp ardından klorlayıp tekrar deneyleri yapılarak klorlama ile oluşan yan ürünlerin etkisine bakılabilir. Klorlama ile bütün organik maddeler oksitlenmediği için bazıları klor ile yer değiştirme reaksiyonu vererek daha fazla östrojenik aktivite gösteren maddelere dönüşebilir. Nitekim, BPA klorlu türevlerinin su matrisini önemli bir şekilde etkilediği ve iyon sıkıştırmanın klorlama derecesi ile arttığı hatta BPA-Cl₄ için %80'in üzerinde bir değere ulaştığı bilinmektedir (Dorival-Garica, 2012).

Elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, cam damacana numunelerinde belirlenen östrojenik aktivite nedeni ile şişelenmiş içme sularında östrojenik aktiviteye neden olan EBM'lerin sadece şişe materyalinden değil, su kaynağından da gelebileceği bulunmuştur. Bunun dışında, YES biyodeneyi ile LC-MS/MS ölçüm sonuçları korele edildiğinde, bazı numune sonuçlarında BPA konsantrasyonun ölçüm limiti olan 1 ng/L'nin altında olmasına rağmen toplam östrojenik aktivitenin 2,7 ng/L'nin üzerinde ve BPA'nın ölçüm limitinin üstünde olduğu numunelerde ise ölçülen BPA konsantrasyonunun toplam östrojenik aktiviteyi oluşturmaya

yetmeyecek olması, şişelenmiş içme sularında östrojenik aktiviteye neden olan BPA'dan başka maddelerin varlığını işaret etmektedir.

Şişelenmiş içme sularında şişelerin güneş ışığı altında bekletilmiş olma ihtimali, özellikle polikarbonat şişelerin üretim aşamasından sonra yıllarca tekrar kullanılması gibi etkenlerin bu mikrokirleticilerin suya geçişini etkileyebileceği de düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen verilere dayanarak, aynı firmanın farklı yıllara ait üretim tarihli polikarbonat şişelerindeki su numuneleri güneş ışığı altında bekletilerek çalışma kapsamında yapılan deneylere tabii tutulabilir, bu etkenlerin mikrokirleticilerin suya geçişindeki etkisi araştırma konusu olmalıdır.

Bunun dışında, bazı numunelerin YES biyodeneyi sonucunda toplam östrojenik aktivitesi belirlenmiş, ancak LC-MS/MS ile yapılan BPA ölçüm sonucunun bu etkiyi yaratmaya yeterli olmadığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, birçok dünya ülkesinde getirilen BPA yasağı sonrasında, plastikleştirici madde olarak başka kimyasalların kullanıldığı bilinmekte olup, bu kimyasalların da belirlenen toplam östrojenik aktiviteye katkısı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, bu çalışma sonrasında, BPA içermeyen damacanalardaki içme sularındaki östrojenik aktivite araştırılarak BPA yerine geçen maddeler ile korelasyonuna bakılabilir. Ayrıca, östrojenik aktivite dışında diğer endokrin bozucu etkiler üzerinde de çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ahel M., Giger W., Koch M.** (1994a). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.*, 28:1131–42.
- Ahel M., Giger W., Schaffner C.** (1994b). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 2. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.*, 28:1143–52.
- Ahel M., Scully FE., Hoigne J., Giger W.** (1994c). Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere*, 28:1361–8.
- Amiridou D. ve Dimitra Voutsas D.** (2011). Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 281–286.
- Anonymous** (2001). Nonylphenol. *Chem. Mark. Rep.*, 260:31.
- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M.C., Etienne, S.** (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*, 46(3), 571–583.
- Balaguer P., François F., Comunale F., Fenet H., Boussioux A.M., Pons M., Nicolas J.C., Casellas C.** (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total. Environ.* 233:47–56.
- Beck I. C., Bruhn R., Gandrass J.** (2006). Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, 63, 1870–1878.
- Bennie, D.T.** (1999). Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*, 34, 79–122.
- Bergamasco, A.M., Eldridge, M., Sanseverino, J., Sodre, F.F., Montagner, C.C., Pescara, I.C., Jardim, W.F., Umbuzeiro Gde, A.** (2011). Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(11), 3288–3293.
- Biedermann-Brem, S., Grob, K.** (2009). Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor. *European Food Research and Technology*, 228(5), 679–684.

- Bistan, M., Podgorelec, M., Logar, R.M., Tisler, T.** (2012). Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 427-433.
- Brooke, L., Thursby, G.** (2005). Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington DC, USA: Report for the United States EPA, Office of Water, Office of Science and Technology.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A., Needham, L.L.** (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.*, 116, 39–44.
- Campbell P.** (2002). Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. ToxEcology Environmental Consulting, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Colapicchioni, V., Piovesana, S., Samperi, R., Lagana, A.** (2013). Analytical strategies based on chromatography-mass spectrometry for the determination of estrogen-mimicking compounds in food. *Journal of Chromatography A*, 1313, 62-77.
- Casajuana N., Lacorte S.** (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia*, 57:649–655.
- Céspedes R., Skryjová K., Raková M., Zeravik J., Fránek M., Lacorte S., Barceló D.** (2006). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS. *Talanta*, 70, 745–751.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S.V., Soto, A.M.** (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environmental Health Perspectives*, 101, 378-384.
- Colin A., Bach C., Rosin C., Munoz J.F., Dauchy X.** (2014). Is Drinking Water a Major Route of Human Exposure to Alkylphenol and Bisphenol Contaminants in France? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(1), 86-99.
- Colosi, J.C., Kney, A.D.** (2011). A yeast estrogen screen without extraction provides fast, reliable measures of estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(10), 2261-2269.
- Comber, M.H.I., Williams, T.D., Stewart, K.M.** (1993). The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Wat. Res.*, 27, 273–276.
- Comission, E.** (2008). Environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC. Council, E.P.a.o.t. (ed).

- Conroy O., Quanrud D.M., Ela W.P., Wicke D., Lansey K.E., Arnold R.G.** (2005). Fate of Wastewater Effluent hER-Agonists and hER-Antagonists during Soil Aquifer Treatment. *Environmental Science & Technology*, 39(7), 2287-2293.
- Cooper J.E., Kendig E.L., Belcher S.M.** (2011). Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, 85(6), 943-947.
- Cousins I. T, Staples, C. A., Klecka G. M., Mackay D.** (2002). A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Human Ecol. Risk Assess.*, 8 (5), 1107–1135.
- Directive 2000/60/EC.** Establishment and framework for community action in the field of water policy. Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union.
- Directive 2003/53/EC.** Amending for the 26th time the Council directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union.
- Donald D. B., Cessna LAJ, Sverko E, Glozier NE.** (2007). Pesticides in surface drinking-water supplies of the Northern Great Plains. *Environ. Health Perspect.*, 115:1183–1191.
- Dorival-Garcia N., A.Zafra-Gomez A., Navalon A., Vilchez J.L.** (2012). Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 101, 1-10.
- EFSA (European Food Safety Authority).** (2008). Toxicokinetics of bisphenol A. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in Contact with food (AFC). J EFSA 759:1–10.
- Ekelund R., Granmo A., Magnusson K., Berggren M.** (1993). Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. Pollut.*, 79:59–61.
- European Commission** (1998). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Comm L. 330/32, 5/12/98.
- European Commission** (2011). Commission Regulation 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Off J Eur Comm L12/1, 15/1/2011.

- European Commission** (2012). COM (2011) 876 final of 31/1/2012 Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- Falconer I.R.** (2006). Are endocrine disrupting compounds a health risk in drinking water, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 3:180–184.
- Fan Z., Hu J., An W., Yang M.** (2013). Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. *Environmental Science and Technology*, 47(19), 10841-10850.
- Farre M., Kloter G., Petrovic M., Alonso M.C., de Alda M.J.L., Barcelo D.** (2002). Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta.*, 456:19–30.
- Fernandez M.P., Noguerol T.N., Lacorte S., Buchanan I. ve Piña B.** (2009). Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393:957–968.
- Fiege H., Voges H.W., Hamamoto T., Umemura S., Iwata T., Miki H., Fujita Y., Buysch H.J., Garbe D., Paulus W.** (2000). Phenol derivatives. In: Barbara, E., Stephen, H., Gail, S. (Eds.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A19. Wiley- VCH, Weinheim, p. 313.
- Fries E., Puttmann W.** (2003). Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *J. Environ. Monit.*, 5:598–603.
- Fries E., Puttmann W.** (2004). Occurrence of 4-nonylphenol in rain and snow. *Atmos. Environ.*, 38:2013–6.
- Fontanals N, Borrull F, Marce RM.** (2012). Ionic liquids in solidphase extraction. *TrAC Trends. Anal. Chem.* 41, 15-26.
- Fujita M., Ike M., Mori K., Kaku H., Sakaguchi Y., Asano M.** (2000). Behaviour of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plants in Japan: biotransformation and ecotoxicity. *Water Sci. Technol.*, 42:23–30.
- Giger W., Brunner P.H., Schaffner C.** (1984). 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 225:623–5.
- Gray M.A., Metcalfe C.D.** (1997). Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1082–1086.
- Grover D.P., Balaam J., Pacitto S., Readman J.W., White S., Zhou J.L.** (2011). Endocrine disrupting activities in sewage effluent and river water determined

by chemical analysis and in vitro assay in the context of granular activated carbon upgrade. *Chemosphere*, 84(10), 1512-1520.

Grun F., Blumberg B. (2009). Endocrine disrupters as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304, 19–29.

Guart A., Bono-Blay F., Borrell A. ve Lacorte S. (2011). Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Additives & Contaminants. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 28(5), 676-685.

Guenther K., Heinke V., Thiele B., Kleist E., Prast H., Raecker T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.* 36:1676–80.

Guillette L.J., Crain D.A., Gunderson M.P., Kools S.A.E., Milnes M.R., Orlando E.F., Rooney A.A., Woodward A.R. (2000). Alligators and endocrine disrupting contaminants: a current perspective. *American Zoologist* 40, 438–452.

HELCOM (Helsinki Commission). (2002). Guidance document on nonylphenol/nonylphenol ethoxylates (Np/NPEs). Baltic Marine Environment Protection Commission.

Hemmer M.J., Bowman C.J., Hemmer B.L., Friedman S.D., Marcovich D., Kroll K.J., Denslow N.D. (2002). Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 58, 99–112.

Hesselsoe M., Jensen D., Skals K., Olesen T., Moldrup P., Roslev P. (2001). Degradation of 4-nonylphenol in homogeneous and nonhomogeneous mixtures of soil and sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.*, 35:3695–700.

Hoekstra E.J., Simoneau C. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4), 386-402.

Huang Y.Q., Wong C.K., Zheng J.S., Bouwman H., Barra R., Wahlstrom B., Neretin L., Wong M.H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International* ,42, 91-99.

Jiménez-Díaz I., Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navea N., Navalón A., Fernández M.F., Olea N., Vilchez J.L. (2010). Determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 878, 3363–3369.

- JME (Japanese Ministry of Environment).** (2001). Report on the test results of endocrine disrupting effects of nonylphenol on fish (draft). Tokyo, Japan; Environmental Health Department, Government of Japan.
- Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P., Sumpter J.P.** (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 194–202.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P.** (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32, 2498–2506.
- Johnson A.C., Aerni H.R., Gerritsen A., Gibert M., Giger W., Hylland K.** (2005). Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.*, 39:47–58.
- Jonkers, N., Laane, R. ve de Voogt, P.** (2005). Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2): 115-135.
- Jurado A., Vazquez-Sune E., Carrera J., Lopez de Alda M., Pujades E., Barcelo D.** (2012). Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment* 440, 82-94.
- Kang J.H., Aasi D., Katayama Y.** (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.*, 37, 607–625.
- Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W.** (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8897–8901.
- Kinnberg K., Korsgaard B., Bjerregaard P.** (2000). Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Marine Environmental Research*, 50,169-173.
- Klecka G. M., Staples C. A., Clark K. E., van der Hoeven N., Thomas D. E., Hentges S. G.** (2009). Exposure Analysis of Bisphenol A in Surface Water Systems in North America and Europe. *Environ. Sci. Technol.*, 43 (16), 6145–6150.
- Koh Y.K.K., Lester J.N., Scrimshaw M.D.** (2005). Fate and behavior of alkylphenols and their polyethoxylates in an activated sludge plant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 75:1098–106.

- Krein A., Pailler J.Y., Guignard C., Gutleb A.C., Hoffmann L., Meyer B., Keßler S., Berckmans P., Witters H.E.** (2012). Determination of Estrogen Activity in River Waters and Wastewater in Luxembourg by Chemical Analysis and the Yeast Estrogen Screen Assay. *Environment and Pollution*, 1(2).
- Kuch H.M., Ballschmiter K.** (2001). Determination of endocrinedisrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.*, 35:3201–3206.
- Kuruto-Niwa R., Nozawa R., Miyakoshi T., Shiozawa T., Terao Y.** (2005). Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19(1), 121-130.
- Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W.E., Depledge M., Wallace R.B., Melzer D.** (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 300, 1303–1310.
- Langford K.H., Lester J.N.** (2002). Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. In: Brikett JW, Lester JN, editors. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.
- Langford K.H., Scrimshaw M.D., Brikett J.W., Lester J.N.** (2005a). Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Res.*, 39:870–6.
- Le H.H., Carlson E.M., Chua J.P., Belcher S.M.** (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 176(2), 149-156.
- Lee P.C., Lee W.** (1996). In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57:341–8.
- Li X., Ying G.G., Su H.C., Yang X.B., Wang L.** (2010). Simultaneous determination and assessment of 4- nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International*, 36(6), 557-562.
- Li B., Zhang T.** (2013). Different removal behaviours of multiple trace antibiotics in municipal wastewater chlorination. *Water Research*, 47(9), 2970-2982.
- Liao C., Kannan K.** (2012). Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 46(9), 5003-5009.

- Liao C., Liu F., Kannan K.** (2012a). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 6515–6522.
- Liscio C., Magi E., Di Carro M., Suter M.J., Vermeirssen E.L.** (2009). Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Environmental Pollution*, 157(10), 2716-2721.
- Loos L., Wollgast J., Huber T., Hanke G.** (2007). Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387:1469–1478
- Lorenc J.L., Scheffer G.** (2003). Alkylphenols W. Kirk–Othmer encyclopaedia of chemical technology. John Wiley and Sons Inc.
- Magi E., Scapolla C., Di Carro M., Liscio C.** (2010). Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography–tandemmass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 45, 1003-1011.
- Maggioni S., Balaguer P., Chiozzotto C., Benfenati E.** (2013). Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(3), 1649-1660.
- Manzano M.A., Perales J.A., Sales D., Quiroga J.M.** (1998). Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61:489–96.
- Melcer H., Klecka G.** (2011). Treatment of Wastewaters Containing Bisphenol A: State of the Science Review.
- Miller W.R., Sharpe R.M.** (1998). Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-Related Cancer* 5, 69–96.
- Mohapatra D.P., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y.** (2010). Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge-fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78(8), 923-941.
- Molina-Molina J. M., Amaya E., Grimaldi M., Sáenz J., Real M., Fernández M. F., Balaguer P., Olea N.** (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272, 127–136.
- Nakada N., Tanishima T., Shinohara H., Kiri K., Takada H.** (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in

Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.*, 40:3297–303.

Nash J.P., Kime D.E., Van der Ven L.T.M., Wester P.W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C.R. (2004). Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112, 1725–1733.

Naylor C.G., Mieure J.P., Adams W.J., Weeks J.A., Castaldi F.J., Ogle L.D. (1992). Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69:695–703.

Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U. (2003). Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2207–2218.

PARCOM 92/8. (2000). Recommendation on nonylphenol-ethoxylates. London, UK. OSPAR Convention.

Patisaul H.B., Jefferson W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 400–419.

Patrolecco L., Capri S., Angelis S., Polesello S., Valsecchi S. (2004). Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by extraction with a non-ionic surfactant (Tween 80). *Journal of Chromatography A*, 1022, 1–7.

Petrie B., McAdam E.J., Whelan M.J., Lester J.N., Cartmell E. (2013). The determination of nonylphenol and its precursors in a trickling filter wastewater treatment process. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3243–3253.

Petrovic M., Fernandez-Alba A.R., Borrull F., Marce R.M., Mazo E.G., Barcelo D. (2002a). Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21:37–46.

Plotan M., Frizzell C., Robinson V., Elliott C.T., Connolly L. (2013). Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1590–1596.

Richter C.A., Birnbaum L.S., Farabollini F., Newbold R.R., Rubin B.S., Talsness C.E., Vandenberg J.G., Walser-Kuntz D.R., vom Saal F.S. (2007). In vivo effects bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.*, 24, 199–224.

Riu A., Maire A., Grimaldi M., Audebert M., Hillenweck A., Bourguet W., Balaguer P., Zalko D. (2011). Characterization of novel ligands of ER α , ER β , and PPARc: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *J. Toxicol. Sci.* 122:372–382.

- Routledge E.J., Sumpter J.P.** (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241-248.
- Sabik H., Gagne F., Blaise C., Marcogliese D.J., Jeannot R.** (2003). Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere*, 51:349–56.
- Sari S., Ozdemir G., Yangin-Gomec C., Zengin G.E., Topuz E., Aydin E., Pehlivanoglu-Mantas E., Okutman Tas D.** (2014). Seasonal variation of diclofenac concentration and its relation with wastewater characteristics at two municipal wastewater treatment plants in Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 272,155–164.
- SCF (Scientific Committee on Food).** (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. SCF/CS/PM/3936 Final.
- Shang D.Y., Macdonald R.W.** (1999). Ikonomou MG. Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environ. Sci. Technol.*, 33:1366–72.
- Shao B., Hu J., Yang M.** (2003). Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70:527–32.
- Sharpe R.M., Skakkebaek N.E.** (1993). Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive-tract. *Lancet* 341, 1392–1395.
- Silva C.P., Otero M., Esteves V.** (2012). Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environmental Pollution* 165, 38-58.
- Skakkebaek N.E.** (2003). Testicular dysgenesis syndrome. *Hormone Research* 60 (Suppl. 3), 49.
- Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N.** (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34(7), 1033-1049.
- Soto A.M., Justicia H., Wray J.W.** (1991). Sonnenschein C. P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.*, 92:167–73.
- Stavarakakis C., Colin R., Hequet V., Faur C., Le Cloirec P.** (2008). Analysis of endocrine disrupting compounds in wastewater and drinking water treatment plants at the nanogram per litre level. *Environ. Technol.*, 29:279–286.

- Stephanou E., Giger W.** (1982). Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 16, 800–805.
- Sun Q., Deng S., Huang J., Shen G., Yu G.** (2008). Contributors to estrogenic activity in wastewater from a large wastewater treatment plant in Beijing, China. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25(1), 20-26.
- Swan S.H., Main K.M., Liu F., Stewart S.L., Kruse R.L., Calafat A.M., Mao C.S., Redmon J.B., Ternand C.L., Sullivan S., Teague J.L.** (2005). The study for future families research team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1056–1061.
- Topp E., Starratt A.** (2000). Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4- nonylphenol in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:313–8.
- Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L.J., Jegou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Muller J., Rajpert De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebaek N.E.** (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 104, 741–803.
- Topuz E., Sari S., Ozdemir G., Aydin E., Pehlivanoglu-Mantas E., Okutman Tas D.** (2014). Optimization of diclofenac quantification from wastewater treatment plant sludge by ultrasonication assisted extraction. *Journal of Chromatography B*, 958, 48–54.
- Toyo’oka T., Oshige Y.** (2000). Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. *Analytical Sciences* 16(10), 1071-1076.
- Uchiyama T., Makino M., Saito H., Katase T., Fujimoto Y.** (2008). Syntheses and estrogenic activity of 4-nonylphenol isomers. *Chemosphere*, 73:s60–5.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency).** (1990). Testing consent order on 4-nonylphenol, branched. Fed Reg. 35:5991–4.
- USFDA (United States Food and Drug Administration)** (2008). Draft assessment of bisphenol A for use in food contact applications. August 15, 2008. p2.
- Vandenberg L.N., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons W.V.** (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.*, 24:139–177.
- Vandenberg L.N., Chahoud I., Heindel J.J., Padmanabhan V., Paumgartten F.J.R., Schoenfelder G.** (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 118, 1055–1070.

- Vega-Morales T., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodriguez J.J.** (2010). Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17alpha-ethynylestradiol and 17beta-estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *Journal of Hazardous materials*, 183(1-3), 701-711.
- Wagner M., Oehlmann J.** (2009). Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research International*, 16(3), 278-286.
- Wagner M., Oehlmann J.** (2011). Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 128-135.
- Wagner M., Schlusener M.P., Ternes T.A., Oehlmann J.** (2013). Identification of putative steroid receptor antagonists in bottled water: combining bioassays and high-resolution mass spectrometry. *PloS One* 8(8), e72472.
- Wang L., Ying, G.G., Chen F., Zhang L.J., Zhao J.L., Lai H.J., Chen Z.F., Tao R.** (2012). Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution* 165, 241-249.
- White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G.** (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135:175–82.
- Witorsch, R.J.** (2002). Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 118-130.
- Yadetic F., Male R.** (2002). Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 58, 113–129.
- Ying G.G., Williams B., Kookana R.** (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates: a review. *Environ. Int.* 28, 215–226.
- Ying G.G., Kookana R.S., Kumar A.** (2008). Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(1), 87-94.
- Zhang H.C., Xu T., Hu X.L., Pang W.H., Yin D.Q.** (2013a). The distributions, removals and estrogenic effects of selected endocrine disrupting chemicals in two drinking water factories in China. *Journal of Water and Health* 11(1), 41-50.
- Url-1** < <http://eur-lex.europa.eu> >, alındığı tarih: 13.10.2014.
- Url-1** < <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr> >, alındığı tarih: 06.11.2014.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Badel GÜN

Doğum Yeri ve Tarihi: Ereğli, 29.01.1989

E-Posta: badelgun@gmail.com

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü

