T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOKSİK VE UYARICI ORGANİK MOLEKÜLLERİN YENİLİKÇİ ANALİTİK YAKLAŞIMLAR İLE KÜTLE SPEKTROMETRİ SİSTEMİNDE TAYİNLERİ

Sude OFLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Fatma TURAK

Eş Danışman

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Temmuz, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOKSİK VE UYARICI ORGANİK MOLEKÜLLERİN YENİLİKÇİ ANALİTİK YAKLAŞIMLAR İLE KÜTLE SPEKTROMETRİ SİSTEMİNDE TAYİNLERİ

Sude OFLU tarafından hazırlanan tez çalışması 07.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fatma TURAK	Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi	Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman	Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Fatma TURAK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Yücel Şahin, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Erdal DİNÇ, Üye
Ankara Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Fatma TURAK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Toksik ve Uyarıcı Organik Moleküllerin Yenilikçi Analitik Yaklaşımlar ile Kütle Spektrometri Sisteminde Tayinleri" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sude OFLU

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2021-4507 kodlu proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, sonsuz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, güler yüzünü ve samimiyetini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Fatma TURAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgileriyle ışık tutarak yol gösteren, cesaretlendirici sözleriyle bana akademik yolda yürüme şevki kazandıran, tavsiyeleri, bilgi ve birikimleri ile bana olağanüstü ilham veren, destek ve emeğini her zaman hissettiğim, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli eş danışmanım Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Organik kimya alanında kıymetli bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'nın 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamındaki desteği için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Sezin ERARPAT, Buse Tuğba ZAMAN, Süleyman BODUR ve Dr. Dotse Selali CHORMEY'e bana karşı destekleri, sabırları, rehberlikleri ve tüm sorularıma bıkmadan cevap verme isteklilikleri için içten teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı tüm "Bakırdere Araştırma Grubu" üyelerine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi olarak yanımda olan, her türlü fedakârlığı gösteren, beni her zaman cesaretlendiren ve en iyisini hayal etmeye teşvik eden, bana olan inancını her zaman hissettiğim sevgili babam Haydar OFLU'ya teşekkür ederim.

Desteklerini, güvenlerini ve inançlarını hiç eksik etmeyen, yanımda olduklarını her zaman bildiğim annem Kadriye OFLU ve canım kardeşim Nuri Can OFLU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Sude OFLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xii

TABLO LİSTESİ xvii

ÖZET xix

ABSTRACT xxi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti…… 1

1.2 Tezin Amacı…… 3

1.3 Hipotez……4

2 GENEL BİLGİLER 6

2.1 Metamfetamin……..6

2.2 Pestisitler……12

2.3 Toksik ve Uyarıcı Organik Moleküllerin Tayin Yöntemleri…….17

2.4 Numune Hazırlama Teknikleri…….. 31

2.5 İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi…… 47

2.6 Literatür Taraması…… 56

3 MATERYAL VE METOT 60

3.1 Kimyasallar ve Reaktifler……... 60

3.2 Cihazlar……. 61

3.3 Deneysel Prosedürler……63

4 DENEYSEL ÇALIŞMALAR 71

4.1 Metamfetamin……71

4.2 Fenuron……..93

5 SONUÇ 106

KAYNAKÇA **108**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **145**

SİMGE LİSTESİ

a/a	Ağırlık/Ağırlık
C	Analitin Derişimi
M_A	Analitin Molar Kütlesi
±	Artı veya eksi
β	Beta
≥	Büyük eşittir
>	Büyüktür
N_W	Belirtilen Ortamın Toplam Nüfusu
K_D	Dağılım Katsayısı
dk	Dakika
⇆	Denge İşareti
dL	Desilitre
A*	Doğal Birincil Standart
d	Döteryum
m	Eğim
w_B	Eklenen İzotopça Zengin Maddenin İçindeki Analitin Kütle Fraksiyonu
r_B	Eklenen İzotopça Zengin Maddenin İzotopik Bileşimi
n_B	Eklenen İzotopça Zengin Maddenin Miktarı
M_B	Eklenen İzotopça Zengin Maddenin Molar Kütlesi
$m_{B(AB)}$	Eklenen İzotopça Zengin Maddenin Sulu Çözeltisinin Kütlesi
g	Gram
N	Gürültü
B	İkinci Yakalamada İşaretlenen Türlerin Sayısı
N_B	İlk Yakalanan ve İşaretlenen Türlerin Toplam Sayısı
kg	Kilogram
R^2	Korelasyon Katsayısı
K	Kütle Sapması Kalibrasyon Faktörü
m/z	Kütle/Yük Oranı
L	Litre
m	Metre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram

µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mol	Mol
M	Molarite
ng	Nanogram
R_{AB}	Nihai Karışımın İzotopik Bileşimi
A	Numune
r_A	Numune İzotopik Bileşimi
n_A	Numunedeki Analit Miktarı
w_A	Numunedeki Analitin Kütle Fraksiyonu
$A_{örnek}$	Numunedeki Analitin Pik Alanı
$m_{A(AB)}$	Numunenin Sulu Çözeltisinin Kütlesi
Ω	Ohm
r	Ölçülen İzotop Oranı
π	Pi Sayısı
pg	Pikogram
s	Saniye
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
S	Sinyal
$A_{standart}$	Standart Çözeltideki Analitin Pik Alanı
s	Standart Sapma
R	Teorik İzotop Oranı
Σ	Toplam
W	Yakalanan İkinci Türlerin Toplam Sayısı
≈	Yaklaşık
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AA	Asetik Anhidrit
ACN	Asetonitril
ACT	Aseton
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım
ARfD	Akut Referans Doz
BSS	Bağıl Standart Sapma
C_D	Analitin kalibrasyon grafiği denklemi üzerinden hesaplanan deneysel derişimi
CHL	Kloroform
CI	Kimyasal İyonizasyon
C_T	Örnek içerisine teorik olarak eklenen analitin derişimi
DC	Doğru Akım
DCE	1,2-Dikloroetan
DCM	Diklorometan
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
DD-TDME	Doğrudan Daldırma-Tek Damla Mikroekstraksiyon
DSSME	Dağıtıcı Sıvı -Sıvı Mikroekstraksiyon
ECD	Elektron Yakalama Dedektörü
EI	Elektron Impakt İyonizasyon
ESI	Elektrosprey İyonlaştırma
EtOH	Etanol
FAB	Hızlı Atom Bombardımanı
FC	Faraday Kabı
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
GK	Geri Kazanım
GL	Gözlenebilme Limiti
HFBA	Heptaflorobütirik anhidrit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IS	İzotop Seyreltme
IS^1MS	Tekli İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi
IS^2MS	İkili İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi

IS^3MS	Üçlü İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi
IS^4MS	Dörtlü İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi
İTU	İyi Tarım Uygulamaları
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KFE	Katı Faz Ekstraksiyon
KFME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
LC	Sıvı Kromatografi
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometri
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma
MDMA	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma
ME	Matriks Etkisi
MeOH	Metanol
MRL	Maksimum Kalıntı Seviyesi
MS	Kütle Spektrometrisi
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCI-GC-MS	Negatif Kimyasal İyonlaşma-Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
NPD	Nitrojen/Fosfor Dedektörü
PCP	Fensiklidin
PEEK	Polietereterketon
PFPA	Pentafloropropiyonik Anhidrit
RF	Radyo Frekansı
SD-DO-	Sprey Destekli Damlacık Oluşturma Esaslı Sıvı Faz
SFME	Mikroekstraksiyon
SFC	Süperkritik Akışkan Kromatografisi
SFME	Sıvı Faz Mikroekstraksiyon
SIM	Seçili İyon İzleme
SSE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
TB-TDME	Tepe Boşluklu-Tek Damla Mikroekstraksiyon
TCD	Termal İletkenlik Dedektörü
TDME	Tek Damla Mikroekstraksiyon
TFA	Trifloroasetik asit
TIC	Toplam İyon Kromatografi
TL	Tayin Limiti

TLC	İnce Tabaka Kromatografi
TMS	Trimetilsilil
UNODC	Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi
US EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
UV	Ultraviyole
UV/Vis	Ultraviyole/Görünür
YKODME	Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Metamfetaminin moleküler yapısı [74] 8

Şekil 2.3 Fenurona ait moleküler yapı [214].....17

Şekil 2.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin şematik diyagramı [227] 20

Şekil 2.5 Gaz Kromatografi (GC) sisteminin şematik diyagramı [243].....22

Şekil 2.6 Bir kütle spektrometrenin blok diyagramı [219].....26

Şekil 2.7 Kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı [272] 28

Şekil 2.8 GC-MS şematik diyagramı [285].....31

Şekil 2.9 Tipik dört adımlı KFE prosedürü [305].....34

Şekil 2.10 Katı Faz Mikroekstraksiyon (KFME) enjektörü [311].....35

Şekil 2.11 Tipik TDME modları [321].....37

Şekil 2.12 YKODME prosedürünün genel tasarımı [328] 39

Şekil 2.13 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon prosedürü [339] 41

Şekil 2.14 Sprey destekli damlacık oluşumu esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon prosedürü (BioRender kullanılarak üretilmiştir) [351] 42

Şekil 2.15 Asilasyon reaksiyonuna bir örnek [366].....45

Şekil 2.16 Trimetilsilil ile hidroksil gruplarının türevlendirilmesi için bir örnek [358] 46

Şekil 2.17 Zoolojide izotop seyreltme uygulamasının bir örneği [378] 48

Şekil 2.18 İzotop seyreltme ilkesi; (a) izotop S ve X'in atom fraksiyonları, örnek/numune A için, S_A ve X_A, (b) izotop S ve X'in atom fraksiyonları, eklenen (izotopça zengin madde) B için, S_B ve X_B, (c) karışımdaki izotopik sinyallerin ölçülen oranı [384] 50

Şekil 3.1 Metamfetaminin türevlendirilmesine ait reaksiyonun kimyasal denklemi……64

Şekil 3.2 Metamfetamin tayini için SD-DO-SFME-GC-MS sistemi (grafiksel özet BioRender kullanılarak üretilmiştir) [351] 64

Şekil 3.4 Metamfetamin-d_3 asetamid sentezine ait reaksiyonun kimyasal denklemi. 65

Şekil 3.5 Püskürtme sistemi bileşenleri [398].....69

Şekil 3.6 Fenuron ve 2-naftoil klorür arasındaki türevlendirme reaksiyonunun kimyasal denklemi.....69

Şekil 4.1 Metamfetamin için GC-MS toplam iyon kromatogramı (TIC).....71

Şekil 4.2 Metamfetamine ait kütle spektrumu (A) ve parçalanma ürünleri (B).....72

Şekil 4.3 Metamfetamine ait ChemStation MS kütüphane verileri 72

Şekil 4.4 Metamfetamin asetamid türevi için GC-MS kromatogramı ve parçalanma ürünleri (A) ve kütle spektrumu (B).....73

Şekil 4.5 58,0; 91,0; 100,0; 134,0 and 148,0 m/z değerleri için üst üste çakıştırılmış kromatogramlar 74

Şekil 4.6 Metamfetamin asetamid-d3 için GC-MS kromatogramı (seçili iyon görüntüleme modu 103 m/z) ve parçalanma ürünleri (A) ve kütle spektrumu (B) 74

Şekil 4.7 Sodyum hidroksit derişiminin optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,5 mg/L / 8,0 mL, NaOH hacmi: 0,5 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %20,82 (a/a)/ 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s 77

Şekil 4.8 Sodyum hidroksit hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,5 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi: 100 g/kg, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %20,82 (a/a)/ 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s 78

Şekil 4.9 Asetik anhidrit derişimi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit çözücüsü: 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s 79

Şekil 4.10 Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi: %40 (a/a), Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 75 s 80

Şekil 4.11 Spreyleme sayısı optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s 81

Şekil 4.12 Karıştırma türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL , NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma süresi: 45 s 82

Şekil 4.13 Karıştırma süresi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü : %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü: vorteks 83

Şekil 4.14 Başlangıç numune hacminin optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi: 0,3 mg/L, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/süresi: vorteks/ 75 s.....84

Şekil 4.15 Metamfetamin tayini için SD-DO-SFME-GC-MS kalibrasyon doğrusu……..85

Şekil 4.16 Türevlendirilmiş fenurona ait seçimli iyon izleme modu (247 m/z) ile elde edilen kromatogram (A) ve parçalanma ürünleri (B) 93

Şekil 4.17 Fenuron türevine ait MS spektrumu 94

Şekil 4.18 Seçimli iyon izleme modu (247 m/z) kullanılarak, 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg fenuron derişimlerine ait üst üste çakıştırılmış kromatogramlar ve kör çözelti 94

Şekil 4.19 Ekstraksiyon solvent türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 40

g/kg/ 1,0 mL, 2-Naftoil klorür derişimi: %0,20 (a/a), Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s 95

Şekil 4.20 Sodyum hidroksit derişim optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH hacmi: 1,0 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s 96

Şekil 4.21 Sodyum hidroksit hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi: 20 g/kg, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s 97

Şekil 4.22 2-Naftoil klorür derişimi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür çözücüsü: kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/15 s 98

Şekil 4.23 Püskürtme sayısı optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s 99

Şekil 4.24 Karıştırma türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma süresi: 15 s 100

Şekil 4.25 Karıştırma süresi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü: ultrasonik banyo 100

Şekil 4.26 Numune/standart hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi: 20 mg/L, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/süresi: ultrasonik banyo/ 30 s.....101

Şekil 4.27 Fenuron için GC-MS kalibrasyon doğrusu.....103

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [219] 18

Tablo 2.2 Kütle spektrometri için iyon kaynakları [219].....27

Tablo 2.3 Kütle spektrometri için yaygın kütle analizörleri [219] 29

Tablo 3.1 Metamfetamin ve fenuron tayininde kullanılan kimyasallar 60

Tablo 3.2 Metamfetamin ve metamfetamin-d_3 için GC-MS koşulları.....62

Tablo 3.3 Fenuron için GC-MS koşulları 63

Tablo 3.4 Numune ve kalibrasyon karışımlarının hazırlanması için teorik kütle değerleri.....67

Tablo 3.5 SD-DO-SFME-IS^{4}MS yönteminde kalibrasyon ve numune karışımları için kullanılan standart ve numune çözeltilerinin derişimi 67

Tablo 4.1 Tek değişkenli yaklaşımla belirlenen tüm optimum koşullar 85

Tablo 4.2 Optimum koşullar altında SD-DO-SFME-GC-MS sistemi için sistem analitik performans değerleri 85

Tablo 4.3 Serum ve idrar örneklerinde metamfetamin tayini için yüzde geri kazanım sonuçları ve matris etkileri.....87

Tablo 4.4 Karışımların izotopik oran değerleri 88

Tablo 4.5 Serum ve idrar numunelerinde yüzde geri kazanım sonuçları ve bağıl standart sapma değerleri.....89

Tablo 4.6 Düşük seviye (2,0 mg/kg) için kalibrasyon ve numune karışımı bileşimleri.....90

Tablo 4.7 *Tablo 4.6*'daki proses için, örnek çözeltilerinde matriks seyreltmeleri .91

Tablo 4.8 Yüksek seviye (5,0 mg/kg) için kalibrasyon ve numune karışımı bileşimleri.....91

Tablo 4.9 *Tablo 4.8*'deki proses için, örnek çözeltilerinde matriks seyreltmeleri .92

Tablo 4.10 SD-DO-SFME yöntemine ait tüm optimum parametreler.....102

Tablo 4.11 Evsel atık su örnekleri için yüzde geri kazanım sonuçları ve standart sapma değerleri 105

ÖZET

Toksik ve Uyarıcı Organik Moleküllerin Yenilikçi Analitik Yaklaşımlar ile Kütle Spektrometri Sisteminde Tayinleri

Sude OFLU

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Fatma TURAK

Eş-Danışman: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Uyarıcı/uyuşturucu maddelerin kötüye kullanımı, son yıllarda önemli bir artış göstererek küresel bir sorun haline gelmiş ve insan sağlığı ve sosyal davranışlar üzerinde ciddi sonuçlara yol açmıştır. İnsan serumu ve idrarında metamfetaminin eser seviyelerdeki tayini için hassas, çevre dostu, basit ve hızlı bir analitik yönteme artan bir ihtiyaç vardır. Bu tezin ilk çalışmasında, metamfetaminin biyolojik örneklerde eser seviyelerde tayinini gerçekleştirmek amacıyla, GC-MS sisteminde analiz öncesi, eşzamanlı bir türevlendirme ve ekstraksiyon/ön deriştirme aşaması içeren sprey destekli damlacık oluşturma esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon (SD-DO-SFME) yöntemi geliştirilmiştir. Optimum koşullar altında, metamfetamin için gözlenebilme ve tayin limitleri sırasıyla 48,0 µg/kg ve 159,9 µg/kg olarak hesaplanmıştır. İnsan serumu ve idrarında yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda, analit üzerinde negatif girişim etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Matriks etkilerini azaltarak yüksek kesinlik ve doğruluk elde etmek amacıyla dörtlü izotop seyreltme kütle spektrometrisi (İS^{4}MS), geliştirilen SD-DO-SFME-GC-MS yöntemi ile birleştirilmiştir. Serum ve idrar örnekleri için yüzde geri kazanım sonuçları sırasıyla %99,4 – 100,2 ve %99,7 – 100,0 olarak hesaplanmıştır.

Fenilüre herbisitler, insan sağlığı ve çevre üzerinde olumsuz etkilere sahiptir ve kalıntıları potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Fenilüre herbisitlerin eser seviyedeki tayini amacıyla çevresel örneklerde duyarlı analitik yöntemler geliştirmek insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Bu tezin ikinci bölümünde atık su örneklerinde fenuronun tayini için, eş zamanlı türevlendirme ve SD-DO-SFME yönteminin ardından GC-MS tayinini içeren yüksek doğruluk ve duyarlılığa sahip bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Optimum deneysel koşullar altında, gözlenebilme limiti 0,15 mg/kg olarak hesaplanırken tayin limiti 0,49 mg/kg olarak bulunmuştur. Atık su örneklerinden kaynaklanan matriks etkilerini ortadan kaldırmak ve sonuçların doğruluk/kesinliğini arttırmak amacıyla matriks eşleştirme kalibrasyon stratejisi kullanılmış ve yüzde geri kazanım sonuçları %85,9 ± 0,3 ve %120,9 ± 3,5 aralığında hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İzotop seyreltme, türevlendirme, sprey destekli damlacık oluşturma esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi.

ABSTRACT

Determination of Toxic and Stimulant Organic Molecules in Mass Spectrometry System with Innovative Analytical Approaches

Sude OFLU

Department of Chemistry

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatma TURAK

Co-supervisor: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

The abuse of stimulant/narcotic drugs has become a global problem with a significant increase in recent years and has had serious consequences on human health and social behavior. There is a growing need for a sensitive, environmentally friendly, simple and rapid analytical method for the trace determination of methamphetamine in human serum and urine. In the first study of this thesis, a spray assisted droplet formation based liquid phase microextraction (SA-DF-LPME) method, which includes a simultaneous derivatization and extraction/preconcentration step, was developed before its determination in the GC-MS system for the determination of methamphetamine at trace levels in biological samples. Under the optimum conditions, limit of detection and quantitation for methamphetamine were calculated as 48.0 µg/kg and 159.9 µg/kg, respectively. As a result of recovery studies in human serum and urine, negative interference effects were observed on the analyte. Quadruple isotope dilution mass spectrometry (İD^{4}MS) was combined with the developed SA-DF-LPME-GC-MS method to achieve high precision, accuracy and

reproducibility by reducing matrix effects. Percent recovery results for serum and urine samples were calculated as 99.4 – 100.2% and 99.7 – 100.0%, respectively.

Phenylurea herbicides have adverse effects on human health and the environment, and their residues have a potential threat. It is of great importance for human health to develop sensitive analytical methods in environmental samples for the trace level determination of phenylurea herbicides. In the second part of this thesis, a highly accurate and sensitive analytical method was developed for the determination of fenuron in wastewater samples, which includes simultaneous derivatization and spray assisted droplet formation based liquid phase microextraction (SA-DF-LPME) method followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination. Under the optimum experimental conditions, limit of detection was calculated as 0.15 mg/kg and limit of quantification was found as 0.49 mg/kg. In order to eliminate matrix effects arising from wastewater samples and increase the accuracy/precision of the results, the matrix matching calibration strategy was used and the percent recovery results were calculated between 85.9% ± 0.3 and 120.9 ± 3.5%.

Keywords: Isotope dilution, derivatization, spray assisted droplet formation based liquid phase microextraction, gas chromatography-mass spectrometry.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin kullanımı ve/veya bağımlılığı, insan sağlığı, sosyal ve ekonomik yapılar için dünya çapında büyüyen ciddi bir tehdit haline gelmiş ve Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC), uyarıcı madde kullanımının her geçen gün arttığını ortaya koymuştur [1], [2]. Madde bağımlılığı ciddi zararlarına rağmen, kişinin madde arama ve alma üzerine zorlayıcı arzusu, uyuşturucu/uyarıcı madde yoksunluğundan kaynaklanan olumsuz duygusal durumdan kaçma ve tüketimi sırasındaki kontrol yetersizlikleri ile karakterize kronik, tekrarlayıcı bir bozukluktur. Bağımlılık yapan maddeler, etkilerine gore dört ana gruba ayrılmaktadır; uyarıcılar (stimülanlar; metamfetamin, metilendioksimetamfetamin (MDMA), kokain, fensiklidin (PCP), sentetik katinonlar (banyo tuzları)), uyuşturucular (narkotikler; morfin ve afyon ürünleri), yatıştırıcılar (depresanlar; alkol, sedatif ve trankilizan ilaçlar) ve halüsinojenler (esrar, meskalin, liserjik asit dietilamid (LSD)) [3], [4].

Amfetaminin daha güçlü bir türevi olan metamfetamin, yaygın olarak kötüye kullanılan ve son derece bağımlılık yapan psikostimulanlardan biridir [5]–[7]. Ya-Ba, ice ya da kristal gibi isimlerle de yaygın olarak anılan ve ‘kırmızı fosfor’, ‘fenil-2-propanon’ ve ‘Birch indirgemesi’ gibi farklı yöntemlerle üretilebilen metamfetamin, ilk olarak Japonya'da efedrinden sentezlenmiştir [8]–[11]. Metamfetaminin sürekli ve kötüye kullanımı, akut veya kronik toksisite, bilişsel bozulma, psikotik semptomlar ve nörotoksisite oluşturabilmektedir. Ayrıca suç ve/veya trafik kazalarının artması gibi sosyal sorunlara da yol açabilmektedir [12], [13]. Uyuşturucu kullanımını tespit etmek için, metamfetaminin tayini, çeşitli biyolojik numunelerde gerçekleştirilebilmektedir. İdrar ve serum sıklıkla tercih edilen matrikslerdir [14], [15]. Metamfetamin, öncelikle karaciğerde metabolize edilmekte ve normal pH değeri olan 6–8'de herhangi bir değişiklik olmaksızın idrarla %37-54 oranında dışarı atılmaktadır [16], [17].

Kromatografik yöntemler, biyolojik numunelerdeki kötüye kullanılan maddelerin analizi ve doğrulanması için klinik toksikoloji ve adli uygulamalarda

kullanılmaktadır [18]. Metamfetamin ve ilgili bileşikler için tipik tayinler, uygun bir dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) [19]–[21] ve gaz kromatografi (GC) [22] ile gerçekleştirilmektedir.

Fenilüre herbisitler, meyve, sebze ve mahsullerde, demiryolu hatlarında/yollarda yabani ot kontrolü için yaygın olarak kullanılan ve yapısında aromatik grup ile amin grupları bulunduran pestisitlerdir [23]–[25]. Tarımsal verimi arttırmak için sıklıkla kullanılan fenilüre herbisitler, toprağın, yüzey/yeraltı sularının ve tarım ürünlerinin kalitesini doğrudan ve/veya dolaylı olarak bozmaktadır ve zararlı yan etkileri nedeniyle insan sağlığını ve ekosistemi olumsuz yönde etkilemektedir [25], [26]. Fenilüre herbisitler, suda yüksek çözünürlüğe ve yüksek kararlılığa sahiptir [27], [28]. Bu nedenle, sudaki bozunmaları oldukça yavaştır ve yüzey/yeraltı suları ile topraktaki yarı ömürleri birkaç ay hatta yıllara ulaşabilmektedir [23], [29]. Böylece topraklarda ve/veya sularda biyolojik çeşitliliği azaltarak, ciddi toprak ve su kirliliği oluşturabilecek kalıntıların birikmesine neden olmaktadırlar [30]. Toksisiteleri ve kanserojen özellikleri nedeniyle , Avrupa Birliği yönetmeliklerine göre içme suyunda fenilüre herbisitlerin izin verilen kabul edilebilir limiti 0,1 ng/mL ʻdir [24].

Çeşitli fenilüre herbisitler arasından fenuron, odunsu bitkiler ile geniş yapraklı yabani otlara uygulanan bir pestisittir ve yabani otların fotosentetik sürecini engelleyerek işlev görmektedirler. Ayrıca spesifik olarak bezelye, pirinç, fasulye, mısır, ıspanak, şeker pancarı ve diğer bazı meyveler için kullanılmaktadırlar [27], [31], [32]. Fenuron, mikrobiyal bozunmaya karşı dirençlidir ve kolayca parçalanmamaktadır, bu nedenle çevrede son derece kalıcıdır. Uzun ömürleri nedeniyle yüzey/yeraltı sularına akış yoluyla ulaşan bir kirletici olarak bulunabilmektedirler [33]. Florlu bir bileşik olan fenuron, kanserojenite, endokrin sistemin bozulması, hepatotoksisite ve immünotoksisite gibi bazı toksik etkilere neden olur ve yaygın kullanımı ciddi çevre sorunlarına sebebiyet vermektedir [34]. Suda geri kazanılabilen en yaygın pestisit kalıntıları, genellikle yabani otların kontrolünde kullanılan fenilüre ailesinde yer alan herbisitlerdir [35]. Gaz kromatografi [36]–[38] ve yüksek performanslı sıvı kromatografi [39]–[41] kullanımı çoğunluk olmak üzere fenilüre herbisitlerin belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Uygulanan analitik yöntemlere rağmen doğrudan analiz, düşük duyarlılık ve düşük seçiciliğe sebebiyet veren kompleks ortamlar (saç, idrar, serum gibi çeşitli biyolojik matriksler ve atık sular) nedeniyle mümkün olmadığından, uyarıcı maddelerin ve fenilüre herbisitlerin eser düzeyde tayinini sağlayabilmek amacıyla numune hazırlama aşaması önemlidir [42]–[44]. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE) ve katı faz ekstraksiyonu (KFE), sulu veya biyolojik numunelerden çeşitli uyarıcı maddelerin ve fenilüre herbisitlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan ön deriştirme yöntemleridir [45]–[47]. Geleneksel katı faz ekstraksiyonu (KFE), sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE) ile kıyaslandığında, ekstraksiyon için kullanılan organik çözücü miktarını büyük ölçüde azaltmaktadır, ancak verimli ekstraksiyon elde etmek için ekstraksiyon birkaç saat sürebilmektedir [44]. Son yıllarda, büyük hacimlerde toksik organik çözücülerin kullanımını ve ekstraksiyon sırasındaki zaman kayıplarını azaltmak adına, yeşil kimyayı temel alan ve birkaç saniye içinde verimli ekstraksiyona zemin hazırlayan çevre dostu sıvı faz mikroekstraksiyon ve katı faz mikroekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir [48], [49].

Analitin ilgili cihaz ile doğrudan tayininin yapılamadığı durumlarda analiti daha uygun kimyasal forma sahip kararlı bileşiklere dönüştüren türevlendirme yöntemleri kullanılmaktadır [50]. Örneğin, GC ile tayin sırasında, analitin, düşük polarite, uçuculuk ve termal kararlılık gibi sahip olması gereken bazı özellikler vardır. Türevlendirme işlemi ile hedef analitin, enjektörde ve/veya kolonda bozunması önlenerek termal olarak kararlı bileşiklere dönüşümü sağlanmaktadır. Analitin polaritesinin ve reaktivitesinin azalması ve/veya uçuculuğunun artması üzerinde de etkilidir [51], [52].

Numune hazırlama prosedüründeki herhangi bir hata sonuçların doğruluğunu ve kesinliğini etkileyebilmektedir [53]. İzotop Seyreltme (İS) yöntemi, numune hazırlama sırasında oluşan analit kayıplarından ya da enstrümental hatalardan etkilenmemektedir ve daha doğru/kesin analitik sonuçlar sağlamaktadır [54].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin ana amacı, kompleks matrikslerdeki uyarıcı ve/veya toksik organik moleküller için tayin yöntemlerinin geliştirilmesidir. GC-MS sistemi ile biyolojik ve çevresel matrikslerde, seçilen analitlerin (metamfetamin ve fenuron) eser

seviyede tayini için yeşil kimyaya uygun olarak doğru, duyarlı, hızlı ve ekonomik analitik stratejiler geliştirilmiştir. Hedef analitlerin kompleks matriks ortamlarından ekstraksiyonu/ön deriştirilmesi için sprey destekli damlacık oluşturma esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon (SD-DO-SFME) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen mikroekstraksiyon yöntemi ile, toksik çözücü tüketimini azaltan çevre dostu bir yaklaşım amaçlanmıştır. Hedef analit ayrıca, gaz kromatografi ile tayinini mümkün kılan yapısal özelliklere sahip olmayabilir veya analiz sırasında, kuyruklanma oluşumunu en aza indiren daha iyi kromatografik sinyaller arzulanabilir. Çalışmalarda, hassasiyeti, kromatografik ayrımı ve seçiciliği iyileştirmek amacıyla ilgili analiti kromatografik tayini için daha uygun bir forma dönüştüren türevlendirme işlemi uygulanmıştır. Matriks etkilerini ortadan kaldırmak/azaltmak amacıyla izotop seyreltme stratejisi ve matriks eşleştirme kalibrasyon stratejisi kullanılarak doğruluk ve kesinlik iyileştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek farklı biyolojik ve çevre örneklerine doğru bir şekilde uygulanabilecekleri belirlenmiştir.

1.3 Hipotez

Metamfetamin ve fenuron çok düşük seviyelerde bile insan sağlığı ve çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olan toksik bileşiklerdir ve bu sebeple eser seviyelerde belirlenmesi son derece önemlidir.

Karmaşık matrikslerdeki toksik maddelerin tespiti nispeten zordur ve düşük analit derişimlerinde tayinleri güç hale gelmektedir. Bu nedenle daha yüksek verimlilik ve daha iyi duyarlılığa sahip mikroekstraksiyon stratejilerine odaklanılmalıdır. Çeşitli matrikslerdeki zararlı maddeleri tespit etmeye yönelik analitik yöntemler arasında yaygın olarak uygun bir dedektörlü kromatografik sistemler yer almaktadır. Örnek hacmine göre küçük hacimli ekstraksiyon fazının kullanımını içeren mikroekstraksiyon yöntemi, bu çalışmada, analitlerin tespit limitlerini düşürmek ve GC-MS ile eser seviyelerde analitlerin tayinlerini sağlamak için uygulanmıştır. Tez çalışmaları boyunca sprey destekli damlacık oluşumu esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Son yıllarda, gereksiz toksik reaktif kullanımını azaltma eğilimi oluşmuştur. Bu amaçla, dağıtıcı çözücüler kullanmayan, çevre dostu yöntemler geliştirilmiş ve diğer sıvı faz

mikroekstraksiyon yöntemlerinin dezavantajlarının üstesinden gelinmiştir. SD-DO-SFME yönteminde, ekstraksiyon çözücüsü, bir püskürtme aparatı yardımıyla örnek çözeltisinin içerisine püskürtülmektedir. Böylece dağıtıcı çözücü kullanımından kaçınılmış olunur. Önerilen yöntemlerin uygulanabilirliği, çevresel ve biyolojik örneklerde (idrar, serum, atık su) test edilmiştir. Matriks etkilerinin üstesinden gelmek için matriks eşleştirme kalibrasyon yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, idrar ve serum örneklerinde metamfetamin tayini için doğruluk, kesinlik ve geri kazanım sonuçlarını iyileştirmek amacıyla dörtlü izotop seyreltme kütle spektrometrisi (IS^4MS) uygulanmıştır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Metamfetamin

2.1.1 Tarihsel Süreç

Soğuk algınlığı ve astım tedavisinde kullanılan ve efedrin ile psödoefedrin içeren Efedra Vulgaris (ma huang) geleneksel Çin tıbbında 5000 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır [55]. Rinit, bronşiyal astım tedavisi ve merkezi sinir sistemi uyarıcısı olarak kullanılan ve efedra bitkisinin tıbbi bir bileşeni olan efedrin, aktif bir alkaloidtir ve 1885 yılında efedradan ekstrakte edilerek incelenmiştir. Daha sonralarda oluşan sentetik efedrin arayışı, efedrinin modifikasyonuyla üretilen amfetamin türevi uyarıcıların geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır [56], [57]. Amfetamin sentezi ilk olarak 1887'de Almanya'da gerçekleştirilmiş ve ardından 6 yıl sonra metamfetamin, Japon bilim adamı Nagai Nagayoshi tarafından 1893 yılında efedrinden sentezlenmiştir. 1919'da Akira Ogata, kırmızı fosfor ve iyot kullanarak efedrini indirgemiş ve kristalize metamfetamini sentezlemiştir. Böylece ilacın daha büyük ölçekte üretilmesi için temel oluşturularak, oral amfetamin tipi uyarıcı ilaçların kullanılmasına zemin hazırlanmıştır [55], [58]. Metamfetamin tabletleri ilk olarak, 1940 yılında, Methedrine ticari adı altında Burroughs Wellcome Company tarafından piyasaya sunulmuş ve 1950–1960 yıllarında hızla popüler bir ilaç haline gelerek depresyon, obezite tedavisi için sıklıkla reçete edilmiştir. Ayrıca, bağımlılık riski olmaksızın etkili ve güvenli oldukları varsayımıyla tanıtılmışlardır [57], [59]. Metamfetamin uyanıklığı arttırdığı için kamyon şoförleri ve ordular tarafından da kullanılmıştır. Almanya'da Doktor Fritz Hauschild tarafından 'Pervitin' ve Japonya'da Dai-Nippon Şirketi tarafından 'Philopon' adlarıyla geliştirilen metamfetamin, İkinci Dünya Savaşı sırasında askerlerin uyanıklığını artırmak, yorgunluğu azaltmak ve iştahını bastırmak için kullanılmıştır. Ayrıca, Nazi Almanya'sında 1940'a kadar Pervitin, Nazi Hava Kuvvetleri asker ve pilotlarına çikolata ile karıştırılarak barlar halinde verilmiştir. 1936 Berlin Olimpiyatları'nda sporcuların performanslarını arttırmak için kullanıldığı da bilinmektedir [60]–[62]. Metamfetamin kullanımı, 1967'de Amerika Birleşik Devletleri'nde 31 milyon reçeteyle zirveye ulaşmış ve

1971'de ABD yasaları tarafından kısıtlanarak kullanım oranları düşürülmüştür. Ancak metamfetamin, hala Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan yasadışı bir uyuşturucu olmaya devam etmektedir. Günümüzde obezite ve hiperaktivite bozukluklarının tedavisinde ikinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır [58], [63], [64].

2.1.2 Formları ve Kullanım Şekilleri

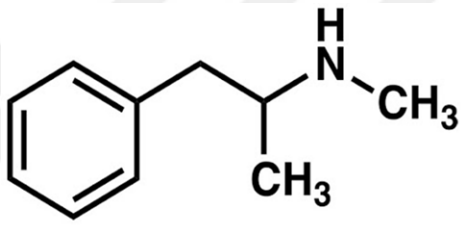
Metamfetaminin en yaygın formu 'buz' olarakta bilinen berrak kristal formudur. Toz, sıvı, tablet veya kapsül şeklindeki formlarda da bulunmaktadır ve sokak adları krank, hız, kristal veya buz şeklindedir [65]–[67]. Metamfetamin, oral yoldan alma, intranazal (burundan çekme), buhar inhalasyonu (sigara) ve intravenöz (enjeksiyon) dahil olmak üzere farklı uygulama yöntemlerine sahiptir [68]. İntravenöz yolla metamfetamin kullanımı, oral veya nazal kullanıma nazaran kullanıcılar üzerindeki etkiyi arttırmaktadır ve kullanıcılarda kan yoluyla bulaşan virüslere (HIV) rastlamak olası bir risktir. Metamfetaminin yüksek sıcaklıklarda buharlaşabilme özelliği onu sigara için uygun hale getirmektedir. Sigara şeklindeki kullanımı diğer uygulama yollarına göre daha büyük bir bağımlılık riski taşımasına rağmen ilk kez kullananlar arasında enjeksiyondan daha güvenli, daha temiz ve sosyal bir ortamda paylaşılması daha kolay olarak görüldüğünden sıklıkla tercih edilen bir uygulama yoludur. E-sigaralar da giderek popüler hale gelen uygulama yolları arasındadır. Cihaz bir atomizer içerir ve ilaç malzemesi burada buharlaşmaktadır [65], [69], [70]. En yüksek saflığa sahip olan kristal metamfetamin sigara veya enjeksiyon yoluyla uygulanabilir ve etkileri neredeyse anında başlamaktadır [71], [72]. Düşük saflıktaki metamfetamin tozu 'speed' olarak adlandırılır ve rengi üretim sürecinde kullanılan reaktiflere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Genellikle beyaz, kahverengi, sarı, pembe renkleri gözlemlenmektedir [73].

2.1.3 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

IUPAC adı N-metil-1-fenil-propan-2-amin olan ve N-metilamfetamin, fenilizopropilmetilamin, desoksiefedrin isimleriyle de bilinen metamfetamin, psikoaktif ilaçların amfetamin sınıfından bir psikostimülandır [74], [75]. Kimyasal formülü $C_{10}H_{15}N$ ve moleküler kütlesi 149,24 g/mol'dür. 214 °C

kaynama noktasına ve 172 °C ila 174 °C arasında bir erime noktası aralığına sahiptir. Etanolde çözünürlüğü yüksektir ve su, etil asetat ve diğer organik çözücülerde çözünürlüğü düşüktür [74], [76]. Metamfetamin oda sıcaklığında sıvı olduğundan genellikle 170-175 °C erime noktasına sahip hidroklorür tuzu ($C_{10}H_{16}ClN$, 185,74 g/mol) şeklinde tedarik edilir ve kullanılır. Hidroklorür tuzu, renksiz bir kristaldir ve 300–305 °C'de piroliz olmaksızın uçucu hale gelmektedir [74], [75]. Metamfetaminin moleküler yapısı Şekil 2.1'de görülmektedir [74].

Metamfetamin bir stereo merkeze sahiptir. (S)-enantiyomerlerinin uyarıcı etkisi, (R)-enantiyomerlerinden 3-4 kat daha fazladır ve daha uzun bir etki süresi gösterir. Amerika Birleşik Devletleri'nde karşılaşılan yasadışı metamfetamin, genel olarak bir enantiyomerik karışım olarak bulunmaktadır [9], [77].



Şekil 2.1 Metamfetaminin moleküler yapısı [74]

2.1.4 Farmakokinetik Özelliği

Farklı uygulama yolları, metamfetaminin etki süresini ve büyüklüğünü etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, metamfetaminin oral yoldan alımının biyoyararlanımının %67 olduğu görülmüş ve uygulamadan kaynaklanan etkilerin ortaya çıkması nispeten yavaştır (2-3 saat) [78]. İntranazal yoldan alınan metamfetaminin biyoyararlanımı % 79'dur [65], [79]. İntravenöz uygulama yüksek absorpsiyon ile %100 biyoyararlanım göstermektedir ve hem intranazal hem de intravenöz uygulama, yaklaşık 15 dakika içinde en yüksek etkiyle sonuçlanmaktadır. Sigara şeklindeki kullanımı %67 ila %90 biyoyararlanımı arasında değişmektedir. Sigara olarak içilmeye başlanmasından 15-20 dakika içinde pik etkileri ortaya çıkmaktadır [78], [80]. Bununla birlikte, pik plazma derişimi seviyelerine sigara içtikten 2,5 saat sonra ulaşılmaktadır [79] .

İnsanlarda metamfetaminin yarı ömrü, yaklaşık 11 saattir [65]. Metamfetamin dozunun çoğu değişmeden 24 saat içinde idarla atılmaktadır. İçeriğin %30-50'sini

metamfetamin oluştururken, azalan yüzdelerde 4-hidroksimetamfetamin ile amfetamin takip etmektedir [80]. İdrarın pH'ına göre eliminasyon süresi değişmektedir, ancak idrar asidik olduğunda daha hızlıdır [65]. Bu sebeple, idrarın amonyum klorür ile asitleştirilmesiyle metamfetaminin idrarla atılımı hızlandırılabilmektedir [78].

2.1.5 İnsan Üzerine Etkileri

İnsanlar, iyi hissetmek, enerjiyi, sosyalliği, uyanıklığı, cinsel uyarılmayı artırmak ve açlığı azaltmak, stresi veya yorgunluğunu gidermek gibi çeşitli nedenlerle metamfetamin kullanmaktadır. Metamfetamin, beyindeki dopamin seviyelerinin 600 katına çıkmasına neden olan bir dopaminerjik uyarıcıdır ve dopamindeki bu artış, yorgunluk ve uykusuzluk belirtilerinin ortaya çıkmasını geciktirmekte ve aşırı enerjili bir duruma neden olmaktadır. Metamfetaminin artan kullanımı, işsizlik, eşitsizlik ve üretkensizlik gibi kişiye endişe veren sosyal sıkıntılara da bağlı olabilmektedir [81], [82]. Ancak metamfetaminin hem akut hem de kronik ciddi toksik etkileri vardır ve eğlence amaçlı kullanılan orta dozda bile fiziksel ya da psikiyatrik sorunlara yol açmaktadır [83]. Dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olan kronik metamfetaminin kötüye kullanımı, psikoz semptomları, saldırganlık, hafıza bozukluklarının yanı sıra depresyon, paranoya, şiddet, anksiyete ve uyuşturucuya aşerme gibi yoksunluk semptomlarına neden olabilmektedir [5], [84]. Metamfetamin kullanıcılarında görülen en yaygın psikiyatrik problemlerden biri anksiyetedir ve semptomları genellikle yoksunluk sırasında ortaya çıkmaktadır [85].

Metamfetamin kullanımının akut fizyolojik etkileri çoktur ve dozuna bağlıdır. Tipik etkiler, iştah azalması, kalp çarpıntısı, nabız ve kan basıncının artması, göz bebeği genişlemesi, vücut ısısının artması ve kısa vadeli iyileşmeleri içermektedir. Yüksek dozda ve sık kullanımda, kalıcı hasarlar oluşabilmektedir [86]. Çeşitli merkezi sinir sistemi bozukluklarına, nörotransmitter salınımı ve oksidatif stres gibi anormal sinirsel işlevlere ya da kan-beyin bariyerinin geçirgenliğindeki artışa bağlı beyin hücre hasarına veya ölümüne neden olan beyin ödemine rastlanabilmektedir [87]. Akut ve kronik böbrek hasarı, karaciğer ve akciğer fonksiyon bozuklukları diğer kalıcı hasarlara örnektir [88], [89]. Metamfetamin kullanımının, kardiyovasküler sisteme de ciddi zarar verdiği ve

kardiyotoksisitesini arttırdığı gözlenmiştir. Bir kardiyoprotektif ajan olan melusin, kalbin normal ritmini, kasılmasını düzenlemede ve normal kalp fonksiyonunun korunmasında rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda metamfetaminin, melusini azalttığı ve böylece kalbin morfolojisinin ve işlevselliğinin bozularak normal işlevlerini sürdüremediği tespit edilmiştir [90]. Metamfetaminin aşırı kilo vermeye bağlı gastrointestinal sistem üzerindeki etkileri ise, cilt altı yüz yağının tükenmesine ve böylece kişinin kendi kronolojik yaşından daha yaşlı gözükmesine neden olmaktadır [82]. Kötü ağız sağlığı ve diş çürüklerine de sebep olduğu bilinmektedir [91]. Sürekli ve sık kullanımında ise, Hepatit C ve HIV gibi bulaşıcı hastalıkların bulaşma riskinin artması, Parkinson hastalığı, felç ve hatta ölümle sonuçlanabilmektedir [72], [92].

2.1.6 Analizde Kullanılan Biyolojik Materyaller

Analitik toksikolojide uyuşturucu/uyarıcı ve diğer kötüye kullanılan ilaç etken maddelerinin tayininde kan serumu, kan plazması, tam kan ve idrar gibi geleneksel matrikslerinin yanı sıra ter, saç, tırnak, tükürük, anne sütü, nefes, mide sıvısı ve beyin omurilik sıvısı gibi alternatif matriksler de kullanılmaktadır. Biyolojik matriksler karmaşıktır ve lipid, protein, amonyak, üre, tuz, asit ve bazların da dahil olduğu çeşitli organik ve inorganik maddeleri içermektedirler [93], [94]. Bu çalışmada biyolojik örnek olarak idrar ve kan serumu ile çalışılmıştır.

2.1.6.1 İdrar

1980'lerden beri idrar, adli toksikolojik analizlerde tercih edilen bir biyolojik örnektir [95]. İdrarın %95'den fazlası sudan oluşmaktadır ve amonyak, üre, kreatin, sodyum, fosfat, sülfat, proteinler ve böbrek tarafından işlenen diğer ürünleri içermektedir [94].

Metamfetamin ve metabolitlerinin idrarda birikmesi yüksek derişimlerle sonuçlandığından genellikle idrar analizi ile değerlendirilmektedirler [96]. 24 saatlik bir süre içinde, uygulanan metamfetamin dozunun yaklaşık %43'ü olduğu gibi idrarla değişmeden atılmaktadır [97]. İdrar, kanın aksine, daha düşük miktarlarda protein ve lipidler içerdiğinden ön analizleri ve numune hazırlığı

nispeten kolaydır [96]. İdrarın geniş pH aralığı, ilaçların atılımını etkilemektedir. Metamfetamin, asidik idrarda daha verimli bir şekilde atılmaktadır [65].

İlaçların uygulama yolları da maddenin idrardan atılımını etkilemektedir. Enjeksiyon ya da sigara yoluyla alınan ilacın emilimi neredeyse anında gerçekleşmektedir. İdrarla atılım hemen başlamaktadır. Oral yoldan alındığında ise emilim yavaştır ve idrarla atılımı daha uzun sürmektedir [98]. İdrarda kötüye kullanılan ilaçların tespit süreleri, kanda gözlenenden daha uzundur. Metamfetamin kullanımından sonra 2-3 gün boyunca idrarda tespit edilebilmektedir [65], [99]. Bazı madde kullanıcıları, idrar testleri sırasında, kullandıkları uyuşturucu/uyarıcı madde seviyelerinin eşik derişimin altında çıkması amacıyla bolca bitki çayı veya su tüketebilmektedir. Bu nedenle, idrar testlerinin yanında ilaç/kreatin oranının analizi de yapılmalıdır. Kreatin, idrarla atılan bir proteindir ve idrardaki 1 günlük çıkışı sabittir. Genellikle, insanlarda, idrarda salgılanan kreatin derişimi 20 mg/dL değerini aşmaktadır. Aşırı su alımı ile, 20 mg/dL 'nin altında kreatin derişimi içeren idrar örnekleri üretilebilir ve bu örnekler idrar seyreltme girişimine yönelik kanıt sağlamaktadır [98].

2.1.6.2 Kan Serumu

Kan sıvısının yaklaşık %92'si sudan oluşmaktadır ve protein, lipid, glikoz, hormonlar, mineraller, karbondioksit, kırmızı ve beyaz kan hücreleri ve trombositleri içermektedir. Genellikle toksikolojik analizlerde tam kan yerine serum kullanılmaktadır. Serum, pıhtılaşmış kandan elde edilmektedir ve kandan ayrılması çok önemlidir. Soğutmalı santrifüjleme, serumu alyuvarlardan ayırma da kullanılan yaygın bir yoldur. Kan hücreleri ve pıhtılaşma sırasında oluşan fibrin pıhtıları, santrifüj ile serumdan ayrılmaktadır. Ancak, bu işlem sırasında proteinler ve metabolitler serumda kalmaktadır [94]. Serum içeriğindeki lipidler ve proteinler, kromatogramlarda aşırı gürültü yaratarak veri yorumlamasını olanaksız kılabilir ya da ekipman ve cihazların ömrünü kısaltabilmektedir. Bu nedenle, önceden bir numune hazırlama prosedürüne ve protein çökeltmesi ile sonuçlanacak ekstraksiyonlara ihtiyaç vardır [100].

2.2 Pestisitler

Pestisitler, bitki büyüme sürecinde, çeşitli haşere ve mantar zararlılarını önlemek ya da kontrol altına almak, tarımsal ürünlerin kalitesini arttırmak için üretilen ve tarımda yaygın olarak uygulanmakla birlikte karayolları ve demiryollarında, evlerde, özel bahçelerde, üzüm bağlarında ve/veya bazı kamusal alanlarda kullanılan kimyasal maddelerdir [33], [101]–[104]. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA)'na göre, herhangi bir zararlıyı önlemek, yok etmek, uzaklaştırmak veya azaltmak amacıyla kullanılabilen herhangi bir madde veya madde karışımı pestisitler sınıfına girmektedir [105].

2.2.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Doğada biyolojik olarak parçalanabilen ve memeliler için toksik olmayan doğal pestisitler, bitki gibi doğal kaynaklardan izole edilmektedir. Sentetik pestisitler ise doğada oldukça kararlıdır ve kimyasal bileşiklerin modifikasyonu ile oluşan insan yapımı ilaçlardır [106].

Pestisitler öncelikle kimyasal yapı, hedef organizma ve hedef zararlıya giriş moduna göre farklı sınıflara ayrılmaktadırlar. Topraktaki kalıcılıkları, buharlaşma davranışları, toksisiteleri diğer sınıflandırmalara örnektir [105], [107].

Kimyasal sınıfa göre pestisitler, organoklorlu, organofosforlu, karbamat ve piretroid pestisitler olmak üzere oldukça toksik özellik gösteren dört ana kategoriden oluşmaktadır [108]. Daha düşük toksisiteye sahip amid, anilin, neonikotinoid ve triazin pestisitleri diğer alt gruplardan bazılarıdır [109]–[111]. Genellikle tarım sektöründe bakterisit ve böcek öldürücü etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılan organoklorlu pestisitler, çevrede yüksek kalıcılığa, düşük biyobozunurluğa ve yüksek toksisiteye sahiptir [112], [113]. Bir karbon atomuna kovalent olarak bağlanmış en az bir klor atomu içeren organoklorin bileşikleri, ilk olarak diklorodifeniltrikloroetan (DDT) formunda sivrisineklerin ve diğer hastalık vektörlerinin kontrolü için kullanılmıştır [114]. Sebze, meyve, tahıl ve pamuk tarımında yaygın olarak kullanılan organofosforlu pestisitler, düşük kalıcılık, düşük maliyet ve yüksek etkinlik gibi özellikleri nedeniyle dünyada en yaygın kullanılan pestisitlerdir ve büyük ölçüde organoklorlu pestisitlerin yerini almıştır [115]–[118]. Ancak, dozuna ve maruz kalma sıklığına bağlı olarak belirgin kanserojen, teratojenik, mutajenik, genotoksik ve sitotoksik etkiler

gösterebilmektedir [119], [120]. Karbamatlar, organoklorlu ve organofosforlu pestisitlere kıyasla daha düşük toksisiteleri nedeniyle, özellikle pirinç, pamuk, tahıllar ve çok çeşitli meyve ve sebzeler dahil olmak üzere, tarım uygulamalarında patojenik hastalıkları önlemek, tedavi etmek ve kontrol altına almak için yaygın olarak kullanılmaktadır [121]–[124]. Yapı olarak organofosfora benzemektedirler, ancak doğal ortamda bozunmaları kolaydır [125]. Piretroid pestisitler, düşük toksisite, düşük kalıntı seviyesi, yüksek verimlilik ve kolay parçalanabilirlik gibi avantajlarıyla, özellikle 1980 yılında organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin yasaklanmasından sonra, geniş çapta kabul görmüştür ve tarım, ormancılık ve balıkçılık üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır [126], [127].

Pestisitler, hedef organizmaya göre herbisit, insektisit, fungisit, algisit, rodentisit, nematisit, larvisit, akarisit gibi isimlerle de sınıflandırılabilmektedir [107], [128]–[131]. Çeşitli böcekleri, beyazsinekleri, yaprak bitlerini kontrol etmek için insektisitler [132], patojenik mantarların neden olduğu zararları önlemek için fungisitler [133], omurgalı haşere kontrolü için rodentisitler [134] kullanılmaktadır. Nematisitler, yüksek verimlilikleri ve düşük maliyetleri nedeniyle nematod kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır [135]. Larvisit, sıtma gibi birçok hastalığın yayılmasından sorumlu olan sivrisineklerin larvalarını henüz olgunluğa ermeden yok eden ve yetişkin sivrisineklerin üremesini kontrol altına alan sentetik bir ilaçtır [136]. Herbisitler ise su, güneş ışığı ve toprak mineralleri için bitki ile rekabet ederek ürünlerin verimini azaltan, hastalık ya da diğer zararlıları taşıyan yabani otları ortadan kaldırmak ve çevrenin biyolojik çeşitliliğinin kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılmaktadır [137]–[139]. Sülfonilüre ve fenilüre herbisitler, dünya çapında en yaygın olarak kullanılan iki grup herbisittir. Sülfonilüreler, gıda mahsullerinin ve sebzelerin büyümesine engel olan çimen gibi bitkilerin kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir herbisit ailesidir [140]. Aromatik ve amin gruplarını içeren fenilüre herbisitler ise, geniş yapraklı yabani otların kontrolsüz yayılışını engellemek ve tahıl, meyve ve sebze gibi farklı mahsullerin korunmasını sağlamak için kullanılmaktadır [141], [142]. Suda geri kazanılabilen en yaygın herbisit kalıntıları, genellikle yabancı ot kontrolü için kullanılan fenilüre ailesinden gelen herbisitlerdir [35].

2.2.2 İzin Verilen Pestisit Limitleri

Küresel pestisit kullanımının büyük ölçüde artmasıyla beraber, tüketilen gıdalarda pestisit kalıntılarına tehlikeli seviyelerde maruz kalma potansiyeli büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle pestisit kalıntılarının neden olduğu sağlık tehlikelerini en aza indirmek ve tüketici güvenliğini sağlamak amacıyla birçok ülke ve uluslararası kuruluşlar tarafından Maksimum Kalıntı Seviyeleri (MRL) ve Kabul Edilebilir Günlük Alım (ADI) gibi limitler oluşturulmuştur [143]–[145]. Maksimum Kalıntı Limiti, bir gıda maddesinde yasal olarak tolere edilebilen en yüksek pestisit kalıntısı derişimidir ve 'mg/kg' cinsinden ifade edilmektedir. Maksimum Kalıntı Limiti'nin üzerindeki kalıntı değerleri ise, İyi Tarım Uygulamaları'nın (İTU) ihlal edildiğini göstermektedir [146]. Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri meyveler, sebzeler, tahıllar, tohumlar, et, süt ürünleri ve hayvan yemleri dahil olmak üzere yüzlerce tarımsal ürün için Avrupa Birliği (AB) ve Codex Alimentarius gibi kuruluşlar tarafından geçerli gıda standartları belirlenerek düzenlenmiştir [143], [147]. Kabul Edilebilir Günlük Alım Limiti, insan sağlığına kayda değer bir risk oluşturmadan bir ömür boyu tüketilebilen bir pestisitin maruz kalma seviyesi olarak kabul edilmektedir [148]. Ancak bu değerlendirmede akut toksik etkiler dikkate alınmamaktadır. Bu amaçla belirli bir kimyasal için bir Akut Referans Doz (ARfD) ihtiyacının varlığına ilişkin çeşitli kılavuz belgeler üretilmiştir. ARfD, tüketici için önemli bir sağlık riski oluşturmadan 24 saat veya daha kısa bir süre içinde tüketilebilen gıda ve/veya içme suyundaki bir maddenin tahmini miktarıdır (JMPR, 2002) [149], [150]. AB Yönergeleri, herhangi bir pestisitin içme suyunda bulunabilecek maksimum kalıntı derişimi 0,1 µg/L, mevcut tüm pestisitlerin toplam derişimini 0,5 µg/L olarak belirlemiştir [151], [152]. Topraktaki kabul edilebilir pestisit derişimi ise Avrupa Birliği (AB) tarafından, 0,005 mg/kg veya daha az olarak kabul edilmektedir [153].

2.2.3 Pestisitin Olumsuz Etkileri

Kimyasal pestisitlere maruz kalma flora, fauna ve çevre için son derece yıkıcı etkilere sebebiyet verebilmektedir [154]. Farklı etkileri göz önünde bulunduruldunda pestisitlerin eser seviyelerde yüksek doğrulukta tayinleri ve tespit edilen pestisitlere yönelik önlemler alınması büyük önem taşımaktadır.

2.2.3.1 Çevre

Verimliliği artırmak için, özellikle tarımda, yaygın olarak kullanılan pestisitlerin sadece %0,1'inden daha azı hedef zararlılara ulaşırken, %99,9'undan fazlası çevreye taşınmaktadır [155]–[157]. Böcekleri veya yabani otları öldürmeye ek olarak, pestisitler kuşlar, balıklar, faydalı böcekler ve hedef olmayan bitkiler gibi diğer canlılar için zehirli olabilir. Böcek öldürücüler genellikle en yoğun zehirli böcek ilacı türüdür, ancak herbisitler hedef olmayan canlılar için de tehlike oluşturabilmektedir [154].

Fenilüre herbisitler, kalıcılıkları, toksisiteleri ve kanserojenik özellikleri nedeniyle çevrenin, toprağın ve dolayısıyla meyve, sebze, hayvansal gıda maddelerinin doğrudan veya dolaylı yoldan kirlenmesine, yüzey ile yer altı sularının ise sürüklenme, akış, drenaj ya da sızıntı yoluyla kontamine olmasına neden olmaktadır [25], [154], [156], [158], [159]. Fenilüre herbisitler, suda oldukça çözünür bileşiklerdir ve bozunma süreçleri çok yavaştır [160]. Aşırı kullanımları toprakta, suda ve dolayısıyla ekinlerde toksik seviyelerde kalıntı oluşturmaktadır. Bu biriken kalıntılar ekosistemi kirleterek çevresel tehlikelere yol açmaktadır [161]–[166] .

Çevre koşullarına bağlı olarak, fenilüre kalıntıları, sıcaklık ve ortam pH değerine göre toprak bazlı uygulamalarında birkaç ay kalabilir ve yer altı sularına ulaşabilirken, yeraltı sularında günlerden haftalara kadar değişen sürelerde kalabilmektedirler [167], [168]. Herbisitler atmosferde ve toprakta dağılabilir, ancak tarlalara uygulandıktan sonra yıkanma, çökelme ve/veya sızma yoluyla nehirlere, göllere, okyanuslara ve yer altı sularına ulaşabildikleri için su ortamları bu bileşiklerin nihai rezervuarlarıdır [169]. Balıklar, herbisitlerin neden olduğu su ortamlarının kirlenmesinden etkilenen birçok organizma arasındadır ve dermal yol (deri yoluyla doğrudan emilim), solunum yolu (nefes yoluyla solungaçlar yoluyla alım) ve oral yol (kirli su içerek alım) olmak üzere herbisitlere 3 şekilde maruz kalabilmektedir [154]. Su bitkilerinin herbisit kullanımı ile öldürülmesi nedeniyle oksijen seviyesi hızla düşmektedir [154]. Bu durum da balık ve kabuklu deniz ürünleri türleri dahil olmak üzere birçok suda yaşayan organizma için yüksek risk taşımaktadır [170]–[172].

2.2.3.2 İnsan Sağlığı

Su yaşamı ve insan sağlığı için potansiyel bir tehlike olan fenilüre herbisitler ve bunların bozunma ürünleri en tehlikeli organik kirleticilerden biri haline gelerek bitki, hayvan ve insan sağlığı açısından ekotoksik ya da genotoksik etkilere sebebiyet vermektedir [173]–[176]. Yeraltı sularında herbisit kalıntılarının bulunması, içme suyu tüketicilerinin sağlığı için de ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca, topraktan ekinlere kolayca göç ederek çevresel birikim ve besin zinciri yoluyla hayvan ve insan vücuduna giren herbisitler, yine sağlık açısından potansiyel riskler getirmektedir [177]–[180].

Pestisitlerin neden olduğu olumsuz sağlık etkileri arasında kanser en ölümcül hastalıktır [181]. Çocukluk çağı lösemisi ve beyin kanseri evde ve/veya bahçede pestisit kullanımı ile ilişkilendirilmiştir [182]. Bazı pestisitlere sürekli maruz kalma nedeniyle prostat kanseri [183], [184], meme kanseri [185], [186], akciğer kanseri [187], kolon kanseri [188], pankreas kanseri [189], mide kanseri [190] , kolorektal kanser [191] ve karaciğer kanseri [192] risklerinin arttığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Pestisitlerin kanserojen özellikleri, yaş, cinsiyet, bireysel duyarlılık, maruz kalma miktarı, süresi ve diğer kansere neden olan kimyasallarla eş zamanlı temas gibi birçok faktörden etkilenmektedir [193].

Parkinson [194], [195], Alzheimer [196], üreme bozuklukları [197], [198], doğum kusurları [199], [200], diyabet [201], [202], oksidatif stres [203], kardiyovasküler hastalıklar [204], kronik böbrek hastalığı [205] ve solunum yolu hastalıkları [206] pestisit maruziyeti ile ilişkilendirilen diğer olumsuz sağlık etkilerindendir.

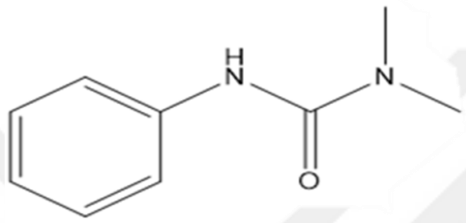
2.2.4 Fenuron

Fenuron, geniş yapraklı yabani otlara ve odunsu bitkilere uygulanan bir fenilüre herbisittir . Spesifik olarak pamuk, pırasa, pirinç, fasulye, soğan, ıspanak, şeker pancarı, bezelye, mısır, patates, havuç, buğday, arpa ve diğer bazı meyvelerde yabani otları önlemek ve kontrol altına almak için kullanılır [27], [31], [207]–[209].

Fenuron (1,1-Dimetil-3-fenilüre), renksiz ve neredeyse kokusuz bir kimyasaldır [210]. $C_9H_{12}N_2O$ kimyasal formülüne ve 164,21 g/mol moleküler kütlesine sahiptir [211]. Fenurona ait moleküler yapı Şekil 2.3'te görülmektedir. Erime

noktası 133 °C'dir [210]. Sudaki çözünürlüğü, 25 °C' de, 3850 mg/L' dir [212]. Çevresel olarak kalıcı olan fenuron, yüzey ve yer altı sularını kirleten mikrobiyal bozunmaya karşı dirençlidir ve kolayca parçalanamamaktadır. Çevredeki uzun ömrü nedeniyle yüzey sularında toksin olarak bulunabilmektedir [213].

Fenuron, insanlarda solunum yollarını, cildi ve gözleri tahriş etmektedir. Diğer ciddi toksisite biçimleri arasında mide bulantısı, kusma, karın ağrıları ve ishal yer almaktadır ve bazen yüksek miktarda alım nedeniyle methemoglobinemi oluşabilmektedir [27], [210].



Şekil 2.2 Fenurona ait moleküler yapı [214]

2.3 Toksik ve Uyarıcı Organik Moleküllerin Tayin Yöntemleri

Yasal veya yasadışı maddeler, kirleticiler vb. gibi çok sayıda molekülün tayini için yüksek ayırma kapasitesi nedeniyle uygun bir dedektör ile birleştirilmiş kromatografik prosedürler kabul görmektedir [215]. Biyolojik numunelerdeki psikoaktif maddelerin analizi, immünolojik testler ve/veya kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. En yaygın tarama yöntemlerinden biri olan immünoanalizler ilaçların saptanmasında yetersiz kalabilmektedir ve bu doğrultuda duyarlılık, seçicilik ve doğruluk açısından daha üstün olan kromatografik yöntemler vazgeçilmezdir [18], [216].

Fenilüre herbisitler için doğru/hassas bir kalitatif veya kantitatif tayin, yine, uygun dedektörlü kromatografik yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir [217].

2.3.1 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kalitatif ve kantitatif analiz için bir karışımın bileşenlerinin ayrılmasını, tanımlanmasını ve saflaştırılmasını içeren analitik bir tekniktir ve

durağan fazın (sabit faz) hareketli bir faz yardımıyla hareket ederken karışım halindeki moleküllerin birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır [218].

Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması temel olarak hareketli ve sabit faz türüne, analitlerin hareketli ve sabit faz arasındaki etkileşimlerine göre yapılmaktadır. Tablo 2.1, üç genel kromatografi kategorisini göstermektedir. Analitler, tüm kromatografik yöntemlerde hareketli fazlar içinde çözündürülmekte ve bir kolon veya katı üzerine tutturulmuş bir durağan fazdan geçmeye zorlanmaktadır. Hareketli fazlar, gaz, sıvı veya süper kritik akışkan olabilmektedir. Sonuçta, hareketli faz içerisinde çözündürülmüş analitler durağan faz üzerinde farklı migrasyon hızlarıyla sürüklenip hareket ederek birbirinden ayrılmaktadır [219]. 'Benzer benzeri çözer' ilkesinin kromatografinin temel prensibi olduğu söylenebilir. Polar olmayan analitler, polar olmayan durağan faza yüksek oranda tutunmaktadır ve bunun tersi de geçerlidir [220].

Tablo 2.1 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [219]

Genel Sınıflandırma	**Yöntem**	**Durağan Faz**	**Denge Türü**
1. Gaz Kromatografi (GC)	a.Gaz-Sıvı Kromatografi	Katı yüzeye tutunmuş sıvı	Gaz-Sıvı (dağılım)
	b.Gaz-Katı Kromatografi	Katı	Adsorpsiyon
2. Sıvı Kromatografi (LC)	a. Sıvı-Sıvı (dağılım)	Katı yüzeye tutunmuş sıvı	Karışmayan sıvılar arasındaki etkileşim/dağılım
	b. Sıvı-Katı/Adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	c. İyon Değişim	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	d. Boyut Eleme	Polimerik katının boşluklarındaki sıvı	Dağılım/Eleme
	e.Afinite	Katı yüzeye tutunmuş sıvı	Dağılım

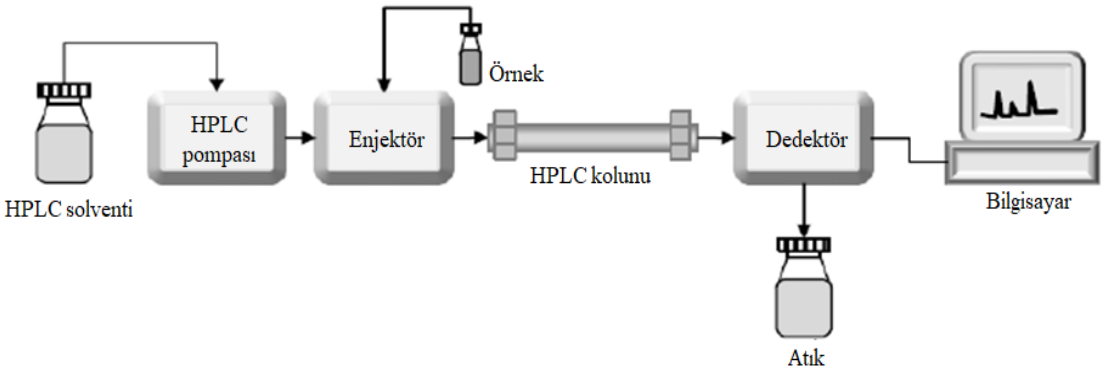
Tablo 2.1 Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (devamı) [219]

3. Süperkritik Akışkan Kromatografisi (SFC)	-	Katı yüzeye bağlanmış organik moleküller	Dağılım

2.3.1.1 Sıvı Kromatografi (LC)

Sıvı kromatografi, bitkideki pigmentleri ayırmak için ilk kez Rus-İtalyan botanikçi M. Tswett tarafından kullanılmıştır [219], [221]. "Klasik kolon kromatografisi" olarak bilinen ve 1900'lerin başında bildirilen ilk sıvı kromatografisinden (LC) bu yana, LC sistemlerinin gelişimi sürekli olarak devam etmektedir. Klasik kolon kromatografisi, 1930'larda yerini kağıt kromatografisine bırakırken, 1960'ların sonlarından itibaren yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ilişkilendirilmektedir [222] ve tıbbi kimya, gıda ve çevre analizi, adli ve toksikolojik bilimler, biyomedikal gibi çok çeşitli araştırma alanlarında kullanılmaktadır [223].

Sıvı kromatografi sistemleri temel olarak, hareketli fazı depolamak için hareketli faz şişesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve dataların eldesi için bilgisayar parçalarından oluşmaktadır [224]. Bu parçalar Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Sistemde, pompalanan çözücüler (hareketli faz) numuneyi alır ve kolona (sabit faz) enjekte eder. Tipik olarak bir LC kolonu, kovalent bağlı hidrofobik alkil zincirleri ile kaplanmış gözenekli parçacıklarla doldurulmuştur [225]. Numunedeki bileşenler, hareketli ve sabit faz ile değişen derecelerde etkileşime girmektedir ve böylece kolondan farklı zaman noktalarında ayrılarak mobil faz yardımıyla dedektöre taşınıp burada tespit edilmektedirler [222], [226].



Şekil 2.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin şematik diyagramı [227]

LC sistemlerinde pompalar, hareketli fazın bileşimini istenilen debi ile kolondan geçirmek için kullanılmaktadır. Pompalar, kolon boyunca sabit ve sürekli bir mobil faz akışı sağlamalıdır ve bu akış, ardışık analiz için kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır [222]. LC'de kullanılan iki tip enjektör, şırınga ve valf enjektörleridir. Geleneksel HPLC enjeksiyon sistemlerinde, çoğunlukla çelik ya da polietereterketon (PEEK) içeren farklı örnek hacimlerine sahip valf enjektörleri kullanılmaktadır [222], [228].

Analit ile kolon arasındaki etkileşimler, durağan fazın türüne göre değişmektedir. Silikajel gibi bir polar durağan faz seçildiğinde, analitler hidrojen bağı, π–π veya dipol-dipol etkileşimleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Normal faz sıvı kromatografisi olarak adlandırılan bu kromatografik teknikte durağan faz hareketli fazdan daha polardır ve hareketli fazlar çoğunlukla n-heksan, n-heptan, diklorometan, dikloroetan, dietil eter, metil asetat veya etil asetat gibi apolar çözücülerdir. Diğer bir kromatografik teknik olan ters faz sıvı kromatografisinde ise, durağan faz hareketli fazdan daha az polardır ve mobil fazlar çoğunlukla su, asetonitril, metanol ve izopropanol gibi polar çözücülerdir. Analit ile sabit faz arasındaki etkileşim ağırlıklı olarak hidrofobik (apolar) bir karaktere sahiptir [229]. Oktadesil karbon zinciri (C18) bağlı silika, C8 ve C30 en sık kullanılan durağan fazlardır [230].

Ayırma işleminden sonra her bileşenin çıkışa ulaştığı zaman ve o bileşenin miktarı dedektör ile belirlenmektedir. Dedektörler, ayrıştırılan bileşenlere duyarlı

olmalı, mobil faz bileşimindeki analitlerin varlığını izlemeli, sıcaklıktaki değişikliklerden etkilenmemeli, eser seviyedeki analitleri saptamalı ve hızlı olmalıdır [222]. UV, floresans, kırılma indisi ve elektrokimyasal dedektörler ve kütle spektrometresi (MS) sistemleri LC sistemlerine yaygınlıkla entegre edilmektedir [222], [231]–[233].

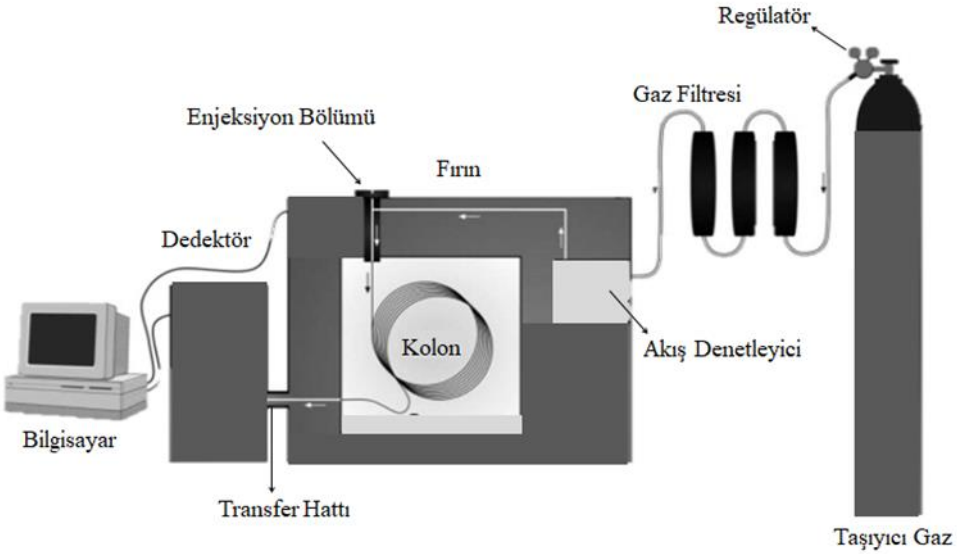
2.3.1.2 Gaz Kromatografi (GC)

Modern gaz kromatografisi, 1952'de Martin ve James tarafından icat edilmiştir [234] ve günümüzde sanayinin çeşitli dallarında, ilaçta, çevre kirliliğinin kontrolünde, adli tıp, biyokimya vb. birçok alanda ön plana çıkmaktadır [235]. Esas olarak uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin analizinde kullanılan [236] gaz kromatografi, örnekteki bileşenleri hem uçuculuğa hem de durağan faz ile etkileşime dayalı olarak ayıran ve genellikle uzun cam, erimiş silika veya metal borudan yapılmış bir kolon içinden gaz akışını kullanan bir ayırma tekniğidir [237], [238].

GC ile analiz için bileşiklerin nispeten yüksek bir buhar basıncına sahip olması gerekir. Doğal formlarında tayin edilemeyen bileşiklerin yeterince uçucu, daha az polar ve/veya termal olarak daha kararlı hale getirilmesi için türevlendirme işlemi uygulanabilmektedir [239]. Ayrılmanın gerçekleşmesi için, GC kolonunun durağan bir faz içermesi gerekir. Durağan faz, katı veya sıvı olabilir. Sabit fazın çalışma sıcaklığında katı veya sıvı olmasına bağlı olarak GC, gaz-katı kromatografisi veya gaz-sıvı kromatografisi olarak sınıflandırılmaktadır. Gaz-katı kromatografisinin ayırma mekanizması esas olarak adsorpsiyondur [239] ve kimyasalların destek yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Bu destek genellikle silika veya alümina gibi inorganik bir malzemedir [240]. Gaz-katı kromatografi, inorganik gazları ve düşük kaynama noktalı hidrokarbonları ayırmak için uygundur [241]. Gaz-sıvı kromatografisinde ise, bileşiğin tutunması, gaz hareketli faz ile sıvı durağan faz arasındaki çözünen etkileşimin sonucudur [242]. Gaz-sıvı kromatografisinin kullanımı, gaz-katı kromatografiye göre çok daha yaygındır [239].

Gaz kromatografi sistemi (Şekil 2.5) genel olarak, taşıyıcı gaz, basınç kontrolörü, enjeksiyon bölümü, kolon, fırın, dedektör ve bilgi işlem sistemi bileşenlerinden

oluşmaktadır [243]. Ana prensip, numunenin özel bir ısıtmalı haznede buharlaştırılması, ardından numunede bulunan bileşenlerin ayrılması ve daha sonra bir dedektör kullanılarak saptanmasıdır [244].



Şekil 2.4 Gaz Kromatografi (GC) sisteminin şematik diyagramı [243]

- **Taşıyıcı Gaz**

GC sistemlerinde kullanılan taşıyıcı gaz, helyum, azot, argon veya hidrojen gibi inert bir gazdır ve kolon girişine bir madde karışımı enjekte edildiğinde, her bileşeni dedektöre doğru taşıyarak hareketli faz görevi görmektedir [238], [245]. Su, oksijen, hidrokarbonlar ve partiküllü maddeler gibi taşıyıcı gaz safsızlıkları kolona zarar verebilmekte ve/veya bazı dedektörlerin performansını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu tür problemlerden kaçınmak ve safsızlıkları uzaklaştırmak için genellikle moleküler elek yatakları ve özel hat içi tuzaklar kullanılmaktadır. Ayrıca, taşıyıcı gaz kuru olmalı ve gaz kaynağını GC sistemine bağlamak için kullanılan boru tesisatı kirlenmemiş olmalıdır [240]. Gaz akışını hassas bir şekilde kontrol etmek için bir basınç kontrolörü/akış ölçer de gerekmektedir [246]. Sabit akış oranları sağlamak için kullanılan sistemler, iyi kolon verimini korumayı ve tekrarlanabilir elüsyon süreleri elde etmeyi amaçlamaktadır [240]. Taşıyıcı gaz akış hızının büyüklüğü, kullanılan kolon tipine bağlıdır. Dolgulu kolonlar, 10 ila 60 mL/dk arasında değişen tipik akış hızları gerektirir iken, kılcal kolonlar çok daha düşük akış hızları kullanmaktadır [240].

- **Enjeksiyon Bölümü**

Enjektör portu, bileşiklerin buharlaştırıldığı ve inert bir taşıyıcı gaz akışıyla kolona doğru ilerlemesinin sağlandığı bir cam astar içeren sıcak bir haznedir. Bu hazne, örneği enjekte etmek için bir şırınganın iğnesi ile delinmiş bir kauçuk veya mikro-mühür septum ile kapatılmaktadır [247], [248]. En yaygın enjektörler split/splitless'tır. Split enjeksiyonda numune buharının yalnızca küçük bir kısmı kolona girmekte ve geri kalan kısmı ise atık olarak dışarı atılmaktadır. Split enjeksiyon, konsantre sıvı numuneleri için kullanılır. Splitless enjeksiyonda numune buharının neredeyse tamamı enjektör ağzından kolona aktarılmaktadır [238]. Eser seviyedeki bileşiklerin kantitatif analizi için genellikle splitless enjeksiyon modu kullanılmaktadır [249].

- **Kolon**

GC sistemi kolonları, kullandıkları desteğin türüne göre dolgulu kolonlar ve kılcal (açık boru şekilli) kolonlar olmak üzere iki ana kategoriden oluşmaktadır. Dolgulu bir kolon genellikle 1–2 metre uzunluğunda, birkaç milimetre çapında, yüksek molekül ağırlıklı bir polimerin ince bir tabakası ile kaplanmış ve küçük parçacıklarla doldurulmuş sert bir metal veya cam kolondur. Klinik testlerde kullanılanlar da dahil olmak üzere GC'nin çoğu analitik uygulamasında kılcal kolonlar kullanılmaktadır. Kılcal kolonlar genellikle 10 ila 100 metre arasında değişen uzunluklara, 0,1-0,75 mm iç çapa, iç yüzeyine kaplanmış veya yapıştırılmış durağan bir faza sahiptir ve dış tarafı poliimid gibi bir polimer ile daha iyi güç ve esneklik sağlamak üzere kaplanmıştır [250]. En yaygın olarak erimiş silika kapilerler kullanılmaktadır ancak yüksek sıcaklık gerektiren (>400 °C) uygulamalar için paslanmaz çelik kolonlar da mevcuttur [251]. Bir kılcal kolondaki durağan faz miktarı, tipik olarak 0,1−5 μm olan film kalınlığı ile gösterilmektedir. Analitlerin kolonda kalma süresi, kılcal kolonlarda film kalınlığı ile orantılıdır, film kalınlığı arttıkça tutma artar ve film kalınlığı azaldıkça azalır. Kılcal kolonların avantajı, çok yüksek ayırma kapasiteleridir [215].

- **Fırın**

GC sistemi kolonları, sıcaklık programlama yeteneğine sahip bir fırın içinde yer almaktadır. Fırının sıcaklığı, analiz boyunca stabil tutulabilir (izotermal analiz) veya bir sıcaklık programı aracılığıyla hassas bir şekilde arttırılabilmektedir. Fırın sıcaklığı, numunelerin önemli bir buhar basıncına sahip olması için yeterince yüksek ve kolayca değiştirilebilir olmalıdır. Sıcaklığın düşmesi elüsyon süresinin uzamasına ve dolayısıyla analiz zamanının artmasına yol açmaktadır. Uçucu bileşenlerin yeterli şekilde tutulmasına izin veren düşük bir sıcaklık, daha az uçucu bileşenler için bant genişlemesine neden olur. Tersine, daha yüksek kaynama noktalı bileşikler için gereken yüksek bir sıcaklık bu analitler için uygun alıkonma sürelerini ve pik şekillerini sağlarken, diğer bileşenler yeterince tutulmaz ve muhtemelen birbirinden ayrılamaz. Bu sorunun çözümü, sıcaklık programlamasıdır. Kaynama aralığı geniş olan örneklerde kolon sıcaklığı ayırma işlemi ile paralel olarak artar; artış sürekli veya kademeler şeklindedir [243].

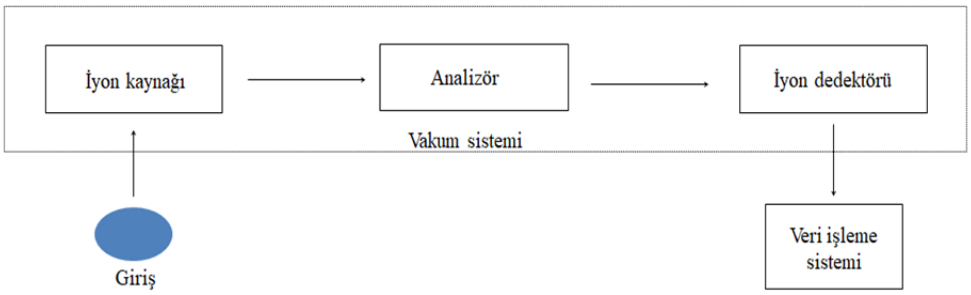
- **Dedektör**

Organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde GC çeşitli dedektörler ile entegre edilmektedir. İdeal bir dedektör, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, doğrusallık, oda sıcaklığında en az 400 °C'a ulaşan bir sıcaklık aralığı, yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı, numuneyi tahrip etmeme gibi özelliklere sahip olmalıdır [219], [252]. Alev iyonizasyon dedektörü (FID), düşük algılama limitleri, geniş doğrusal aralığı, satın alınabilirliği ve güvenilirliği nedeniyle en yaygın kullanılan dedektörlerden biridir [253], [254]. Alev iyonizasyon dedektörleri, gazların elektriksel iletkenliğinin ölçülmesine dayanmaktadır [255]. Numune, bir pompalama hareketiyle dedektöre getirilerek alevde yakılmaktadır. Alev genellikle hidrojen ve hava ile oluşturulur. Kimyasal bir bileşik yandığında iyonlar ve elektronlar üretmektedir. Bu elektronlar, birkaç yüz voltluk bir potansiyel farkının uygulandığı iki elektrot arasına yerleştirilmiştir. Sonuç olarak, yeni üretilen iyonlar kaydedilebilen bir akım üretir. Akımın yoğunluğu dedektörde bulunan analitlerin (iyonların) miktarı ile doğru orantılıdır [256]. Alev iyonizasyon dedektörleri, çoğunlukla karbon ve hidrojen içeren tüm bileşiklere karşı duyarlıdır. Bununla birlikte, hava, su, karbon dioksit, amonyak, hidrojen sülfit, kükürt dioksit vb. bileşiklerine karşı duyarlılığı çok azdır [238]. Bu

bileşiklere duyarsızlık, yangın kalıntıları analizleri için bir avantajdır [256]. Diğer bir dedektör çeşidi olan azot fosfor dedektörü (NPD), alev ucu ile toplayıcı arasına bir alkali metal tuz kaynağı (genellikle rubidyum) yerleştirilmesi dışında FID ile aynıdır ve nitrojen ve/veya fosfor atomları içeren bileşiklere karşı seçicidir [257], [258]. Elektron yakalama dedektörü (ECD), halojen, nitro grubu veya karbonil grubu içeren yüksek elektron afinitesine sahip bileşiklere karşı oldukça duyarlı olan seçici bir dedektördür ve birbirine paralel iki elektrot ve taşıyıcı gazı iyonize etmek için katoda yakın yerleştirilmiş, genellikle ^{63}Ni olan bir β-yayıcısından oluşan küçük bir hazneden oluşmaktadır [219], [254], [259]. Elektrotlara uygulanan bir potansiyel, sabit bir akım üretmektedir. Halojenli bileşikler gibi güçlü elektron ilgisine sahip bileşikler, azaltılmış bir akımı kaydetmek için elektronları yakalamaktadır [259]. Termal İletkenlik Dedektörü (TCD), konsantrasyona duyarlı bir detektördür ve akan gazda analit moleküllerinin varlığı ile oluşan termal iletkenlik değişimlerini temel almaktadır [219]. Düşük moleküler ağırlıklı ve yüksek termal iletkenliğe sahip taşıyıcı gazlar, dedektör yanıtını en üst düzeye çıkarmak ve geniş bir doğrusal aralık sağlamak için gereklidir [260]. Helyum ve hidrojen genellikle taşıyıcı gazlar olarak kullanılmaktadır. Hidrojen, helyumdan önemli ölçüde daha yüksek bir termal iletkenliğe sahiptir, ancak potansiyel patlayıcı özelliğe sahip olduğu için genellikle seçilmemektedir [261], [262]. Örnek bileşenlerin çoğu hidrojen veya helyumun çok altında termal iletkenliğe sahiptir [262], böylece termal iletkenlik dedektörleri hemen hemen tüm maddelere cevap vermektedir [263], [264]. Termal iletkenlik dedektörünün bir dezavantajı, taşıyıcı gazdaki safsızlıklara, kolondan sabit faz sızıntısına ve/veya GC sistemine sızan havaya tepki vermesidir [250].

Kütle spektrometrisi (MS), peptitlerin, proteinlerin, karbonhidratların, oligonükleotitlerin, doğal ürünlerin ve ilaç metabolitlerinin moleküler ağırlıkları, kimyasal yapıları hakkında bilgi almak için yaygın olarak kullanılmaktadır ve numune moleküllerinin gaz fazında iyonlaşmasına, ardından elde edilen iyonların kütle/yük oranına (m/z) göre ayrılarak saptanmasına dayanmaktadır [265], [266]. Numune molekülleri, ürün iyonları verecek şekilde parçalanmaktadır ve sonuçlar, kütle/yük oranına karşı iyon bolluğunun grafiksel bir temsili olan bir kütle spektrumu biçiminde görüntülenmektedir. Kütle spektrumundan elde edilebilen bilgiler, örnek molekülün moleküler kütlesini ve/veya molekülün yapısını

belirlemek için kullanılabilen fragmanlarının kütlelerini içermektedir ve kütle spektrumuna dayalı olarak numuneyi kesin olarak tanımlamakta mümkündür [266]. Bir kütle spektrometresi temelde, iyon kaynağı, kütle analizörü, iyon dedektörü ve sinyal işleyiciden oluşmaktadır [267].



Şekil 2.5 Bir kütle spektrometrenin blok diyagramı [219]

- **İyon Kaynağı**

İyon kaynağı, gaz halindeki nötr molekülleri iyonlara dönüştüren ya da katı veya sıvı bir matriksten zaten var olan iyonları çıkaran bir cihazdır [268]. Moleküler kütle spektrometrede birçok farklı tip iyonlaştırıcı geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan kaynaklar Tablo 2.2'de görülmektedir. En eskisi ve halen kullanımda olan elektron etki (EI) kaynağıdır. Bu kaynakta, moleküller yüksek enerjili elektron demetiyle bombardıman edilmektedir ve sonucunda pozitif iyonlar, negatif iyonlar ve nötr yükler oluşmaktadır [269]. Pozitif iyonlar elektrostatik itme gücüyle analizöre doğru yönlendirilmektedir [219]. En çok kullanılan ikinci bir yöntem ise, kimyasal iyonizasyon (CI)'dur. Kimyasal iyonizasyonda, ilgili bileşiklerin iyonizasyon işlemine yardımcı olmak için bir reaktif gaz kullanılmaktadır ve yaygın olarak kullanılan tipik reaktif gazlar amonyak, metan ve izobutendir [270]. Reaktif gazı, numuneden önemli ölçüde daha yüksek derişimlerde bulunduğundan, numune moleküllerinin iyonlaşması, reaktif gaz iyonları ile reaksiyonlar yoluyla gerçekleşmektedir ve numune molekülünün doğasına bağlı olarak, iyonlaşma reaksiyonları proton transferini içermektedir [266]. Süreç elektron etki iyonlaştırma kaynağına kıyasla daha az enerjiktir ve genellikle daha az parçalanma ürünü üretmektedir. Bu nedenle kimyasal iyonlaşma bir "yumuşak iyonlaşma" olarak kabul edilmektedir [270], [271]. GC-

MS sistemlerinde sadece elektron etki ve kimyasal iyonlaşma kullanılabilmektedir [219].

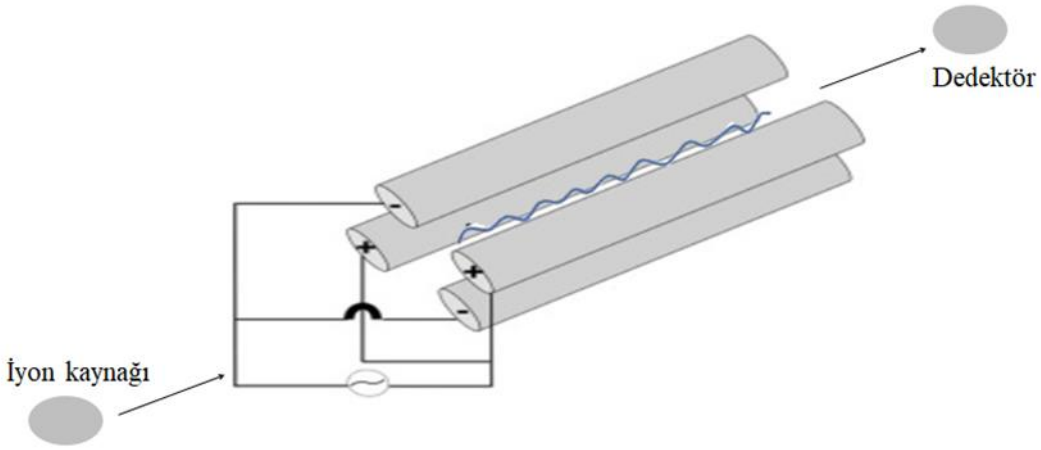
Tablo 2.2 Kütle spektrometri için iyon kaynakları [219]

Tipi	Adı ve Kısa Gösterimi	İyonlaştırma Yöntemi	Spektrum Tipi
Gaz Fazı	Elektron impakt (EI)	Yüksek enerjili elektronlar	Parçalanma
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Gaz halde reaktif iyonlar	Proton katılmalar
Desorpsiyon	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Yüksek enerjili atom demetleri	Moleküler iyonlar
	Matriks yardımlı lazer desorpsiyonu (MALDI)	Yüksek enerjili fotonlar	Moleküler iyonlar ve çok yüklü iyonlar
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Elektrik alanda iyonlaşmış bir sprey oluşturup çözücü buharlaştırma	Çok yüklü moleküler iyonlar

- **Kütle Analizörü**

Kütle analizörleri, iyonları m/z değerine göre ayırmaktadır. En sık kullanılan analizörler Tablo 2.3'de gösterilmiştir. GC-MS için en yaygın olarak kullanılan analizörler kuadrupol ve iyon tuzağıdır [219]. Kuadrupol (dört kutuplu kütle analizör), dairesel veya hiperbolik enine kesite sahip dört paralel çubuk içermektedir [272]. Çubuklar, radyo frekansı (RF) ve doğru akım (DC) jeneratörlerine bağlıdır ve bitişik çubuklar, zıt RF fazındadır (Şekil 2.7). Belirli bir radyo frekansı ve doğru akım potansiyelinde yalnızca dar bir m/z aralığındaki iyonlar dedektöre ulaşmaktadır, diğer tüm iyonlar çubuklara çarparak nötralize edilmekte ve kararsız bir yörüngeye sahiptirler [273]. Enstrüman duyarlılığı, farklı m/z oranındaki tüm iyonların dedektöre her zaman ulaşmadığı tam tarama modunda daha düşüktür. Seçiciliği ve hassasiyeti artırmak için tek bir m/z

iyonunun sürekli tespiti gerçekleştirilebilir; bu, seçili iyon izleme (SIM) olarak tanımlanmaktadır [274].



Şekil 2.6 Kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı [272]

Bir iyon tuzağı kütle analizörü, iyonları iyon tuzağı içinde yörüngesel bir hareketle yakalamaktadır [274] ve elektrik veya manyetik alanların bir kombinasyonunu kullanır. Paul iyon tuzağı (3D iyon tuzağı), doğrusal iyon tuzağı (2D tuzak), elektrostatik tuzak (orbitrap) veya manyetik alan tabanlı tuzak (iyon siklotron rezonans) dahil olmak üzere birden fazla iyon tuzağı konfigürasyonu vardır [275]. Paul iyon tuzağı kütle analizörleri, kuadrupol kütle analizörüne benzer bir prensipte çalışmaktadır. Ancak filtre görevi görmez; iyonlar sonraki deneyler ve analizler için saklanmaktadır [269]. Tipik bir Paul iyon tuzağı, tamamı hiperbolik veya yarı küresel enine kesite sahip iki uç başlıklı elektrot ve bir halka elektrottan oluşmaktadır [272].

Tablo 2.3 Kütle spektrometri için yaygın kütle analizörleri [219]

Tipi	Analiz İlkesi
Manyetik sektör	Manyetik alanda iyonların sapması. (İyonun yörüngesi m/z değerine bağlıdır.)
Çift odaklama	Manyetik alanda sapma sonrası elektrostatik odaklama. (Yörüngeler m/z değerine bağlıdır.)
Kuadrupol	DC ve radyo frekans alanlarında iyon hareketi. (Sadece belirli m/z değerindeki iyonlar geçmektedir.)
İyon tuzağı	Halka ve uç şapka biçimli elektrotlarla sınırlanan bir alanda iyonların depolanması. (Elektrik alanı, artan m/z değerine göre buraya sevk etmektedir.)
İyon siklotron rezonans	Bir tuzaklama voltajı ve manyetik alan yardımıyla iyonların kübik bir hücrede tuzaklanması. (İyonların yörüngede dönme frekansı m/z değeri ile ters orantılıdır.)
Uçuş zamanlı	Eşit kinetik enerjili iyonlar birikme tüpüne girmektedir. Birikme hızı ve dedektöre ulaşma zamanı kütleye bağlıdır.

- **Dedektör**

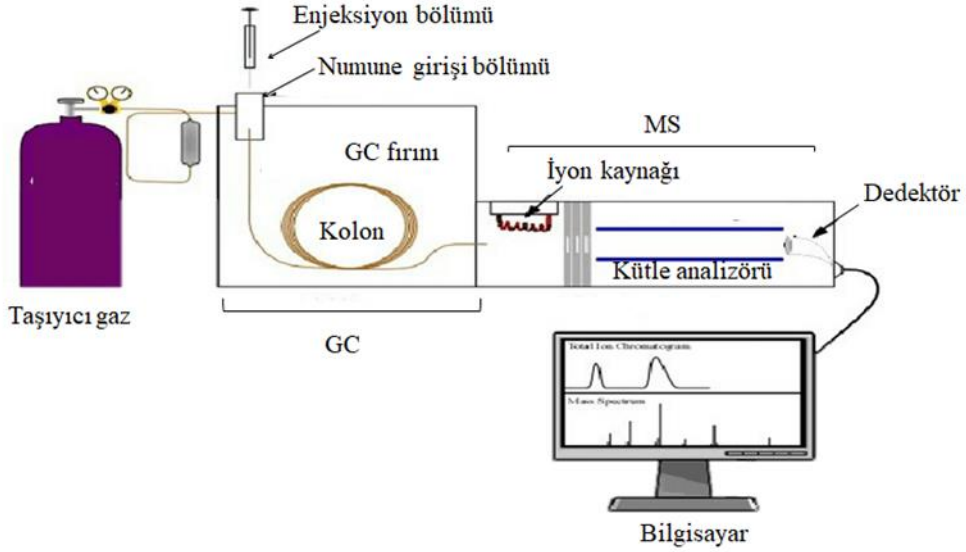
Kütle spektrometrisindeki en yaygın dedektör elektron çoğaltıcıdır ve ayrılan iyonlar burada tespit edilmektedir. Bir elektron çoğaltıcı dedektörünün görevi, yüklü parçaları elektronlara dönüştürmek ve kurulan elektrik akımını sinyal olarak kaydetmek üzere veri işlemcisine aktarmaktır. Yüklü parçacıklar dedektöre girip yüzeye çarptığında elektronlar yayılmaktadır. Elektronların yüzeye çarparak bir elektriksel potansiyel farkıyla hızlanmasından sonra yeni elektronlar oluşmaktadır ve bu, kademeli olarak artan elektron sayısından oluşan bir süreçtir [276]. Elektron çoğaltıcı dedektörler, zayıf iyon ışını sinyalini büyük ölçüde yükselterek 10^6 mertebesine kadar kazanç sağlamaktadır [272]. Faraday dedektörü veya Faraday kabı diğer bir iyon dedektörü çeşididir. Bir Faraday kabı (FC), yüklü parçacıkları vakumda yakalamak için tasarlanmış iletken bir kaptır [277]. FC'den geçen elektrik akımı doğrudan, gelen yüklü parçacık demeti akımına bağlıdır [278]. Faraday kabından geçen akımın ölçülmesindeki en önemli zorluk, ikincil elektronların, iyonlar bu yüzeylere çarptığında cihazın iç metal

yüzeylerinden fırlayabilmesidir. Kaçan elektronlar, bu metal yüzeylere bağlı bir elektrometreye pozitif akım olarak görünecektir [278], [279].

2.3.1.3 Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS), özellikle biyolojik matrikslerde eser seviyedeki organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayini için en popüler enstrümantal analiz yöntemlerinden biridir [280]. GC-MS'de (Şekil 2.8), bir karışımın bileşenleri gaz kromatografide ayrılır ve kütle spektrometresinde tanımlanır. Bir GC' nin birincil bileşeni, bir fırının içinde muhafaza edilen dar çaplı bir kolondur. En basit düzenlemede, karışım ısıtılmış giriş kısmında buharlaştırılır ve taşıyıcı gaz tarafından kolona süpürülür. Karışımın bileşenleri kolon üzerinde uçuculuklarına ve taşıyıcı gaza karşı kolon malzemesi üzerinde bulunmaya olan nispi yakınlıklarına göre ayrılmaktadır. İdeal durumda, tüm bileşenler ayrılır ve birer birer kütle spektrometresine verilir. Düşük akış hızlarında, kolon çıkışı doğrudan kütle spektrometresine verilebilir. Daha yüksek akış hızlarında, GC, kütle spektrometresinin akış gereksinimlerini karşılamak için, genellikle taşıyıcı gazı seçici olarak uzaklaştıran bir arayüz gerektirmektedir [281].

GC-MS yalnızca uçucu, termal olarak kararlı ve aynı zamanda gaz kromatografisinin sert ayrıştırma koşullarına da dayanabilen analitler ile sınırlıdır. Bu sınırlamaya rağmen, yalnızca GC-MS ile karmaşık karışımlardan ayrılabilen ve tanımlanabilen birçok analit vardır. 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda sadece gaz fazında bulunan bileşikler, GC/MS dışındaki teknikler kullanılarak ayrılamaz ve iyonize edilemez. Ayrıca, doğal formlarında GC-MS için uygun olmayan pek çok bileşiğin kararlı, uçucu türevlerini oluşturma yeteneği nedeniyle, olası analitlerin sayısı önemli ölçüde arttırılabilmektedir [282]. GC-MS'in en yaygın uygulamalarından biri, klinik veya adli tıp amaçlı uyuşturucu testidir. Birçok ilacın nispeten düşük moleküler ağırlığı, polar olmayan ve/veya uçucu özellikleri vardır, bu da bu bileşikleri GC-MS ile tayin için uygun hale getirmektedir [283]. GC–MS, gıda analizlerinde de kullanılmaktadır. Gıda analizlerindeki en yaygın uygulamaları, pestisitler, çevresel kirleticiler , doğal toksinler ve ambalaj malzemeleri gibi gıda kirletici maddelerin tespiti ve eser düzeydeki miktarlarının belirlenmesidir [284].



Şekil 2.7 GC-MS şematik diyagramı [285]

2.4 Numune Hazırlama Teknikleri

Numune hazırlama, analitlerin kesin olarak tanımlanması, doğrulanması ve miktarının belirlenmesi için kritik öneme sahiptir ve ilgili bileşiklerin matriksten izolasyonunu ve/veya ön deriştirilmesini içermektedir [286]. Çoğu kalitatif/kantitatif tayinde, biyolojik sıvı, gıda numuneleri, çevresel numuneler, farmasötik müstahzarlar gibi farklı özelliklere sahip ve birçok bileşiği aynı anda içeren karmaşık matrikslerin kullanılması, doğrudan analizi neredeyse imkansız hale getirmektedir [287], [288]. Matrikslerin karmaşıklığı, düşük hedef analit derişimi, izlenmesi gereken geniş bileşik yelpazesi, girişim oluşturabilecek maddelerinin varlığı ve müteakip enstrümantal cihazlar ile uyumsuzluk gibi nedenlerle analiz sürecini zorlaştıran etmenleri ortadan kaldırmak amacıyla uygulanan numune hazırlama teknikleri, analitin ön konsantre hale getirilmesi, düşük tespit limitlerine ulaşılması, matriksteki interferantların etkisinin ortadan kaldırılması, doğruluk ve seçiciliğin arttırılması gibi birçok avantajlar sağlamaktadır. Genel analitik prosedürün yaklaşık üçte ikisini oluşturmaktadır [153], [289]–[291]. İdeal bir numune hazırlama tekniği basit, hızlı, seçici, yüksek verimli, tekrarlanabilir, çevre dostu, düşük maliyetli ve otomasyona uygun olmalıdır. Aynı zamanda, hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikler için, sulu ortamdan eş zamanlı ayırma ve önderiştirmeye izin vermelidir [292]. Yaygın numune hazırlama teknikleri arasında filtrasyon, kompleksleştirme, santrifüjleme,

buharlaştırma ve ekstraksiyon yer almaktadır [293]. Literatürde bu amaçla, biyolojik, gıda, çevresel vb. geniş çalışma alanlarındaki çeşitli numuneler için birçok entegre ve sürdürülebilir ekstraksiyon tekniği geliştirilmiştir [294].

2.4.1 Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, hem organik hem de inorganik analitlerin ayrılması ve ön deriştirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ekstraksiyon, hidrofobiklik, buhar basıncı, çözünürlük, moleküler ağırlık ve asit ayrışması olmak üzere beş temel kimyasal özelliğe dayanmaktadır ve bir ekstraksiyon çözücüsü olarak katı, sıvı, gaz veya bir süperkritik akışkan kullanılabilmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SSE) ve katı faz ekstraksiyonu (KFE), geleneksel ekstraksiyon yöntemleridir ve modern ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi için temel teşkil etmektedirler [295].

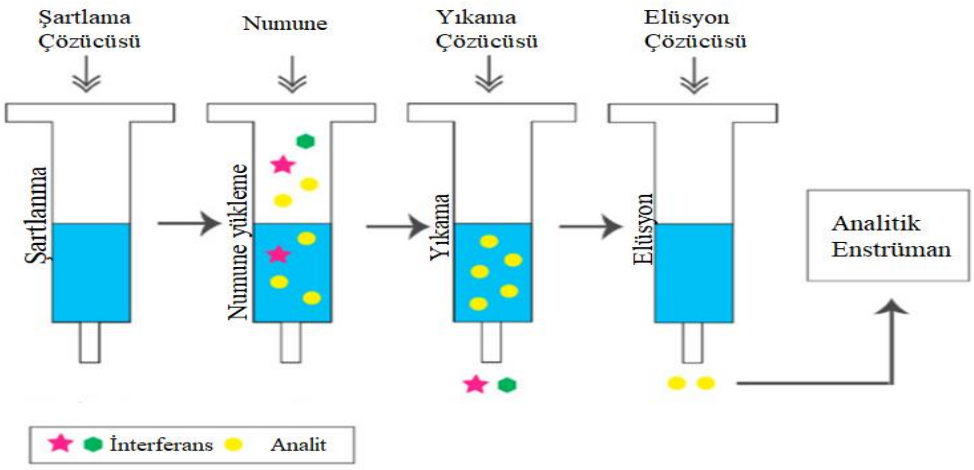
2.4.1.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Sıvı-sıvı ekstraksiyon, en eski ve yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden biridir ve temelde bir veya daha fazla analitin, birbirleriyle karışmayan veya kısmen karışan iki çözücü arasındaki dağılımına dayanmaktadır. Karışmayan iki sıvı faz arasındaki dağılım maddelerin çözünürlük farkından dolayı eşit olmayan bir şekilde gerçekleşmektedir [296], [297]. Sıklıkla, çözücülerden biri su veya sulu bir karışımdır ve diğeri polar olmayan bir organik sıvıdır. Ekstrakte edilebilir çözünenin dağılma oranı iki fazda aynı olduğunda dengeye ulaşılmaktadır. 'Dağılma katsayısı (K_D)' analitin iki sıvı faz arasındaki denge ifadesidir ve belirli bir sıcaklıkta dağılma katsayısı pratik olarak sabittir [298]. Diklorometan, kloroform, 1-klorobütan (-bütil klorür), toluen ve hekzan yaygın olarak kullanılan ve sulu matriste karışmayan ekstraksiyon çözücüleridir. Analitler, bu ekstraksiyon çözücülerinde çözünebilir olmalı ve ideal olarak çözücüde yüksek dağılma katsayıları sergilemelidir [296]. SSE, ucuz, uygulaması kolay bir yöntemdir ve halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, zaman alıcı olması, otomasyon zorluğu, genellikle toksik çözücüler kullanılması ve yüksek oranda polar bileşikler için daha az verimli olması gibi dezavantajlara sahiptir [299].

2.4.1.2 Katı Faz Ekstraksiyon

Katı faz ekstraksiyonu ilk olarak 1940'larda uygulanmış ve çeşitli KFE uygulamalarında hızlı gelişmeler 1970'lerde başlamıştır. Katı faz ekstraksiyonun temel ilkeleri sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzemektedir. Ancak KFE, sıvı-sıvı ekstraksiyonunda olduğu gibi birbirine karıştırılamayan iki sıvı faz yerine, analitin bir sıvı (numune ortamı) ve bir katı (adsorban) fazı arasında dağılımını içermektedir. Bu yöntem, çözeltiden adsorpsiyon yoluyla katı bir adsorban üzerindeki analitlerin saflaştırılmasını ve ön deriştirilmesini sağlamaktadır [300]. KFE (Şekil 2.9), genellikle kolon şartlama, numune yükleme, kolon yıkama ve analitin elüsyonu olmak üzere dört adımdan oluşmaktadır. Katı faz malzemelerinin şartlandırılması, etkili yüzey alanını arttırmak ve girişimleri azaltmak için kolondan organik çözücülerin veya suyun geçirilmesinden oluşmaktadır [301]. Analitlerin kolondan dışarı sızmamasını sağlamak için, numune yüklemesi sabit bir akış hızında yapılmalıdır [302]. Muhtemel interferansları ortadan kaldırdıktan sonra, analitler ve katı faz malzemesi arasındaki etkileşimler, küçük hacimlerde organik çözücülerin eklenmesiyle bozulmaktadır, bu da hedef analitlerin katı fazdan desorpsiyonuna yol açmaktadır [301]. Katı fazda tutulan bileşikler, analitlere karşı daha büyük bir ilgiye sahip çözücünün elüsyonuyla çıkarılabilmektedir [303].

Sabit faz, KFE yönteminin etkinliğini etkileyen ana bileşendir. Bu nedenle, uygun ilgiye, adsorpsiyon kapasitesine ve seçiciliğe sahip bir adsorbanın seçilmesi önemli bir adımdır [304]. KFE için kullanılan birçok adsorbent vardır ve silika adsorbentler, polimerik adsorbentler ve aktif karbon olmak üzere üç ana gruba ayrılabilmektedirler [302]. Silika bazlı malzemeler, birçok analitin ekstraksiyonu için kullanılan en yaygın adsorbanlardır [304].



Şekil 2.8 Tipik dört adımlı KFE prosedürü [305]

2.4.2 Mikroekstraksiyon Yöntemleri

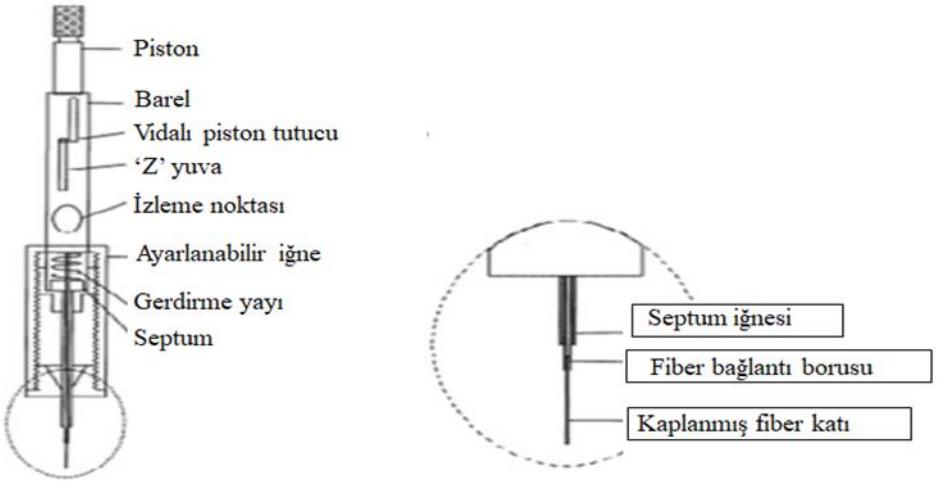
Son zamanlarda numune hazırlama tekniklerinin minyatürleştirilmesine izin veren daha hızlı, daha ucuz, daha kolay ve daha yeşil numune hazırlama prosedürlerinin kullanılmasına yönelik artan bir eğilim olmuştur. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri yerine kullanılan ve mikroekstraksiyon yöntemleri olarak adlandırılan bu minyatür formatlar, geleneksel ekstraksiyon yaklaşımlarının sınırlamalarını ve dezavantajlarını azaltmaktadır [306]. 1990'ların başlarından itibaren kullanılan mikroekstraksiyon yöntemleri, mikrolitre hacimlerinde çözücü tüketimi ile daha çevre dostu bir yöntemdir. Ayrıca mikroekstraksiyon, basitlik, hassasiyet, kesinlik, doğruluk, daha yüksek ekstraksiyon verimliliği ve daha az zaman gereksinimi gibi çeşitli avantajlar sunan yenilikçi bir yaklaşımdır [307], [308]. Mikroekstraksiyon yöntemleri, temel olarak katı faz mikroekstraksiyon (KFME) ve sıvı faz mikroekstraksiyon (SFME) olarak kategorize edilmektedir [308]. Literatürdeki bazı mikroekstraksiyon yöntemleri alt başlıklarda verilmiştir.

2.4.2.1 Katı Faz Mikroekstraksiyon

Katı faz mikroekstraksiyon (KFME), ilk olarak 1990'ların başlarında Pawliszyn ve arkadaşları tarafından geliştirilen [309] ve organik bir çözücüye ihtiyaç duymayan yeşil bir numune hazırlama tekniğidir. Analitlerin izolasyonu ve önderiştirme tek bir adımda gerçekleştiğinden basit bir metodoloji sağlamaktadır [310]. Çevresel, biyolojik ve gıda matrislerinden organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılan KFME, analitlerin numune matrisi

ile bir destek üzerine kaplanmış adsorbent fazı arasındaki dağılımına dayanmaktadır [49].

KFME'nin geliştirilmesine yönelik yapılan önceki çalışmalar, polimerik fazlarla kaplanmış erimiş silika optik fiberlerin kullanımını içermektedir. Daha sonralarda, kaplanmış fiberleri bir mikro şırıngaya dahil ederek katı faz mikroekstraksiyonunun gelişimi hızlandırılmıştır ve bugünkü haliyle Şekil 2.10'da verilene benzeyen KFME cihazının geliştirilmesine yol açılmıştır. Cihazın en önemli parçası, analitleri numune matrisinden ekstrakte etmek için kullanılan ince bir polimerik durağan faz tabakası ile kaplanmış bir fiber katı destektir. Polimerik adsorban ile kaplanmış fiber katı, hasardan korunmak için enjektörün içinde yer almaktadır. KFME enjektörü analiz edilecek numune çözeltisine yerleştirildikten sonra piston aşağı ve yukarı doğru hareket ettirilerek ekstraksiyon işlemi tamamlanmaktadır [311]. Desorpsiyon işlemi, iğnenin bir gaz kromatografi enjeksiyon portuna yerleştirilmesi ile uygulanmaktadır [312]. Çoğunlukla KFME, gaz kromatografisi ve/veya gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır, ancak yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile de kullanımları mümkündür [311].



Şekil 2.9 Katı Faz Mikroekstraksiyon (KFME) enjektörü [311]

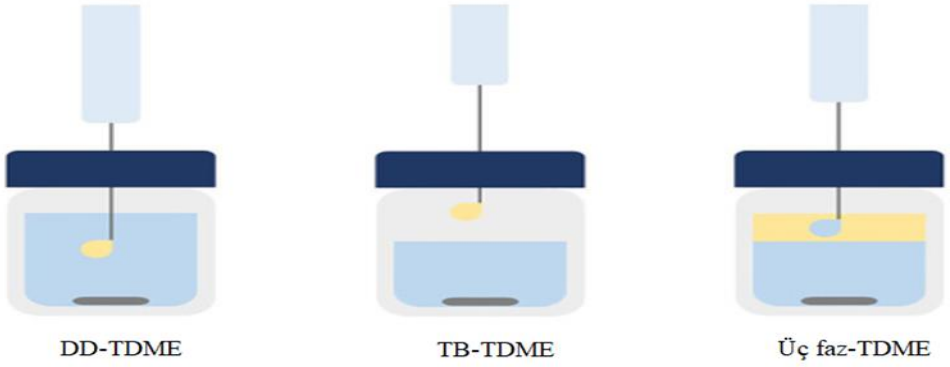
KFME prosedürü, doğrudan daldırma, tepe boşluklu ve membran korumalı olmak üzere üç temel çalışma modu kullanılarak fiber kaplamanın numuneye önceden belirlenmiş bir süre boyunca maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Doğrudan daldırma mikroekstraksiyonu, fiber kaplama ile numune matrisi arasındaki doğrudan teması içerektedir ve bu şekilde numune içindeki analitler fiber kaplamaya taşınmaktadır. Tepe boşluklu mikroekstraksiyonda ise süreç, numune matriksinden uçucu bileşiklerin salınmasına dayanmaktadır. Bu, ısı, kimyasal modifikasyon veya analitin doğal uçuculuğu ile elde edilebilmektedir [313]. Tipik olarak tepe boşluklu-katı faz mikroekstraksiyon, uçucu analitler için hızlı, çözücü içermeyen ve basit bir yöntemdir [314]. Membran korumalı katı faz mikroekstraksiyonda ise, fiberin yüzeyine, yalnızca uyumlu moleküllerin nüfuz etmesine izin veren bir hidrofobik polimerik kaplama uygulanmaktadır. Bu membran, safsızlıkların ve istenmeyen partiküllerin kaplanmış fibere ulaşmasını önleyen bir filtre görevi görmektedir [315].

2.4.2.2 Tek Damla Mikroekstraksiyonu

Tek damla mikroekstraksiyonu (TDME), sulu ve gazlı numunelerden analitler için minyatürleştirilmiş solvent bazlı ekstraksiyon prosedürünün ilk uygulamasıdır ve 1990'ların ortalarında Liu ve Dasgupta tarafından, hava örneklerinden amonyak ve kükürt dioksitin ekstrakte edilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Daha sonra Jeannot ve Cantwell kromatografik analizle doğrudan uyumlu olan bir uygulama gerçekleştirmiştir. Uygulamada, bir teflon çubuğun ucunda asılı duran ve sabit miktarda dahili standart içeren bir mikro damla (8 µl) organik çözücüsü, 4-metilasetofenon içeren karıştırılmış bir sulu çözeltiye daldırılmıştır ve ekstraksiyonun ardından, gaz kromatografisi (GC) ile analizi gerçekleştirilmiştir [316]. Teflon çubuk kullanımının uygun olmadığının anlaşılmasından kısa bir süre sonra, 1997'de He ve Lee tarafından bir mikro şırınga kullanımı gerçekleştirilmiştir ve böylece ilk kez sıvı faz mikroekstraksiyon (SFME) terimi ortaya çıkmıştır. He ve Lee, statik SFME ve dinamik SFME olmak üzere iki farklı mikroekstraksiyon modunu araştırmışlardır. Statik SFME, karıştırılmamış bir sulu çözeltiye batırılmış mikro şırınga iğnesinin ucunda asılı duran 1 µL'lik bir damladan oluşmaktadır. Dinamik SFME'de ise mikro şırınga bir ayırma hunisi olarak kullanılmıştır ve şırınga pistonunun tekrarlanan hareketini içermektedir.

Burada numune fazı, ekstraksiyon sürecini hızlandırmak için tekrar tekrar şırıngaya çekilmektedir ve ardından şırıngadan dışarı atılmaktadır [317].

TDME, en yaygın kullanılan SFME tekniklerinden biridir [318]. Bu teknik, hedef analitlerin sulu fazdan organik damlaya ekstraksiyonunu içermektedir ve eser seviye analitlerin kütle transferi, termodinamik dengeye ulaşılana kadar sulu fazdan organik damlaya gerçekleşmektedir [319]. TDME, ekstraksiyon sırasında bir arada var olan fazların sayısına bağlı olarak, iki fazlı veya üç fazlı teknikler olarak sınıflandırılabilmektedir [318]. Gerçekleştirilen iki ana TDME modu, doğrudan daldırmalı tek damla mikroekstraksiyon (DD-TDME) ve tepe boşluklu tek damla mikroekstraksiyonudur (TB-TDME). En basit haliyle doğrudan daldırmalı tek damla mikroekstraksiyon, sulu bir numune çözeltisi ile organik bir çözücü arasında meydana gelen ekstraksiyon nedeniyle iki fazlı bir moddur [320]. Analitler sulu bir verici fazdan, organik bir alıcı faz damlasına ekstrakte edilir. Alıcı faz damlası doğrudan donör faza daldırılabilir, bu da doğrudan daldırma-tek damla mikroekstraksiyon ile sonuçlanmaktadır [321]. Tepe boşluklu tek damla mikroekstraksiyon ise, ekstraksiyon çözücü organik damlasının sulu numunenin üzerindeki boşlukta olduğu üç fazlı TDME modu kategorisine girmektedir. Üç fazlı bir TDME, analitlerin sulu donör fazdan bir ara faza, genellikle bir organik çözücüye, ekstrakte edilmesini ve sulu bir alıcı faz damlasına geri ekstrakte edilmesini içermektedir. Alternatif olarak ara faz, örnek çözeltinin üzerindeki üst boşluk olabilir ve bu, tepe boşluklu tek damla mikroekstraksiyon ile sonuçlanmaktadır. DD-TDME, TB-TDME ve üç fazlı TDME modları, Şekil 2.11'de gösterilmektedir [321] .



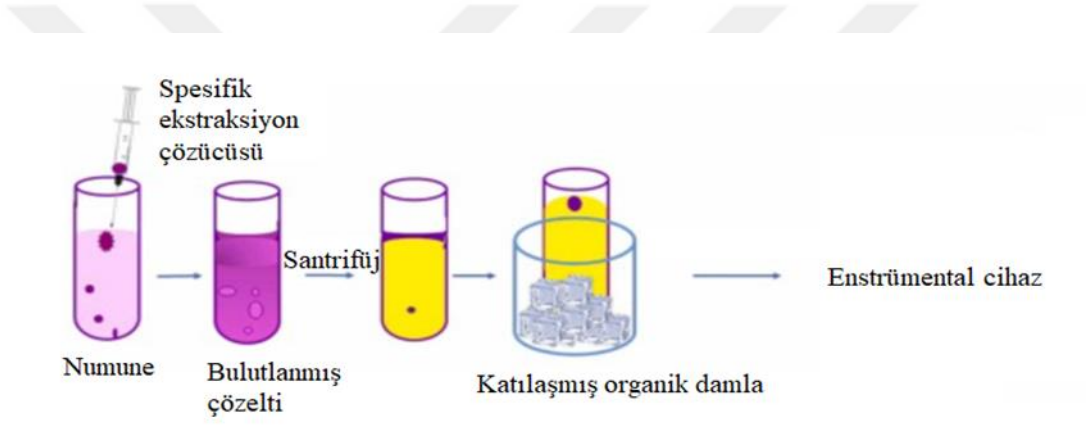
Şekil 2.10 Tipik TDME modları [321]

Tek damla mikroekstraksiyon (TDME), basit, hızlı, verimli ve aynı zamanda mikro ölçekli çözücü tüketimi nedeniyle çevre dostu bir numune hazırlama yöntemidir. Geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonuna kıyasla neredeyse çözücü içermez [322], [323]. Bunlarla beraber, seçiciliği geliştirmek, prosedürün uygulama aralığını genişletmek ve/veya analitik tekniklerle daha uyumlu hale getirmek için farklı yaklaşımlar da benimsenmiştir ve ekstraksiyon çözücüsü olarak iyonik sıvıların kullanımı buna bir örnektir [324]. İyonik sıvılar, ihmal edilebilecek kadar düşük buhar basıncı, sıvı halde geniş sıcaklık aralığı, termal kararlılık, yüksek viskozite ve yoğunluk, organik veya inorganik bileşiklere ilgi gibi birçok özelliğe sahiptir ve bu fizikokimyasal özellikler, çeşitli ekstraksiyon işlemleri için avantajlı koşullar sağlamaktadır. İyonik sıvıların TDME'da uygulanması, uçucu organik çözücülerin ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmasının önüne geçerek, analitik atığın önemli ölçüde azaltılması, toksik reaktiflerin ve solventlerin uzaklaştırılması ve artırılmış operatör güvenliği dahil olmak üzere Yeşil Analitik Kimya'nın birçok ilkesini yerine getirmektedir [325].

2.4.2.3 Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon

2007'de Khalili Zanjani ve arkadaşları tarafından oluşturulan yüzen katı organik damla mikroekstraksiyon (YKODME), analitlerin ekstraksiyonu için yüzen bir damla oluşturmak üzere karıştırılan numune çözeltisinin yüzeyine bir şırınga ile organik çözücünün enjekte edilmesine dayanmaktadır [326], [327]. YKODME'da analitler, hidrofobik damlanın mikrolitre hacimleri ile sulu çözelti matrisi arasında dağıtılmaktadır. SSE'dan farklı olarak, organik ekstraksiyon çözücüsü oda sıcaklığına yakın bir erime noktasına sahip olmalı, sulu sistemin üzerinde yüzebilmeli ve sudan daha az yoğun olmalıdır. Damlacıklarının kolayca toplanmasına izin verecek şekilde düşük sıcaklıklarda hızla katılaşmalıdır [328]. 1-undekanol, 1-dodekanol, 2-dodekanol ve n-heksadekan çözücüleri bu özelliklere sahiptir [329]. Yöntemde, uygun bir cam kaba numune çözeltisi konur. 1 µL hacimde, oda sıcaklığına yakın bir erime noktasına sahip **(**10-30 °C) uygun bir ekstraksiyon çözücüsü, genellikle bir şırınga kullanılarak sulu numuneye hızlı enjeksiyonla eklenir ve çözelti uygun bir süre karıştırılır. Bu adımda analitler organik faza ekstrakte edilmektedir [330]. Yavaşça artırılan veya azaltılan karıştırma hızının kontrol edilmesine özen gösterilmelidir, çünkü hızın aniden yükseltilip düşürülmesi ekstraksiyon çözücüsünün küçük damlacıklara

parçalanmasına neden olabilir, bu da tamamen toplanmasını zorlaştırarak analit kaybına neden olmaktadır [331]. Karıştırmadan sonra, cam kap buzlu su banyosuna daldırılır ve yüzen organik çözücü kısa bir süre sonra katılaşmaktadır. Katılaşan çözücü, makul bir şişeye aktarılır, oda sıcaklığında hızla eritilir ve analizi için uygun bir analitik cihaza enjekte edilir [332]. YKODME yöntemi, basitlik, düşük maliyet, minimum organik çözücü tüketimi, yüksek zenginleştirme faktörü ve birçok modern analitik cihazla birleştirilebilmesi gibi avantajlara sahiptir [328], [333]. Bununla birlikte, ana dezavantajı, sınırlı ekstraksiyon çözücüsü seçimidir, çünkü sadece birkaç organik çözücü oda sıcaklığına yakın erime noktalarına sahiptir [329]. YKODME prosedürünün genel tasarımı Şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.11 YKODME prosedürünün genel tasarımı [328]

2.4.2.4 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME), Rezaee ve meslektaşları tarafından 2006'da geliştirilmiştir [334] ve farklı örneklerde hem organik hem de inorganik analitler için geniş uygulama yelpazesi sağlaması, işlem basitliği, hızlılık, düşük maliyet, yüksek zenginleştirme faktörü ve düşük hacimli organik çözücüler tükettiği için çevresel zararsızlık gibi avantajlar sağlayarak zamanla çok popüler bir numune hazırlama tekniği haline gelmiştir [335]. DSSME yöntemi, ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücünün sulu numuneye bir şırınga yardımıyla hızla enjekte edildiği üç bileşenli bir çözücü sistemine dayanmaktadır [336]. Oluşan karışım çalkalanır ve çalkalama sonucu oluşan damlacıklar nedeniyle bulanık bir çözelti oluşur. Bir santrifüj adımından sonra, küçük

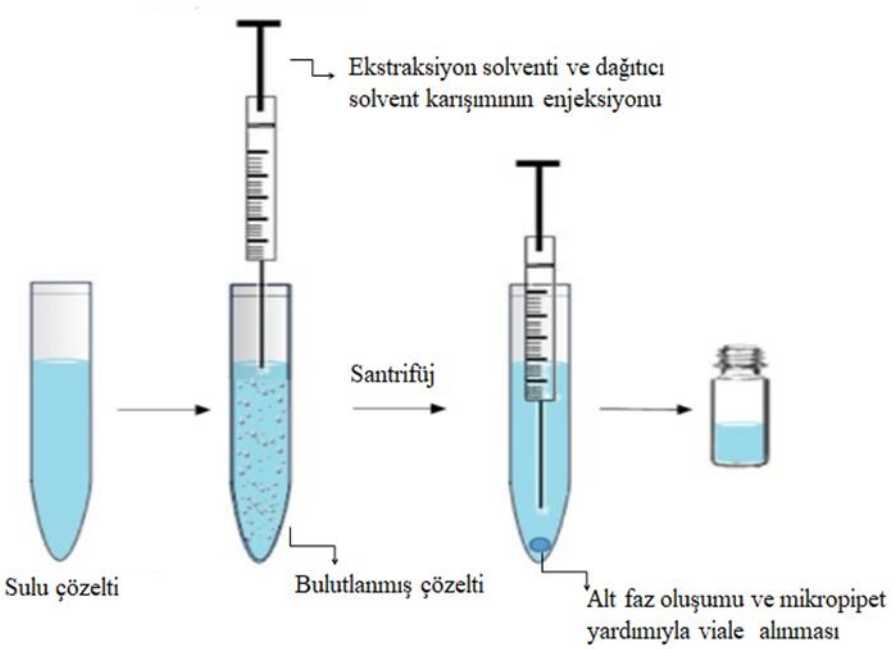
damlacıklar tüpün dibinde toplanmaktadır. Son adımda, alt faz analiz için bir mikro şırınga ile toplanmalıdır [334]. Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon prosedürü Şekil 2.13'te şematik olarak gösterilmiştir.

Uygun bir ekstraksiyon çözücüsü ve dağıtıcı çözücünün seçimi, yüksek bir zenginleştirme faktörü elde etmek amacıyla DSSME yöntemi için ana parametrelerdir. Bir ekstraksiyon çözücüsü, analitleri ekstrakte etme potansiyeline sahip olmalıdır. Ayrıca dağıtıcı çözücü içinde çözünür olması gerekirken, sudaki çözünürlüğü çok düşük olmalıdır. Son olarak, ekstraksiyon çözücüsünün yoğunluğu, faz ayrılmasını sağlamak için suyun yoğunluğundan büyük ölçüde farklı olmalıdır [337]. Klorobenzen, kloroform, karbon tetraklorür ve tetrakloretilen gibi halojenli hidrokarbonlar genellikle yüksek yoğunluklarından dolayı ekstraksiyon çözücüleri olarak seçilmektedir. Dağıtıcı çözücünün ise, hem ekstraksiyon çözücüsü hem de sulu fazda karışabilirliği seçiminde esastır ve dağıtıcı çözücüler olarak genellikle aseton, metanol, etanol ve asetonitril seçilmektedir [338]. Diğer önemli bir parametre ekstraksiyon ve dağıtıcı çözücülerinin hacimleridir. Ekstraksiyon çözücüsü hacmi, zenginleştirme faktörü üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ekstraksiyon çözücünün hacminin artmasıyla, santrifüjleme ile elde edilen alt fazın hacmi artmaktadır ve bu da zenginleştirme faktöründe bir azalmaya neden olur. Bir optimum ekstraksiyon çözücü hacmi, hem yüksek bir zenginleştirme faktörü hem de santrifüjlemeden sonraki analizler için yeterli miktarda alt faz hacmi sağlamalıdır. Dağıtıcı çözücü hacmi ise, bulanık çözeltinin oluşumunu, ekstraksiyon çözücüsünün sulu fazdaki dağılma derecesini ve sonuç olarak ekstraksiyon verimini doğrudan etkilemektedir. Dağıtıcı çözücü hacmindeki değişiklik, alt fazın hacmini de değiştirmektedir. Bu nedenle, sabit ve tekrarlanabilir bir alt faz hacmi elde etmek için dağıtıcı çözücünün ve ekstraksiyon çözücüsünün hacimlerini aynı anda değiştirmek gerekmektedir [338]. pH ve tuz ilavesi gibi diğer parametrelerin de ekstraksiyon verimleri üzerinde etkisi vardır. Analitler bir veya daha fazla iyonlaşabilen fonksiyonel grup içerdiğinde, pH'ın ekstraksiyon geri kazanımları üzerindeki etkisi daha belirgindir, çünkü yüklü türlerin organik çözücülerden kaçındığı varsayılmaktadır. Sodyum klorür gibi tuzlar da tuzlama etkisi nedeniyle geri kazanımı artırmak amacıyla kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda tuzlar, ekstraksiyon verimini azaltabilir, çünkü tuzun eklenmesi

ekstraksiyon çözücünün sudaki çözünürlüğünü azaltarak alt fazı arttırmaktadır. Sodyum klorür, DSSME yönteminde kullanılan en yaygın tuzdur [339].

Ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözeltide etkili bir şekilde dağılımı, yüzey alanının artmasını ve böylece analitin organik faza transferinin hızlandırılmasını sağlamaktadır [340] ve bu amaçla kullanılan çeşitli mekanik çalkalama yöntemleri mevcuttur [341]. 2010 yılında Yiantzi ve arkadaşları vorteks destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu önermiştir [342]. Ultrason destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon [343], manyetik karıştırma destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon [344] ve hava destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon [345] kullanılan diğer mekanik karıştırma yöntemlerine örnektir.

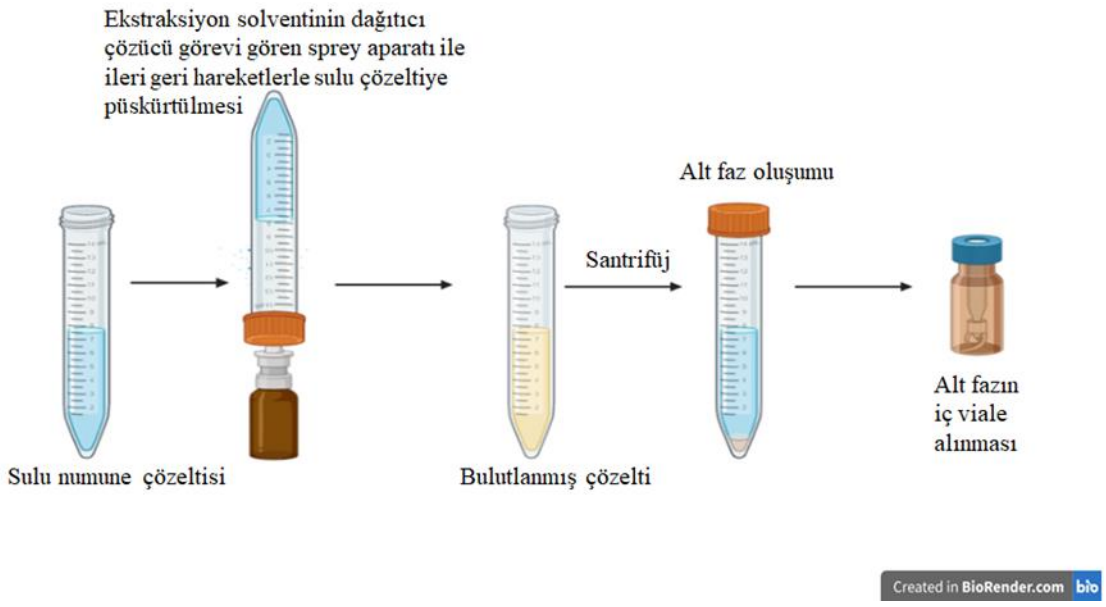
DSSME literatürde oldukça sık kullanılan bir mikroekstraksiyon yöntemidir ve şarap, meyve/meyve suyu, bal, süt, atık su gibi daha karmaşık matrislerin yanı sıra farmasötik ve biyolojik numunelerin (tabletler, idrar, plazma, tükürük ve ter) kullanımına dair birçok uygulama mevcuttur [346]. Ayrıca DSSME, herbisitlerin ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [347].



Şekil 2.12 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon prosedürü [339]

2.4.2.5 Sprey Destekli Damlacık Oluşumu Esaslı Sıvı Faz Mikroekstraksiyon

Mikroekstraksiyon yöntemlerinde toksik kimyasalların kullanımından kaçınılması çevre ve insan sağlığı açısından oldukça önemlidir [348]. Son yıllarda toksik çözücülerin gereksiz ve/veya aşırı kullanımını azaltma eğilimi olmuştur ve dağıtıcı çözücülerin kullanımını ortadan kaldırmak için çevre dostu, yeşil metodolojiler geliştirilmiştir [349]. Bu amaçla, sprey destekli damlacık oluşumu esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon (SD-DO-SFME) yöntemi, 2020 yılında DSSME yönteminin bir modifikasyonu olarak literatüre sunulmuştur [350]. DSSME'daki çok aşamalı prosedürlerin azaltılması, organik çözücü miktarının en aza indirilmesi, daha iyi seçicilik ve tekrarlanabilirliğin sağlanması gibi çeşitli avantajlar sağlanmıştır. SD-DO-SFME yönteminde (Şekil 2.14), ekstraksiyon çözücüsünü sulu çözeltiye püskürtmek için basit ve ucuz bir püskürtme aparatı kullanılmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsü, dağıtıcı çözücü olmadan bir püskürtme aparatı vasıtasıyla standart/numune çözeltisinin içerisine püskürtülmektedir. Sonuçta, ekstraksiyon ve kompleks oluşumu, ligand/ekstraksiyon çözücüsünün damlacıklarının bir numune çözeltisine püskürtülmesiyle eş zamanlı olarak gerçekleştirilir ve organik çözücü tüketimi en aza indirilir [350].



Şekil 2.13 Sprey destekli damlacık oluşumu esaslı sıvı faz mikroekstraksiyon prosedürü (BioRender kullanılarak üretilmiştir) [351]

2.4.3 Türevlendirme

Türevlendirme, bir analitin daha uygun bir yapıya sahip modifiye edilmiş bir bileşiğe, türev haline dönüştürülmesidir [352]. Türevlendirme, çeşitli spektroskopik yöntemler (ultraviyole-görünür, florimetri, nükleer manyetik rezonans, kütle spektroskopileri) ve özellikle de kromatografik ayırma yöntemleri (ince tabaka, gaz ve yüksek performanslı sıvı kromatografileri) için umut verici bir tekniktir ve temel amacı, bu yöntemlerin uygulanabilirliğini, seçiciliğini ve duyarlılıklarını artırmak ve/veya zayıf kromatografik davranışa sahip analitleri ayırmaktır [353], [354].

2.4.3.1 Sıvı Kromatografisi için Türevlendirme

HPLC'de türevlendirme, kromatografik analizden önce (kolon öncesi) veya kolon sonrası gerçekleştirilebilmektedir [355]. Türevlendirmeyi sıvı kromatografi analiziyle entegre etmenin seçicilik ve ayırmanın iyileştirilmesi, iyonizasyon etkinliğinin arttırılması, endojen interferansın ortadan kaldırılması, izomer ayrılmasının kolaylaştırılması gibi avantajları mevcuttur [356]. Yüksek performanslı sıvı kromatografi, uçucu olmayan bileşikler için iyi bir seçimdir ancak birçok bileşik yalnızca çok zayıf ultraviyole (UV) absorpsiyonuna sahiptir. UV tespit duyarlılığını arttırmak için türevlendirmeden oldukça yararlanılmaktadır [357]. HPLC ile analizlerde en önemli türevlendirmeler, UV-görünür bölge ve floresans ile tespite yardımcı olmak için analite sırasıyla bir kromofor ve florofor eklemeyi içermektedir. Benzoil klorür ve m-Toluoil klorür, UV-görünür bölge tespit gücünü arttırmak için alifatik amin ve amino asitlerin türevlendirme reaktifleri olarak kullanılmaktadır [358]. Florimetrik tespitler için farklı türevlendirme ajanları kullanılan HPLC ile analizlerinde ise, çoğunlukla farmasötik madde tayinleri gerçekleştirilmektedir [358] ve burada, amino asitler ile aminlerin türevlendirilmesi için çoğunlukla dansil klorür ve 9-florenilmetil kloroformat (Fmoc-Cl) reaktifleri kullanılmaktadır [359]–[361].

2.4.3.2 Gaz Kromatografisi için Türevlendirme

Bileşiklerin uçuculuğu ve termal kararlılığı, GC ve GC-MS analizinde gereklidir. Polar ve termal olarak kararlı olmayan bileşikleri kromatografik analize uygun hale getirmek için türevlendirme zorunludur [362]. Türevlendirmenin ana amacı,

polar olan ve/veya uçucu olmayan bileşikleri nispeten polar olmayan veya uçucu formlara dönüştürmek, hedef bileşiklerin termal kararlılığını geliştirmek, daha yüksek dedektör sinyallerine yol açan fonksiyonel grupları dahil ederek dedektör yanıtını arttırmak ve gaz kromatografinin ayırma performansını iyileştirmektir [50], [363], [364]. Polaritedeki azalma, kolon adsorpsiyonunu en aza indirerek daha iyi pik şekillerinin elde edilmesine ve kuyruklanma oluşumunda bir azalmaya imkan vermektedir [362]. Bir türevin hazırlanması, aynı zamanda, türevlendirilmemiş molekülün kütle spektrumu zayıf tanısal iyonlar gösterdiğinde de gerçekleştirilebilmektedir. Maddenin kimyasal yapısı türevlendirmeden sonra değişir ve sonuç olarak parçalanma modeli de değişmektedir. Bu doğrultuda türevlendirme işlemi ile daha yüksek m/z oranlarına ve daha yüksek bolluğa sahip iyonlara ait çok karakteristik kütle spektrumları elde edilmektedir. Kantitatif analizde, girişime daha az maruz kalan yüksek kütleli iyonların izlenmesi tercih edilmektedir [362].

Yaygın türevlendirmeler, polar gruplarda (-OH, -COOH, -SH, -NH vb.) aktif hidrojenin yer değiştirmesini içermektedir ve alkilasyon, asilasyon, sililleme ve esterleşme reaksiyonları şeklinde kategorize edilmektedirler [51], [357], [365].

- **Alkilasyon Reaksiyonları**

Alkilasyon reaksiyonu, aktif bir hidrojenin bir alkil veya bazen bir aril grubu ile yer değiştirmesinden oluşmaktadır. Karboksilik asitler, alkoller, tiyoller, fenoller, birincil ve ikincil aminler, amidler ve sülfonamidler alkilasyon reaksiyonlarına maruz kalabilen başlıca fonksiyonel gruplardır. Alkil türevlerini hazırlamak için birçok reaktif ve yöntem bulunmaktadır. Alkil halojenürler, düşük moleküler kütleli alifatik bromürler veya benzil bromürler alkil türevlerini elde etmek için en yaygın olarak kullanılan reaktiflerden bazılarıdır [362]. N,N-Dimetilformamid dialkil asetaller, ilgili alkil türevlerini oluşturmak üzere karboksilik asitler, fenoller ve tioller ile reaksiyona girmektedir. Benzer şekilde, diazoalkanlar da alkilasyon reaksiyonları için kullanılmaktadır, ancak fenolik gruplar bu reaktifler tarafından daha az bir oranda alkillenmektedir. Reaktifler neme karşı hassastır ve reaksiyon kuru koşullar altında gerçekleştirilmelidir [362].

- **Asilasyon Reaksiyonları**

Asilasyon reaksiyonu, aktif hidrojene sahip bir moleküle asil grubunun eklenmesinden oluşmaktadır. Asillenmiş türevler; alkoller, aminler, amidler, tiyoller, fenoller, enoller, sülfonamidler, doymamış bileşikler, aromatik halkalar gibi çok çeşitli fonksiyonel gruplardan elde edilebilmektedir . Örneğin, -OH, -SH, -NH gibi aktif bir hidrojene sahip bileşikler sırasıyla esterlere, tiyoesterlere ve aminlere dönüştürülebilmektedir [358] . Genel olarak, bir asilasyon reaksiyonu Şekil 2.15'de gösterildiği gibidir [366]. Asilasyon reaksiyonları, üç ana reaktif türü kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar, asil halojenürler, asit anhidritler veya asillenmiş imidazoller gibi reaktif türevleridir [362]. Bunların arasından anhidritler, ekstraktif asilasyon için en popüler türevlendirme ajanlarıdır ve heptaflorobütirik anhidrit (HFBA), pentafloropropiyonik anhidrit (PFPA), trifloroasetik anhidrit (TFA) ve asetik anhidrit (AA) en yaygın kullanılan dört reaktiftir [367]. Asetik anhidrit (AA) ile asilasyon, biyojenik aminleri ve psikotrop ilaçları türevlendirmek için toksikolojik analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır [368]. Amfetamin ve metabolit türevlerinin heptaflorobütiril klorür kullanılarak asilasyonları da oldukça yaygındır [362].

$$R - XH + R'COY \rightarrow R - XCOR' + YH$$

Şekil 2.14 Asilasyon reaksiyonuna bir örnek [366]

- **Sililasyon Reaksiyonları**

Sililasyon, GC-MS analizleri için en yaygın kullanılan türevlendirme prosedürüdür. GC-MS'de kromatografik ayırma sırasında problem oluşturan fonksiyonel gruplar (hidroksil, karboksilik asit, amin, tiol ve fosfat) sililleme reaktifleri ile türevlendirilebilmektedir. Sililasyon, bileşik üzerindeki bir asidik hidrojenin (veya aktif bir hidrojenin) bir alkilsilil grubu ile değiştirilmesini içermektedir. Dolayısıyla sililasyon reaksiyonu sonucu, genellikle daha az polar, daha uçucu ve yüksek termal kararlılığa sahip bileşikler elde edilmektedir [358]. Organik bileşiklerde bulunan neredeyse tüm fonksiyonel gruplar, silil eterlere veya esterlere dönüştürülebilir. Çeşitli fonksiyonel grupların silil türevleri oluşturma yeteneği şu şekildedir: alkoller> fenoller> karboksilik> asitler>

aminler> amidler [362].

En yaygın sililleme prosedürü trimetilsililasyonudur. Trimetilsilil (TMS) türevleri, termal ve kimyasal kararlılık ile yüksek uçuculuk sağlamaktadır ve hazırlanmaları kolaydır [369]. Şekil 2.16'da, trimetilsilil, bir -OH grubu üzerindeki aktif hidrojeni değiştirmek için kullanılmıştır. Bu gibi durumlarda, fenolik -OH grubu üzerindeki hidrojenin trimetilsilil grubu ile yer değiştirmesi, dipol-dipol etkileşimlerini azaltmaktadır. Ayrıca, ekleme, hedef analitin uçuculuğunu arttırmakta ve türevlendirilmiş bileşiklere, özellikle polar olmayan durağan fazlar üzerinde gelişmiş kromatografik ayırma özellikleri vermektedir [358].



Şekil 2.15 Trimetilsilil ile hidroksil gruplarının türevlendirilmesi için bir örnek [358]

Trimetilhalosilanlar, TMS-aminler, TMS-esterler ve TMS-amidler dahil olmak üzere farklı özelliklere (uçuculuk, reaktivite, seçicilik, yan ürün oluşumu vb.) sahip çeşitli trimetilsililasyon reaktifleri geliştirilmiştir. Trimetilsililimidazol (TMSIm) ayrıca hidroksil ve karboksil grupları için güçlü sililleme gücüne sahiptir, ancak amino gruplarıyla reaksiyona girmemektedir. Tüm sililleme reaktifleri ve türevleri neme karşı hassastır; bu nedenle reaksiyonlar susuz koşullarda gerçekleştirilmelidir [362].

- **Esterleşme Reaksiyonları**

Esterleşme reaksiyonu, asit ve alkol gruplarının bir katalizör yardımıyla reaksiyonu olarak bilinmektedir ve karbonil oksijenin protonlandığı, nükleofilik alkolün pozitif karbona saldırdığı ve suyun ortadan uzaklaştırılmasıyla esterleşmenin oluştuğu bir dizi protonasyon ve deprotonasyon adımlarından oluşmaktadır [358]. Karboksilik asitlerin alkilasyonu, alkollerle esterleştirme yoluyla da elde edilebilir. Metil veya etil esterler oluşturmak için hidroklorik asit,

sülfürik asit veya boron triklorür gibi asidik bir katalizör içeren metanol veya etanol kullanılmaktadır. Yüksek kütleli fragman iyonları elde etmek için ise, daha yüksek moleküler kütleli alkoller ve halojen atomları içeren alkoller kullanılmaktadır [362].

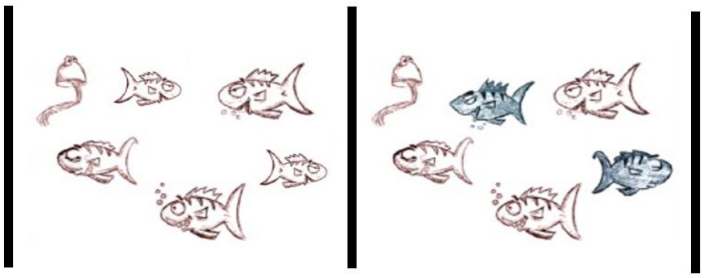
2.5 İzotop Seyreltme Kütle Spektrometrisi

İzotop seyreltme (IS), yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahip bir kalibrasyon stratejisidir ve modern kantitatif analizde en doğru sonuçları sağlayan kesin bir yöntem olarak kabul edilmektedir [370]. Standart ekleme, dış kalibrasyon ve diğer kalibrasyon tekniklerinden farklı olarak IS, matris etkilerinden, cihaz veya analist hatalarından, analit kayıplarından etkilenmemektedir ve nihai bir deneysel hatayla sonuçlanan tüm değişkenler kontrol altına alınmaktadır [54]. Numune hazırlama ve enstrümantal tespit sırasında analit kayıplarını tam olarak telafi eden uygun dahili standart seçimi ile oldukça doğru sonuçlar elde edilebilmektedir [371]. Dahili standart, analitlerle yakından ilişkili olacak ve analitik davranışlarını mümkün olan en yüksek derecede temsil edebilecek şekilde seçilmektedir. ISMS stratejilerini uygulamanın en uygun yolu, izotopik olarak etiketlenmiş bir analit kullanmaktır, çünkü iç standart, hedef analit ile hemen hemen aynı kimyasal özelliklere sahiptir [372].

ISMS stratejisi, biyolojik numunelerin analizinde, numune matriksinin karmaşıklığının neden olduğu müdahalelerle başa çıkmak için en güçlü yaklaşımdır [54]. Özellikle söz konusu analit eser miktarda veya karmaşık bir matriks varlığında mevcut olduğunda, harici bir kalibrasyon tekniğine göre belirgin avantajlar sağlayan ISMS, yalnızca poliizotopik elementlere ve izotopik olarak zenginleştirilmiş analitlere uygulanmaktadır ve ilgili analitin derişimi %1-2 aralığındaki küçük standart sapmalarla belirlenebilmektedir [373]–[375]. Bir elementin tüm izotopları, farklı kütlelerle aynı kimyasal davranışa sahiptir ve kütle spektrometrisi, aynı elementin izotopları arasındaki bu kütle farklılıklarının saptanmasına izin vermektedir [376]. Hidrojen, karbon, azot, oksijen ve kükürt poliizotopik elementlerdir [376], [377].

2.5.1 ISMS'nin Tarihi

İzotop seyreltme stratejisi, izotopların keşfinden on yıl önce, zoologlar tarafından balık ve kuş popülasyonlarının tahmininde kullanılmaya başlanmıştır. Bilinen en eski uygulamalardan biri, havuzlardaki balık popülasyonunu tahmin etmek için kullanılan 'yakala ve bırak' metodudur. Bu metot, ilk olarak 1895 yılında C.G.J. Petersen tarafından uygulanmıştır [376]. IS'nin temel ilkesine benzer olan bu metodun prensibi çok basittir, bilinen miktarda balık yakalanarak etiketlenir ve havuza geri salınır. Daha sonra serbest bırakılan balıklar diğer tüm balıklarla karıştırıldıktan sonra ikinci bir yakalama gerçekleştirilir ve etiketli ile etiketsiz balık sayıları kaydedilir [378]. İlk yakalanan ve işaretlenen türlerin toplam sayısı (N_B), ikinci yakalanan türlerin toplam sayısı (W) ve ikinci yakalamadaki işaretlenen türlerin sayısı (B, yeniden yakalama) kullanılarak belirtilen ortamın toplam popülasyonu (N_W) tahmin edilmektedir ($N_W=N_B$ xW/B). Yakala-bırak metodunda, işaretli bir hayvanın yeniden yakalanma olasılığının ilk yakalanma olasılığı ile aynı olduğu varsayılır. Bu nedenle, ilk kez yakalanan hayvanların, toplam popülasyona oranı (N_B/N_W) ile yeniden yakalanan işaretli hayvanların, ikinci kez yakalanan toplam hayvan sayısına oranı (B/W) eşit olmalıdır [376]. Zoolojide izotop seyreltme uygulamasının bir örneği Şekil 2.17'de verilmiştir. Diğer bir örnek, 'yakala ve bırak' metodunun, bir adadaki toplam kuş sayısını belirlemek için Etienne Roth tarafından uygulanmasını içermektedir [379].



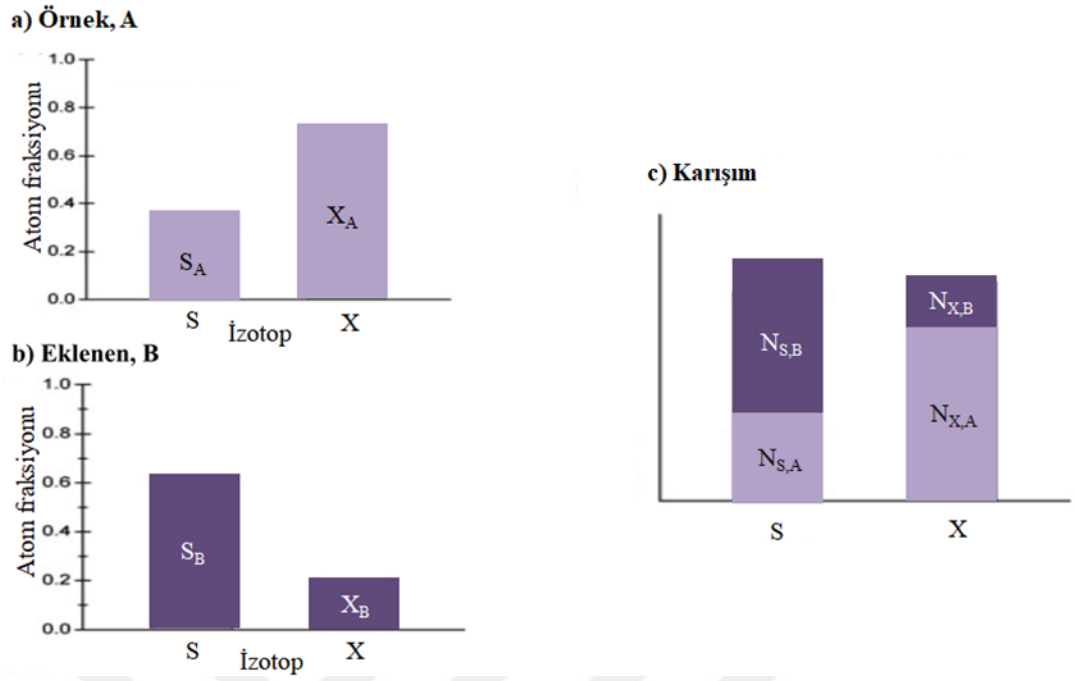
Şekil 2.16 Zoolojide izotop seyreltme uygulamasının bir örneği [378]

İzotop seyreltmenin ilk uygulamaları radyoaktif izotoplardan yararlanmaktadır ve radyoizotopların kullanılmasının geçmişi Hevesy ve Paneth'in bir kurşun ve Radyum D karışımını ayırmaya çalıştığı 1913 yılına kadar uzanmaktadır. Uranyum cevherlerinde bulunan ve bir radyoaktif izotop olan Radyum D

(^{210}Pb)'nin yaygın kurşundan kimyasal yollarla ayrılamayacağının keşfi beklenmedik bir başarıya yol açmıştır ve beraberinde gelen birçok çalışma sonucu, 1935'te Hevesy tarafından radyokimyasal izotop üzerine ilk makale yayınlanmıştır. Ardından Hevesy, 1943 Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [376], [378], [380]. Kütle spektrometrisinin giderek daha fazla yüksek performansa sahip bir analitik tekniğe dönüştürülmesiyle beraber izotop seyreltme yöntemi, günümüzde İzotop Seyreltme Kütle Spektrometresi (ISMS) olarak bilinen, kütle spektrometrisi ile birleştirilmiştir. 1940'ların ortalarında ISMS, karbon, azot, oksijen ve sülfürün elemental analizine uygulanmıştır ve 1946'da ABD tarafından elemental ISMS'in geliştirilmesini ve uygulanmasını tetikleyen birçok elementin zenginleştirilmiş kararlı izotopları kullanıma sunulmuştur [381]. 1950'lerdeki jeolojik ve nükleer araştırmalar ve 1970'lerde yapılan organik bileşiklerin belirlenmesine yönelik ilk uygulamalar, izotop seyreltme kütle spektrometri yönteminin daha fazla gelişmesine yol açmıştır [376]. İzotop seyreltme kütle spektrometrisi (ISMS), günümüzde, Uluslararası Birimler Sistemi'ne göre doğrudan izlenebilir mutlak bir ölçüm yöntemi olarak uluslararası kabul görmektedir [382]. Bir yöntemi doğrulamanın bir yolu, sertifikalı referans malzemeleri (CRM'ler) kullanmaktır. Ancak ISMS'de, diğer kalibrasyon stratejilerinin aksine, referans malzemeler gerekli değildir [383].

2.5.2 ISMS Prensibi

ISMS prensibi temel olarak, analitin izotopça zenginleştirilmiş bileşeni ile numune çözeltisinin belirli bir oranda karıştırılmasına ve elde edilen karışımdaki izotop oranının ölçülmesine dayanmaktadır [54]. Numune ve izotopik analog tamamen karıştırıldığında, tüm izotoplar kimyasal ve fiziksel matriks etkilerinden aynı şekilde etkilenmektedir. Bu nedenle, matriks etkilerinin ölçülen izotop oranı üzerinde hiçbir etkisi yoktur ve dolayısıyla analitik sonuç üzerinde de hiçbir etkisi yoktur. ISMS prensibi, iki farklı izotop içeren bir bileşik için Şekil 2.18'de şematik olarak gösterilmiştir [384]. Ayrıca, izotopik olarak zenginleştirilmiş standartlar, analizi gerçekleştirilen numuneye gravimetrik olarak eklenmelidir [385].



Şekil 2.17 İzotop seyreltme ilkesi; (a) izotop S ve X'in atom fraksiyonları, örnek/numune A için, S_A ve X_A, (b) izotop S ve X'in atom fraksiyonları, eklenen (izotopça zengin madde) B için, S_B ve X_B, (c) karışımdaki izotopik sinyallerin ölçülen oranı [384]

İzotop seyreltme kavramını ifade etmek için farklı denklem biçimleri kullanılabilmektedir. Analitin izotopça zenginleştirilmiş bileşeni B ve numune çözeltisi A için, eklenen izotopça zengin maddenin miktarı (n_B) ve izotopik bileşim biliniyorsa, klasik izotop seyreltme yöntemi ile numunedeki analit derişimi (n_A), (2.1) ve (2.2) denklemlerinde gösterildiği gibi hesaplanabilmektedir [386].

$$\boldsymbol{n_A = n_B \frac{R_B - R_{AB}}{R_{AB} - R_A} \cdot \frac{\sum R_A}{\sum R_B}} \qquad (2.1)$$

$$\boldsymbol{w_A = w_B \frac{R_B - R_{AB}}{R_{AB} - R_A} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \cdot \frac{\sum R_A}{\sum R_B} \cdot \frac{M_A}{M_B}} \qquad (2.2)$$

Burada w_A ve w_B sırasıyla numune ve izotopça zenginleştirilmiş metaryel içindeki analitin kütle fraksiyonlarını temsil ederken, $m_{A(AB),aq}$ ve $m_{B(AB),aq}$ sırasıyla

karışımı hazırlamak için gerekli olan sulu A ve B çözeltilerinin kütlelerini temsil etmektedir [386]. Bu yöntem tekli izotop seyreltme (IS^1MS) olarak isimlendirilir.

Kütle spektrometri sistemlerinin çoğunda ölçülen izotop oranı (r), teorik izotop oranıyla (R) doğru orantılıdır. Ölçülen oran, (2.3) denkleminde verilen kütle sapması kalibrasyon faktörü (K) kullanılarak teorik oranla ilişkilendirilebilmektedir [386].

$$\boldsymbol{R = K.r} \tag{2.3}$$

Eşitliklerdeki izotop açısından zengin maddenin izotopik bileşimi (R_B) gibi bazı değişkenlerin pratikte bilinmemesi kaçınılmazdır [387]. Bu belirsizlikleri gidermek için, klasik izotop seyreltme yönteminin çeşitli varyasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilmiş izotop seyreltme varyasyonları, tekli (IS^1MS), ikili (IS^2MS), üçlü (IS^3MS) ve dörtlü (IS^4MS) izotop seyreltmeleri içermektedir. Bu uygulamaların amacı, bazı değişkenleri ve belirsizlikleri ortadan kaldırarak yöntemin kesinliğini arttırmaktır [386].

2.5.2.1 İkili Seyreltme

İzotopik olarak zenginleştirilmiş malzemeler genellikle küçük miktarlarda bulunmaktadır ve bu nedenle doğrudan tartımı zor bir hale getirmektedir. Bununla birlikte, zenginleştirilmiş maddenin kimyasal saflığı her zaman doğal izotopik bileşimin birincil standartları ile aynı seviyede değildir.

İkili seyreltme yöntemi (IS^2MS), izotop seyreltme denkleminden eklenen maddenin kütle fraksiyonunu (w_B) ortadan kaldırmak için ikinci bir karışımın kullanılması anlamına gelen "ters seyreltme" olarak da bilinmektedir. Geleneksel izotop seyreltme yönteminde, zenginleştirilmiş malzemelerin çok küçük miktarlarda mevcudiyetinden ve zenginleştirilmiş ve doğal malzemelerin eşit olmayan kimyasal saflığından kaynaklanan potansiyel problemler, ikili seyreltme tasarımı ile etkili bir şekilde aşılabilmektedir. İkili seyreltme yöntemi, her iki seyreltme için aynı zenginleştirilmiş spike çözeltisi (w_B) kullanılıyorsa, iki tekli izotop seyreltme ölçümünün birleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Burada standart (A*), w_B'yi elde etmek için kullanılmaktadır.

$$w_B = w_{A*} \cdot \frac{R_{A*} - R_{A*B}}{R_{A*B} - R_B} \cdot \frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \cdot \frac{\sum R_B}{\sum R_A} \cdot \frac{M_B}{M_{A*}} \quad (2.4)$$

(2.4) denklemi, geleneksel izotop seyreltme denklemine yerleştirilerek, ikili seyreltme (2.5) denklemi elde edilmektedir.

$$w_A = w_{A*} \cdot \frac{R_{A*} - R_{A*B}}{R_{A*B} - R_B} \cdot \frac{R_B - R_{AB}}{R_{AB} - R_A} \cdot \frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \cdot \frac{\sum R_A}{\sum R_{A*}} \cdot \frac{M_A}{M_{A*}} \quad (2.5)$$

Sonuçta, iki değişken (ΣR_B ve M_B) ortadan kaldırılmıştır ve bu, ikili seyreltme stratejisinin ilk önemli avantajını ortaya çıkarmaktadır. İkinci bir avantaj, standart (A*) ve analit (A) izotopik bileşimlerinin aynı olduğu ($R_A = R_{A*}$ ve $M_A = M_{A*}$) varsayılarak sağlanabilmektedir ve sonucunda denklem (2.6) elde edilmektedir.

$$w_A = w_{A*} \cdot \frac{R_A - R_{A*B}}{R_{A*B} - R_B} \cdot \frac{R_B - R_{AB}}{R_{AB} - R_A} \cdot \frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \quad (2.6)$$

Aynı kütle faktörünü elde etmek için eşitlik $R_i = K \cdot r_i$ (i = A, B, AB, A*B) olacak şekilde düzenlenirse, kütle faktörleri birbirini götürmektedir ve denklem (2.7) elde edilmektedir.

$$w_A = w_{A*} \cdot \frac{r_A - r_{A*B}}{r_{A*B} - r_B} \cdot \frac{r_B - r_{AB}}{r_{AB} - r_A} \cdot \frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \quad (2.7)$$

Alternatif olarak, izotop ölçümlerini numunenin kütle fraksiyonuyla (w_A) ilgisiz hale getirmek için kullanılan ve 'tam eşleştirme' yöntemi olarak bilinen tasarım kullanılmaktadır ve $r_{AB} \approx r_{A*B}$ olacak şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca, r_B değerinin yüksek hassasiyetle bilinmesi gerekli değildir [386].

$$\frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} = \left(\frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{A(AB),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \right) \approx 1 \quad (2.8)$$

$$w_A \approx w_{A*} \quad (2.9)$$

2.5.2.2 Üçlü Seyreltme

Üçlü izotop seyreltme kütle spektrometresi, ikili seyreltme ve tam eşleştirme yöntemlerine alternatif bir yöntemdir ve yeni bir kalibrasyon karışımı ekleyerek r_B'nin doğrudan ölçümünü ortadan kaldırmaktadır [386], [388]. Formül tasarımında iki izotop seyreltme denklemi yer almaktadır.

$$w_A = w_{A*-1} \cdot \frac{r_A - r_{A*B-1}}{r_{A*B-1} - r_B} \cdot \frac{r_B - r_{AB}}{r_{AB} - r_A} \cdot \frac{m_{A*(A*B-1),aq}}{m_{B(A*B-1),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \quad (2.10)$$

$$w_A = w_{A*-2} \cdot \frac{r_A - r_{A*B-2}}{r_{A*B-2} - r_B} \cdot \frac{r_B - r_{AB}}{r_{AB} - r_A} \cdot \frac{m_{A*(A*B-2),aq}}{m_{B(A*B-2),aq}} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \quad (2.11)$$

A*B-1 ve A*B-2, izotopça zenginleştirilmiş materyal ve standardın ek karışımlarını temsil etmektedir. Bu denklemleri birleştirerek, r_B son formülden çıkarılmaktadır ve (2.12) eşitliği elde edilmektedir. Üçlü seyreltmenin bu model denklemi, tek bir örnek karışımı (AB) ve iki standart karışımı (A*B) içermektedir.

$$w_A = \frac{m_{A*-2} r_1 + m_{A*-1} r_2}{r_3} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}} \quad (2.12)$$

Burada;

$$m_{A*-i} = w_{A*-i} \frac{m_{A*(A*B-i),aq}}{m_{B(A*B-i),aq}} \quad (2.13)$$

$$r_1 = (r_{AB} - r_{A*B-1}).(r_A - r_{A*B-2}) \quad (2.14)$$

$$r_2 = (r_{AB} - r_{A*B-2}).(r_{A*B-1} - r_A) \quad (2.15)$$

$$r_3 = (r_{AB} - r_A).(r_{A*B-1} - r_{A*B-2}) \quad (2.16)$$

Ayrıca üçlü seyreltme, iki AB karışımı ve bir A*B karışımı kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir.

$$w_A = \frac{r_{3*}}{m_{A-2}\, r_{1*} + m_{A-1}\, r_{2*}} \cdot \frac{m_{A*(A*B),aq}}{m_{B(A*B),aq}} \quad (2.17)$$

Burada;

$$m_{A-i} = \frac{1}{w_{A*}} \cdot \frac{m_{A(AB-i),aq}}{m_{B(AB-i),aq}} \quad (2.18)$$

$$r_{1*} = (r_{A*B} - r_{AB-1}).(r_A - r_{AB-2}) \quad (2.19)$$

$$r_{2*} = (r_{A*B} - r_{AB-2}).(r_{AB-1} - r_A) \quad (2.20)$$

$$\boldsymbol{r_{3*} = (r_{A*B} - r_A).(r_{AB-1} - r_{AB-2})} \quad (2.21)$$

İkili seyreltmeye benzer şekilde, üçlü seyreltme de $r_{AB} \approx r_{A*B-1}$ olacak şekilde (2.22)'deki gibi tasarlanabilmektedir .

$$\boldsymbol{w_A \approx w_{A*-1}} \quad (2.22)$$

IS^2MS ve IS^3MS, tam eşleştirme modellemesi için aynı yaklaşıma sahip olsa da, kavramsal bir fark vardır. IS^2MS-tam eşleştirme, r_B'nin sayısal değerini ortadan kaldırırken, IS^3MS-tam eşleştirme, analitik olarak r_B'yi iptal etmektedir [386].

2.5.2.3 Dörtlü Seyreltme

IS^4MS yöntemi, izotop açısından zengin materyalin kütle fraksiyonundan (w_B), izotop açısından zengin materyalin izotopik bileşiminden (r_B) ve numune çözeltisinin izotopik bileşiminden (r_A) kaynaklanan belirsizliklerden bağımsızdır. Bu dört uygulama arasında IS^4, en yüksek doğruluk ve kesinliği sunarak, belirsizlikleri en aza indirmektedir. Moleküler spektrometride, özellikle minör izotoplar (r_A>50) için r_A'nın doğrudan ölçümü her zaman mümkün değildir. Dörtlü seyreltme denklemi, iki AB karışımı ve iki A*B karışımı, üç AB karışımı ve bir A*B karışımı veya bir AB karışımı ve üç A*B karışımı kullanılacak şekilde üç farklı yöntemde elde edilebilmektedir. İkinci yaklaşım, (2.23) dörtlü seyreltme denklemini vermektedir ($R_A = R_{A*}$ varsayarak) :

$$\boldsymbol{w_A = -\frac{m_{A*-2}m_{A*-3}r_4 + m_{A*-1}m_{A*-3}r_5 + m_{A*-1}m_{A*-2}r_6}{m_{A*-1}r_4 + m_{A*-2}r_5 + m_{A*-3}r_6} \cdot \frac{m_{B(AB),aq}}{m_{A(AB),aq}}} \quad (2.23)$$

Burada;

$$\boldsymbol{m_{A*-i} = w_{A*-i}\frac{m_{A*(A*B-i),aq}}{m_{B(A*B-i),aq}}} \quad (2.24)$$

$$\boldsymbol{r_4 = (r_{AB} - r_{A*B-1}).(r_{A*B-2} - r_{A*B-3})} \quad (2.25)$$

$$\boldsymbol{r_5 = (r_{AB} - r_{A*B-2}).(r_{A*B-3} - r_{A*B-1})} \quad (2.26)$$

$$r_6 = (r_{AB} - r_{A*B-3}).(r_{A*B-1} - r_{A*B-2}) \quad (2.27)$$

Önceki izotop seyreltme varyasyonlarında olduğu gibi, $r_{AB} \approx r_{A*B-1}$ durumu tam eşleşen dörtlü seyreltmeye yol açmaktadır ve bu varyasyonda, tüm değişkenler dolaylı olarak numune ve standart karışımlar ölçülerek elde edilmektedir [386]. Optimum deneysel tasarım (tam eşleştirme) benimsendiğinde, IS^{4}MS yüksek verimli sonuçlar sağlamaktadır [389].

2.5.3 ISMS Stratejisinin Avantaj ve Dezavantajları

Numunenin homojen olması ve izotopik dengeye ulaşılması koşuluyla, ISMS'in ana avantajları aşağıda görülmektedir:

- Eser derişimlerde bile yüksek derecede kesinlik ve doğruluk sunmaktadır.
- Analitin miktarı, analitin doğal ve izotopik analoğu arasındaki oran ölçülerek belirlendiğinden, analitik prosedürün her adımında analitin toplam geri kazanımının değerlendirilmesine gerek yoktur.
- İzotopik dengeye ulaşıldığında, sinyal kayması ve matriks etkisi de dahil olmak üzere cihazın hassasiyetindeki değişimler kantitatif sonucu etkilememektedir.
- Numune hazırlama sırasında en çok organik analizlerde karşılaşılan olası analit kayıpları, dahili standart olarak izotop analoğunun kullanılmasıyla telafi edilebilmektedir.
- Standart ekleme ve/veya diğer kalibrasyon tekniklerine göre daha az zaman alır ve daha doğru sonuçlar elde edilmektedir.

Öte yandan, ISMS için bazı dezavantajlar da mevcuttur.

- İzotopik etiketli veya zenginleştirilmiş malzemeler maliyetlidir ve az miktarda bulunmaktadır.
- Gerekli kütle spektrometre cihazları maliyetlidir.

- Analit ile izotopik analog arasındaki fiziksel ve kimyasal özelliklerdeki farklılıklar, kütle spektrometrisinde üretilen iyonları etkileyebilmektedir [390].

2.6 Literatür Taraması

Eser düzeyde metamfetamin tayini için bir çalışma Shahvandi vd. tarafından önerilmiştir. GC-MS analizden önce idrar örneklerinden metamfetaminin ekstraksiyonu ve ön deriştirilmesi için değiştirilebilir hidrofilik solvent bazlı homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Değiştirilebilir çözücü bazlı mikroekstraksiyon sürecinde ilk kez, CO_2 gazı yerine asit çözeltilerinin uygulanması incelenmiştir. Metamfetamin için, gözlenebilme limiti (GL) ve tayin limiti (TL) sırasıyla, 1,5 µg/L ve 5,0 µg/L olarak hesaplanmıştır ve 5–1500 µg/L (r^2= 0.9994) aralığında bir doğrusallık elde edilmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği, insan idrar örneklerinde değerlendirilmiştir. Sekiz farklı analit derişimi eklenen idrar örneklerinde, elde edilen yüzde geri kazanımlar %97,40–101,24 aralığındadır [16].

1995 yılında, insan idrarı numunelerinden metamfetamin ve amfetamin tayini için sıvı kromatografisi kullanımını içeren analitik bir prosedür geliştirilmiştir. Türevlendirme reaktifi olarak, sodyum 1,2-naftokinon-4-sülfonat kullanılmıştır. Analitlerin ekstraksiyonu, elüsyon çözücüsü olarak metanol kullanılan bir katı faz ekstraksiyon (KFE) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Enstrümantal tespit, UV-Vis detektörlü bir HPLC sistemi ile yapılmıştır. 280 nm'de gözlenebilme limiti, metamfetamin için 2,0 ng/ml olarak bulunmuştur. Prosedür, 0,3–4,0 µg/ml aralığında amfetamin ve metamfetamin eklenen idrar numunelerine uygulanmıştır. Metamfetamin için 280 nm'de yüzde geri kazanım sonuçları, %76,6 ± 4,6 ile %104,0 ± 7,0 aralığındadır [391].

İnsan saçında metamfetamin ve metabolitlerinin eşzamanlı analizi için mikrodalga destekli ekstraksiyon, kimyasal türevlendirme ve sıvı kromatografi-elektrosprey tandem kütle spektrometrisi (LC-ESI-MS/MS) kullanan yüksek verimli bir yöntem geliştirilmiştir. Dansil klorür, türevlendirme ajanı olarak kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallığı ve analitik performansı döteryumlu dahili standartlar kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm analitler için yüksek korelasyon katsayı değerleri (r^2> 0,997) anlamlı doğrusal regresyonu göstermiştir. Metamfetamin için

GL değeri 15,0 pg/mg , TL değeri 45,0 pg/mg ve doğrusal aralık 45–5000 pg/mg olarak hesaplanmıştır. Yöntemin gerçek örneklere uygulanabilirliği saç örneklerinde test edilmiştir ve metamfetamin için %97,0±3,0–103,0±7,0 aralığında geri kazanım sonuçları elde edilmiştir [392].

Wang ve arkadaşları tarafından, 2005 yılında, gaz kromatografisi kütle spektrometrisi ile insan idrarı numunelerinde metamfetamin ve amfetamin enantiyomerlerinin tayini için eş zamanlı diastereomerik türevlendirme ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile izotop seyreltme kütle spektrometrisinin kombinasyonu gerçekleştirilmiştir. l-N-trifloroasetik -1-propil klorür ve pentafluoropropiyonik anhidrit, türevlendirme maddeleri olarak kullanılmıştır. İki analit için çizilen kalibrasyon doğrusu, iyi bir doğrusallık göstermiştir (45–1000 ng/mL ve 45–2000 ng/mL) ve GL ile TL değerleri sırasıyla 40,0 ng/mL ve 45,0 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Önerilen analitik prosedürün doğruluğu ve kesinliği, üç idrar numunesinde test edilmiştir ve analitlere ait hesaplanan derişimlerin, teorik derişim değerlerine göre bulunan bağıl standart sapma değerlerinin tümü %10'un altındadır [393].

Bir çalışmada, metamfetamin dahil olmak üzere kötüye kullanılan ilaçlar gibi toksikolojik öneme sahip bileşiklerin aynı anda belirlenmesi için bir strateji geliştirilmiştir. 57 farmasötik ve yasa dışı uyuşturucunun plazma örneklerinde hızlı ve basit bir şekilde tayini için LC-MS/MS sistemi kullanılmıştır. Numune ön işlemi, protein çökeltmesinden oluşmaktadır. Metamfetamine ait tayin limiti 20 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Plazma örneklerinde yüzde geri kazanım değerleri %100'e yakın bulunmuştur. Ayrıca, gerçek zehirlenme vakalarından toplam 470 örnek, geliştirilen yöntem kullanılarak analiz edilmiştir ve örneklerin %80'inde pozitif sonuçlar gözlemlenmiştir [394].

Negatif kimyasal iyonlaşma gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (NCI GC-MS) ile eser seviyede metamfetamin ve amfetaminin tayini amacıyla, mikrodalga destekli türevlendirmeyi optimize etmek için bir ortogonal dizi tasarımı geliştirilmiştir. Mevcut yöntemde, katı faz ekstraksiyon, mikrodalga destekli türevlendirme ile birleştirilmiştir. 2,3,4,5,6-pentaflorobenzoil klorür türevlendirme reaktifi olarak kullanılmıştır. Yapay idrara, farklı derişimlerde metamfetamin eklenmiş ve ardından kalibrasyon doğrusu oluşturmak için karşılık gelen

prosedürle analiz edilmiştir. Metamfetamin için kalibrasyon doğrusu, 0,9951 korelasyon katsayısı ile, 0.1–1000 ng/mL aralığında doğrusaldır ve gözlenebilme limiti 13,04 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntemin uygulanabilirliği, amfetamin tipi uyarıcıları kötüye kullanan şüphelilerden alınan idrar numunelerinde test edilmiştir ve sonuçlar, idrar örneklerinde eser miktarda amfetamin ve metamfetaminin tespiti için bu yöntemin yeterli duyarlılığını göstermiştir [395].

2008'de, fenuron dahil çeşitli fenilüre herbisitlerin pirinç ve mısır numunelerinde eser düzeydeki tayini için analitik bir yöntem geliştirilmiştir. 15 fenilüre herbisitin eş zamanlı tespiti, katı faz ekstraksiyonunun (KFE) ardından, UV ayrışımı ve sütun sonrası türevlendirme ile entegre HPLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. HPLC ayrımı, su-asetonitril gradyan elüsyonu ile bir C18 kolonunda uygulanmıştır. Fenuron için alıkonma süresi 9,857 dakika olarak kaydedilmiştir. Optimum koşullar altında uygulanan matriks eşleştirme metodu sonucunda fenurona ait gözlenebilme limiti ve tayin limiti sırasıyla, pirinç numunelerinde 0,003 mg/kg ; 0,010 mg/kg ve mısır numunelerinde 0,003 mg/kg ; 0,009 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Pirinç ve mısır numunelerinde fenuron için elde edilen yüzde geri kazanım değerleri ise, %84,5±6,5–99,5±3,0 aralığındadır [31].

Nehir ve deniz suyu numunelerinden fenuron ve diğer bir fenilüre herbisitin tayini için, Diaw ve arkadaşları tarafından, doğrudan bir lazer foto-indüklemeli floresans yöntemi geliştirilmiştir. Fenurona ait GL değeri 0,0015 µg/mL ve TL değeri 0,005 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yönteminin doğruluğunu değerlendirmek için nehir suyu ve deniz suyu üzerinde geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Nehir suyunda %101,0±4,8 ve deniz suyunda %103,0±9,1 geri kazanım değerleri elde edilmiştir [155].

2001 yılında, Gennaro ve arkadaşları, bileşiklerin termal ayrışmasını en aza indirdikleri ve fenilüreleri karşılık gelen izosiyanatlara dönüştürerek dolaylı olarak tayin ettikleri için fenuron, monuron, izoproturon ve linuron olmak üzere dört fenilürenin analizinde doğrudan GC kullanmışlardır. İzosiyanattaki maksimum verimler, asetik anhidrit varlığında elde edilmiştir. Mevcut çalışmanın amacı, programlanabilir basınç kontrollü konvansiyonel sıcak splitless enjektörler kullanarak tipik fenilüre pestisitlerinin (fenuron, monuron, isoproturon ve linuron)

kalitatif ve kantitatif tayini için GC-MS metodolojilerini geliştirmek ve optimize etmektir [51].

Fenuron ve diğer 15 fenilüre herbisit ve bunların ana metabolitlerinin toprak örneklerinde eş zamanlı tayini için elektrosprey iyonizasyon modunda sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi ($LC–MS^2$)'ne dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Fenuron için gözlenebilme limiti değeri 0,1 ng/g olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğu, 50 ng/g örnek eklenmiş toprak numunelerinde test edilmiştir. Tüm herbisitler için toprak numunelerinde elde edilen ortalama geri kazanımlar %76,2±2,1 ila %107,9±5,8 arasında değişmiştir [28].

3

MATERYAL VE METOT

3.1 Kimyasallar ve Reaktifler

Çalışmalar boyunca kullanılan tüm kimyasalların saflıkları ve markaları Tablo 3.1'de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm standart çözeltiler, Elga Flex 3 marka su arıtma sisteminden temin edilen ultra saf deiyonize su (18.2 MΩcm özdirenç) kullanılarak 1000 mg/kg standart stok çözeltilerinden seyreltilmiştir. IS^{4}MS yöntemi için, tüm kalibrasyon ve numune karışımları bir OHAUS PA114C analitik terazisi ile gravimetrik olarak hazırlanmıştır. Metamfetamin ve metamfetamin asetamid-d_3, *Bölüm 3.3.1'*de sunulan prosedüre göre sentezlenmiştir ve tüm çalışmalar için katı standartlar olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1 Metamfetamin ve fenuron tayininde kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	Saflık	Marka
Fenuron ($C_9H_{12}N_2O$)	≥%99	Dr.Ehrenstorfer GmbH,Almanya
Asetik anhidrit	≥ %98,0	Merck, Almanya
Asetik anhidrit-d6	%99	Merck, Almanya
2-naftoil klorür	%98	Sigma Aldrich, ABD
Amonyak	%25,0 – 30,0	Merck, Almanya
Asetonitril (ACN)	≥ %99,8	Merck, Almanya
1,2-dikloroetan (DCE)	≥ %99,5	Merck, Almanya

Tablo 3.1 Metamfetamin ve fenuron tayininde kullanılan kimyasallar (devamı)

Diklorometan (DCM)	≥ %99.9	Merck, Almanya
Kloroform (CHL)	≥ % 99	Merck, Almanya
Metanol (MeOH)	≥% 99.9	Merck, Almanya
Etanol (EtOH)	%96	Merck, Almanya
Aseton (ACT)	≥% 99.8	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	≥% 97.0	Merck, Almanya

3.2 Cihazlar

3.2.1 Metamfetamin ve Metamfetamin-d_3

Metamfetamin ve metamfetamin-d_3'ün asetamid türevlerini ayırmak ve tespit etmek için Agilent 5973 model kütle spektrometresine bağlı Agilent 6890 model gaz kromatografisi kullanılmıştır (GC-MS). Metamfetamin ve döteryumlu formu için GC-MS koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir. MS sisteminden veri elde etmek için tarama modu (40–600 m/z) kullanılmıştır. Metamfetamin ve izotop analoğu için kalitatif/kantitatif iyonlar, sırasıyla, 58/100 ve 59/103 m/z'dir. SD-DO-SFME yöntemi için optimum koşullar, 58 m/z ile entegre pik alanlarına göre belirlenirken, izotop oranlarının hesaplanması amacıyla IS[4] çalışmalarında analit türevi ve izotopik bileşiği için 100 ve 103 m/z kullanılmıştır. Bir analiz için toplam çalışma süresi 12,0 dakika ve türevlendirilmiş analite ait alıkonma süresi 7,8 dakikadır.

Çalışma boyunca kullanılan santrifüj (BKC-TL5II/Biobase) ile ultrasonik banyo (UC-20SDII/ Biobase) Çin'den ve vorteks (model M1010002/IsoLab Laborgeräte GmbH Chemicals) Almanya'dan satın alınmıştır.

Tablo 3.2 Metamfetamin ve metamfetamin-d_3 için GC-MS koşulları

Parametre	Marka/Nitelik
Kolon	Agilent HP-5MS kapiler kolon. 30 m; 250 um iç çap; 0.25 um film kalınlığı
Taşıyıcı gaz	Helyum; 1,0 mL/dk
Enjeksiyon modu/hacmi	Splitless mod/1,0 uL
Sıcaklık programı	Başlangıç sıcaklığı 50 ℃ (1,0 dk tutulur) 25 ℃/dk ile 250 ℃'ye yükseltilmiştir. 30 ℃/dk ile 250 ℃'den 300 ℃'ye çıkarılmıştır.
MS iyon kaynağı sıcaklığı	230 ℃
MS kuadrupol sıcaklığı	150℃
Enjeksiyon portu sıcaklığı	250℃
MS transfer hattı sıcaklığı	290℃

3.2.2 Fenuron

*Bölüm 3.2.1'*de açıklanan aynı GC-MS sistemi, Tablo 3.3'te verilen parametrelere göre fenuron bileşiğinin kalitatif/kantitatif analizleri için kullanılmıştır. Fenuron türevi için kantitatif kütle/yük oranı (m/z) 247 ve alıkonma süresi 8,9 dakikadır.

Santrifüj (BKC-TL5II) ve ultrasonik banyo (UC-20SDII) Biobase'den (Zhangqiu, Çin), vorteks (model M1010002) IsoLab Laborgeräte GmbH Chemicals'dan (Eschau, Almanya) temin edilmiştir.

Tablo 3.3 Fenuron için GC-MS koşulları

Parametre	Marka/Nitelik
Kolon	Agilent HP-5MS kapiler kolon. %5 Fenil %95 dimetilpolisiloksan. 30 m x 250 µm x 0,25 µm
Taşıyıcı gaz	Helyum; 2,5 mL/dk
Enjeksiyon modu/hacmi	Splitless mod/2,0 uL
Sıcaklık programı	Başlangıç sıcaklığı 120 ℃'dir. 30℃/dk hız ile 200 ℃'ye yükseltilmiştir. 15 °C/dk hız ile 240 ℃'ye ve 30 ℃/dk hız ile 300 °C'ye çıkarılmıştır.
MS iyon kaynağı sıcaklığı	230 ℃
MS kuadrupol sıcaklığı	150℃
Enjeksiyon portu sıcaklığı	250℃
MS transfer hattı sıcaklığı	290℃

3.3 Deneysel Prosedürler

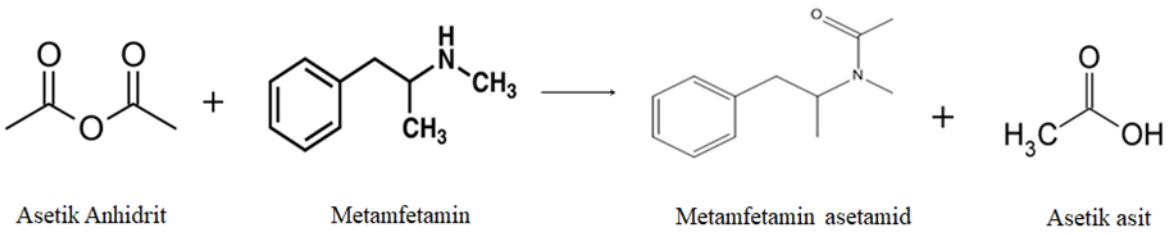
3.3.1 Metamfetaminin IS^4-SD-DO-SFME Yöntemi ile GC-MS Sisteminde Tayini

Çalışmanın bu bölümünden elde edilen veriler 'Journal of Pharmacological and Toxicological Methods' dergisinde basılmıştır [396].

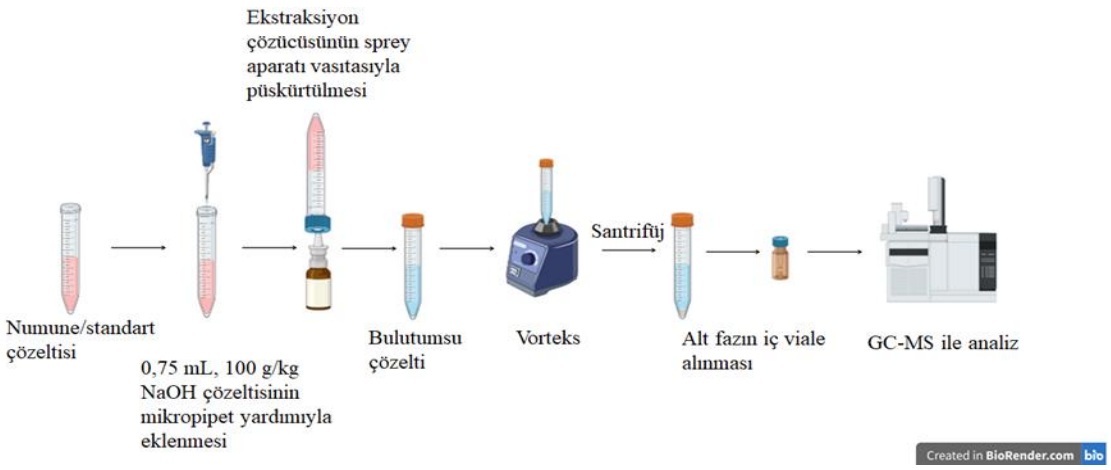
3.3.1.1 Metamfetamin için SD-DO-SFME Prosedürü

15 mL'lik bir santrifüj tüpü içerisine numune/standart çözeltisi (10 mL) konulmuş ve üzerine sodyum hidroksit çözeltisi (0,75 mL , 100 g/kg) eklenmiştir. Başka bir tüpte 1,2-dikloroetan içinde çözünmüş asetik anhidrit solüsyonu (%40, a/a) hazırlanmıştır ve püskürtme sisteminin çözücü haznesine eklenmiştir. Kullanılan püskürtme sistemi, çözücü haznesi, sprey pompası, transfer hattı ve püskürtme

başlığından oluşmaktadır. Ekstraksiyon çözücüsünün, numune/standart çözeltisi içeren tüpe püskürtülmesi amacıyla, delik açılmış bir santrifüj kapağı, püskürtme başlığına yerleştirilmiş ve santrifüj tüpü, bu kapak aracılığı ile püskürtme sistemine bağlanmıştır. Bu işlemden sonra, püskürtme sistemi ters çevrilerek, 1,2-dikloroetan içinde çözünmüş asetik anhidrit çözeltisi, standart çözeltisi içerisine 2 kez püskürtülmüştür. Sistemde, 1,2-dikloroetan ekstraksiyon çözücüsü ve asetik anhidrit ise türevlendirme ajanıolarak kullanılmıştır, böylece eş zamanlı türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Türevlendirmeye ait reaksiyonun kimyasal denklemi Şekil 3.1'de görülmektedir. Oluşan bulutumsu çözelti, ekstraksiyon çözücüsünün dağılımını ve türevlendirme verimini artırmak için 75 saniye boyunca vortekslenmiştir ve net bir faz ayrımı elde etmek için 2,0 dakika santrifüjleme yapılmıştır. Tüpün altında bulunan organik faz mikropipet ile iç viale alınarak GC-MS sistemine gönderilmiştir. Metamfetamin tayini için SD-DO-SFME-GC-MS sistemi Şekil 3.2'de verilmiştir.



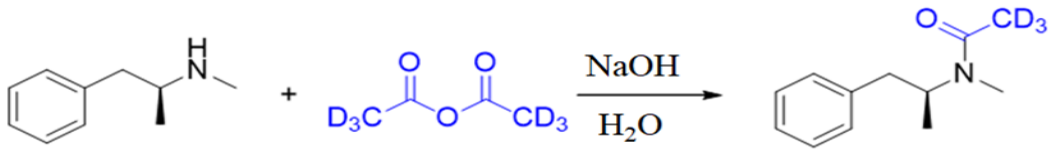
Şekil 3.1 Metamfetaminin türevlendirilmesine ait reaksiyonun kimyasal denklemi



Şekil 3.2 Metamfetamin tayini için SD-DO-SFME-GC-MS sistemi (grafiksel özet BioRender kullanılarak üretilmiştir) [351]

3.3.1.2 Metamfetamin Asetamid-d_3 Türevinin Sentezi

Analitin izotop bakımından zengin analoğu (metamfetamin asetamid-d3) sentezlenmiştir. Sentezlenen izotopça zengin analog, IS[4] çalışmalarında kullanılmıştır. 1,0 mmol (149 mg) metamfetamin bir Schlenk tüpüne tartılmıştır. Daha sonra tüpe 2,0 mL su içinde 1,5 mmol (60 mg) NaOH ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında karıştırılmıştır ve reaksiyon karışımına 1,0 mmol (108 mg) asetik anhidrit-d6 ilave edilmiştir. Tepkimenin tamamlanması için 30 dakika boyunca ultrasonikasyon uygulanmıştır. Reaksiyonun ilerleyişini izlemek için ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılmıştır. Karışım, kloroform (3x10 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Tüm organik fazlar birleştirilmiş ve magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuştur. Bu işlemden sonra, organik çözücü, indirgenmiş basınç altında uzaklaştırılmıştır. Sentezlenen ürün, beyaz bir katı şeklinde elde edilmiştir. Metamfetamin-d_3 asetamid sentezine ait kimyasal denklem Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Metamfetamin-d_3 asetamid sentezine ait reaksiyonun kimyasal denklemi

3.3.1.3 İnsan Serum ve İdrar Örneklerinin Hazırlanışı

Bu çalışmada kullanılan idrar ve serum örnekleri araştırma grubumuzdaki gönüllülerden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak veri toplama araçları ve yöntemlerine ilişkin bulgular 2022/05 numaralı toplantı kararı ile etik kurulu tarafından onaylanmıştır. Biyolojik örneklerdeki protein içeriğini çökeltmek için 2,0 g serum örneğine uygun miktarlarda standart çözelti ekleme işlemi sonrası 3,70 g asetonitril eklenmiştir. Numune çözeltisi daha sonra deiyonize su ile 7,0 g'a seyreltilmiştir. Santrifüjleme adımından sonra temiz bir santrifüj tüpüne 5,30 g süpernatant faz aktarılmış ve ultra saf su ile 35 g'a tamamlanmıştır. Böylece serum örneklerindeki metamfetamin derişimleri sırasıyla 7,3 ve 15,3 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Aynı prosedür 2,0 g eklenmiş idrar numuneleri için tekrarlanmıştır

ancak numunelere protein çökeltme aşaması sırasında 0,80 g derişik amonyak çözeltisi eklenmiştir. Eklenmiş idrar numuneleri için analit derişimi sırasıyla 7,7 ve 15,2 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Son olarak, geliştirilen SD-DO-SFME yöntemi *Bölüm 3.3.1.1'*de açıklanan optimum koşullar altında tüm örneklere uygulanmış ve GC-MS sistemi ile analiz edilmiştir.

3.3.1.4 SD-DO-SFME-IS^{4}MS Prosedürü

Tüm kalibrasyon ve numune karışımları, 0,10 mg çözünürlüğe sahip bir analitik terazi üzerinde gravimetrik olarak hazırlanmıştır. Gravimetrik yaklaşımın amacı, tekrarlanan ölçümlerin kesinliğini arttırmak ve doğru bir sonuç için numune hazırlığı sırasında oluşan hataları azaltmaktır. Numune ve kalibrasyon karışımları, Pagliano ve arkadaşları tarafından oluşturulan üç noktalı kalibrasyon stratejisine uygun şekilde, Tablo 3.4'te verilen kütle değerlerine göre hazırlanmıştır [389]. Numune çözeltileri (A), metamfetamin standart çözeltisi (A*) ve izotopik analog metamfetamin asetamid-d_3 (B) çözeltisinin miktarları matematiksel excel hesaplamalarına göre tartılmıştır. Doğrudan IS^{4}MS karışımları, aletli ölçümlerden önce 3,0 saat dengelenmeye bırakılmıştır. Ayrıca, numune karışımları, biyolojik bileşenlerin varlığından dolayı protein çöktürme adımına ihtiyaç duymaktadır. Çöktürme adımındaki ilave seyreltmeler dikkate alındığında, analitin ve izotopik analoğunun farklı stok çözeltileri kullanılarak numune ve kalibrasyon karışımları hazırlanmıştır (Tablo 3.5). Burada, numune karışımları, protein moleküllerini çöktürmek amacıyla asetonitril ve amonyak içermektedir.

İlk olarak, AB serum numunesi karışımları hazırlamak için 2,0 g serum numunesi (A) ve 2,0 g metamfetamin asetamid-d_3 (B) karıştırılmıştır. Daha sonra AB karışımına 4,90 g asetonitril ilave edilmiş ve ultra saf su ile 11,0 g'a tamamlanmıştır. Çöktürme işlemi için 5,5 kat matriks seyreltmesi hesaplanmıştır. Karıştırma ve faz ayrımı için 30 saniye vorteks ve ardından 30 dakika santrifüj uygulanmıştır. Daha sonra 1,76 g serum süpernatant fazı alınmış ve distile su ile 11,0 grama seyreltilmiştir. Serum numuneleri için toplam 41,5 kat matriks seyreltmesi elde edilmiştir.

İdrar örnekleri için, 2,0 g eklenmiş idrar örneği çözeltisi (A), 2,0 g metamfetamin asetamid-d_3 (B) ile karıştırılmıştır. AB karışımlarına asetonitril (2,80 g) ve

konsantre amonyak (0,70 g) ilave edilmiş ve ultra saf suyla 11,0 g'a seyreltilmiştir. Ardından 3,10 g süpernatan faz, distile su ile 11,0 g'a tamamlanmıştır. İdrar örnekleri için toplam 23,5 kat matriks seyreltmesi elde edilmiştir. Geliştirilen SD-DO-SFME yöntemi yukarıda belirtilen tüm karışımlara uygulanmıştır.

Tablo 3.4 Numune ve kalibrasyon karışımlarının hazırlanması için teorik kütle değerleri

	Karışımlar	**A*, g**	**A, g**	**B, g**	**Asetonitril, g**	**Amonyak, g**	**Toplam, g**
Kalibrasyon karışımları	A*B-1	3,0	-	1,0	-	-	11,0
	A*B-2	2,0	-	2,0	-	-	11,0
	A*B-3	1,0	-	3,0	-	-	11,0
Serum numune karışımı	AB	-	2,0	2,0	4,90		11,0
İdrar numune karışımı	AB	-	2,0	2,0	2,80	0,70	11,0

A: Metamfetamin standart çözeltisi*
A: Numune çözeltisi
B: Metamfetamin asetamid-d_3

Tablo 3.5 SD-DO-SFME-IS^{4}MS yönteminde kalibrasyon ve numune karışımları için kullanılan standart ve numune çözeltilerinin derişimi

Çözelti	**Düşük seviye (2,0 mg/kg)**	**Yüksek seviye (5,0 mg/kg)**
	Derişim, mg/kg	**Derişim, mg/kg**
A, Numune çözeltisi (idrar)	38,60	97,32
A, Numune çözeltisi (serum)	68,69	172,17
B (idrar)	38,99	97,46

Tablo 3.5 SD-DO-SFME-IS^{4}MS yönteminde kalibrasyon ve numune karışımları için kullanılan standart ve numune çözeltilerinin derişimi (devamı)

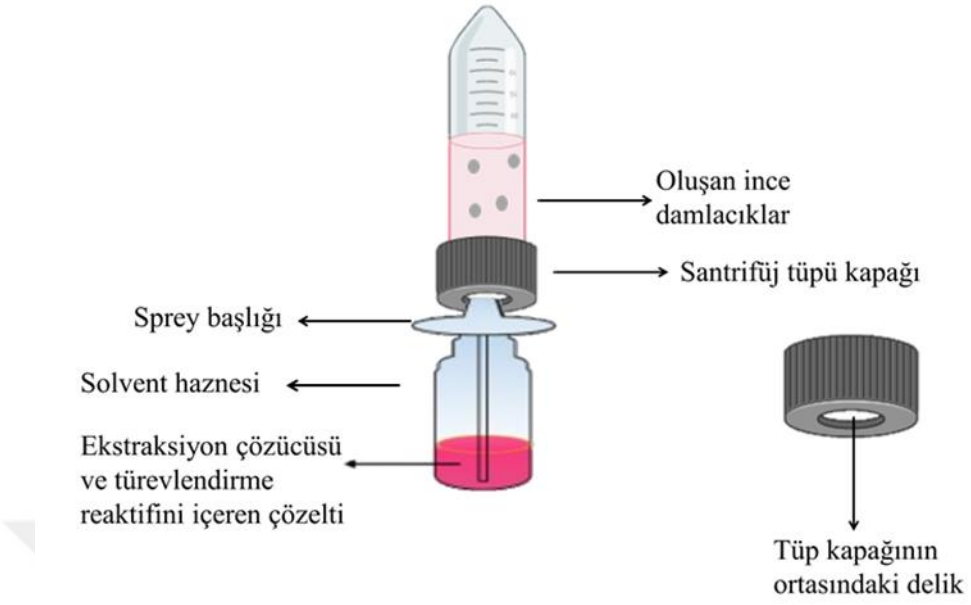
B (serum)	68,68	171,88
A*(Kalibrasyon karışımları için)	11,10	27,58
B (Kalibrasyon karışımları için)	11,14	27,60

3.3.2 Fenuronun SD-DO-SFME Yöntemi ile GC-MS Sistemlerinde Tayini

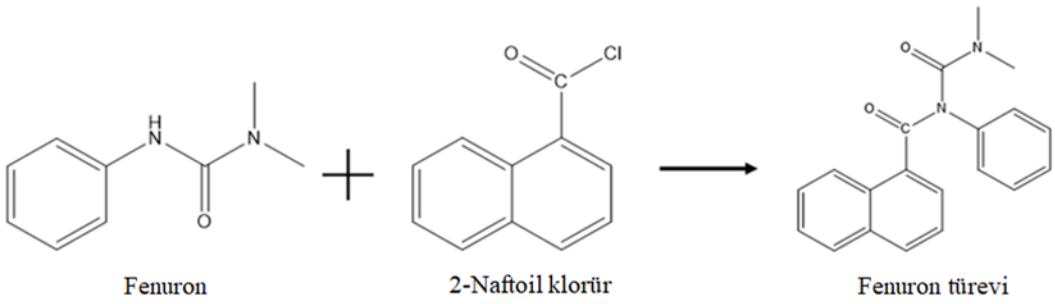
Çalışmanın bu bölümünden elde edilen veriler 'Environmental Monitoring and Assessment' dergisinde yayınlanmak üzere kabul edilmiştir [397].

3.3.2.1 Fenuron için SD-DO-SFME Prosedürü

12,0 mL numune/standart çözeltisi 15,0 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Bu çözeltiye 0,25 mL, 20,0 g/kg (a/a) NaOH çözeltisi eklenmiştir. %0,37 (a/a) aseton içeren kloroform içinde çözünmüş 2-naftoil klorür (%0,20 a/a) sulu çözeltiye püskürtme sistemi yardımıyla 2 kez püskürtülmüştür. Püskürtme sisteminin temsili bir görüntüsü Şekil 3.5'te sunulmuştur. Burada ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroform ve türevlendirme ajanı olarak 2-naftoil klorür kullanılmıştır. Bu nedenle, türevlendirme ve önderiştirme işlemleri tek aşamada gerçekleştirilmiştir. Fenuron ve 2-naftoil klorür arasındaki türevlendirme reaksiyonunun kimyasal denklemi Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Püskürtme işleminden sonra çözeltide bulutumsu bir çözelti gözlemlenmiştir. Sulu çözeltiden ekstraksiyon çözücüsüne analitin kütle transferini ve türevlendirme işleminin etkinliğini artırmak için 30,0 s ultrasonikasyonun ardından sulu ve organik fazların ayrılması için 2,0 dakika santrifüjleme işlemi (3461 g) uygulanmıştır. Organik faz mikropipet yardımıyla iç viale aktarılmış ve GC-MS sistemine gönderilmiştir.



Şekil 3.4 Püskürtme sistemi bileşenleri [398]



Şekil 3.5 Fenuron ve 2-naftoil klorür arasındaki türevlendirme reaksiyonunun kimyasal denklemi

3.3.2.2 Atık Su Örneklerinin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan iki farklı evsel atık su örneği, Türkiye'de bulunan Biyolojik Atık Su Arıtma Tesisi'nden temin edilmiştir. Numuneler bir polipropilen plastik şişede toplanmıştır ve 125 mm Sartorius filtre kağıdı ve 0,45 µm rejenere selüloz şırınga filtresi kullanılarak süzülmüştür. İki farklı atık su filtratı, bir buzdolabında 4,0°C'de saklanmıştır. Standart içeren numune çözeltileri, distile su ile toplam

matriks seyreltmesi 10 kat olacak şekilde 40 g'a tamamlanarak seyreltilmiş ve örneklerin içerdikleri asetonitril miktarı %0,75'e sabitlenmiştir.

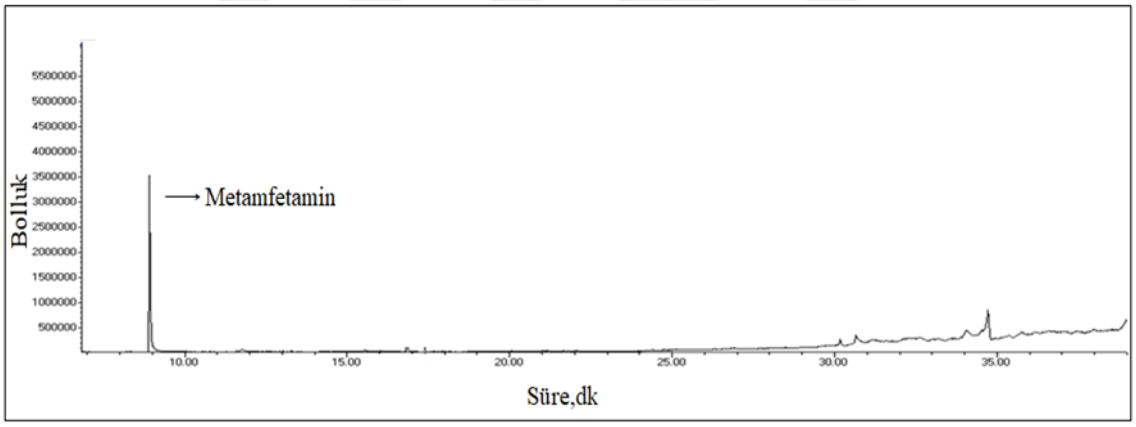
4

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

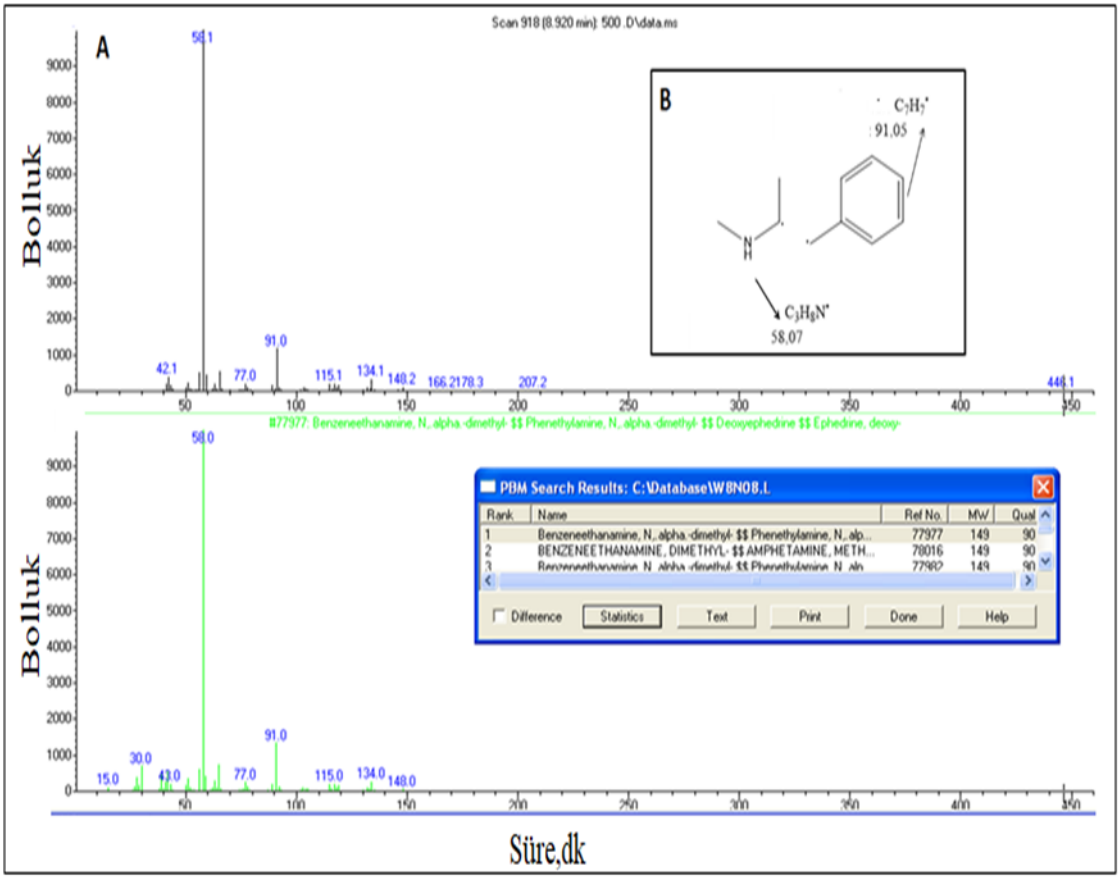
4.1 Metamfetamin

4.1.1 Kromatografik Tanımlama ve Türevlendirilmesine Ait Karakterizasyon

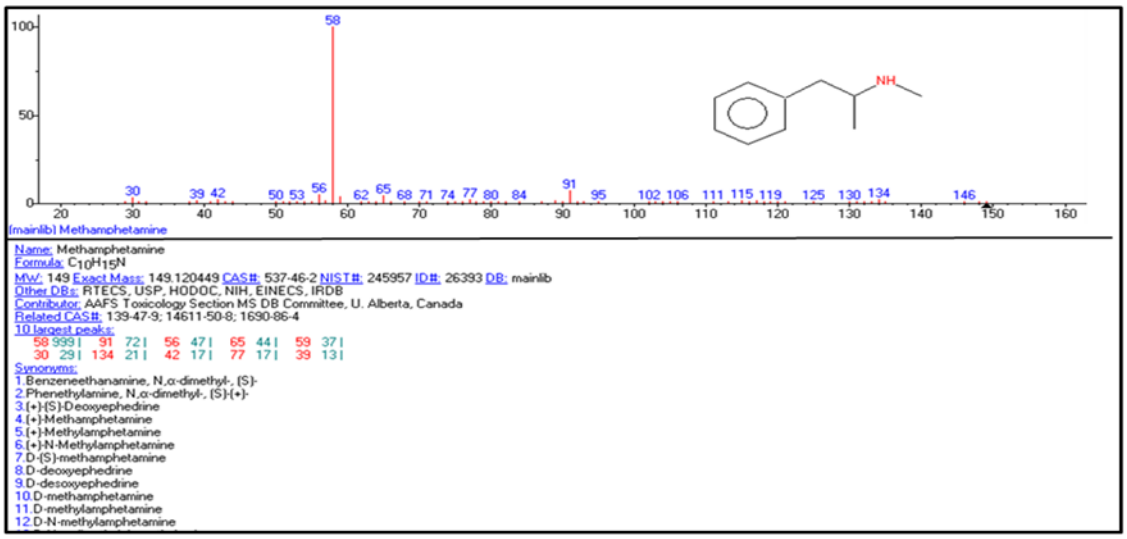
Sentezi gerçekleştirilen metamfetamin kristalinin saflık derecesinin tespiti amacı ile etanol içinde stok çözelti hazırlanmıştır. Gravimetrik yaklaşım ile hazırlanan 490,81 mg/kg stok çözelti, Tablo 3.2'de verilen kromatografik koşullar altında GC-MS ile analiz edilmiştir ve elde edilen kromatogram Şekil 4.1'de sunulmuştur. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere, ürünün kütle spektrumunun, MS kütüphanesi tarafından önerilen metamfetamin kütle spektrumu ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Metamfetamine ait alıkonma süresi 8,92 dakikadır ve kütle spektroskopi kaynak kütüphanesi verileri Şekil 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 Metamfetamin için GC-MS toplam iyon kromatogramı (TIC)



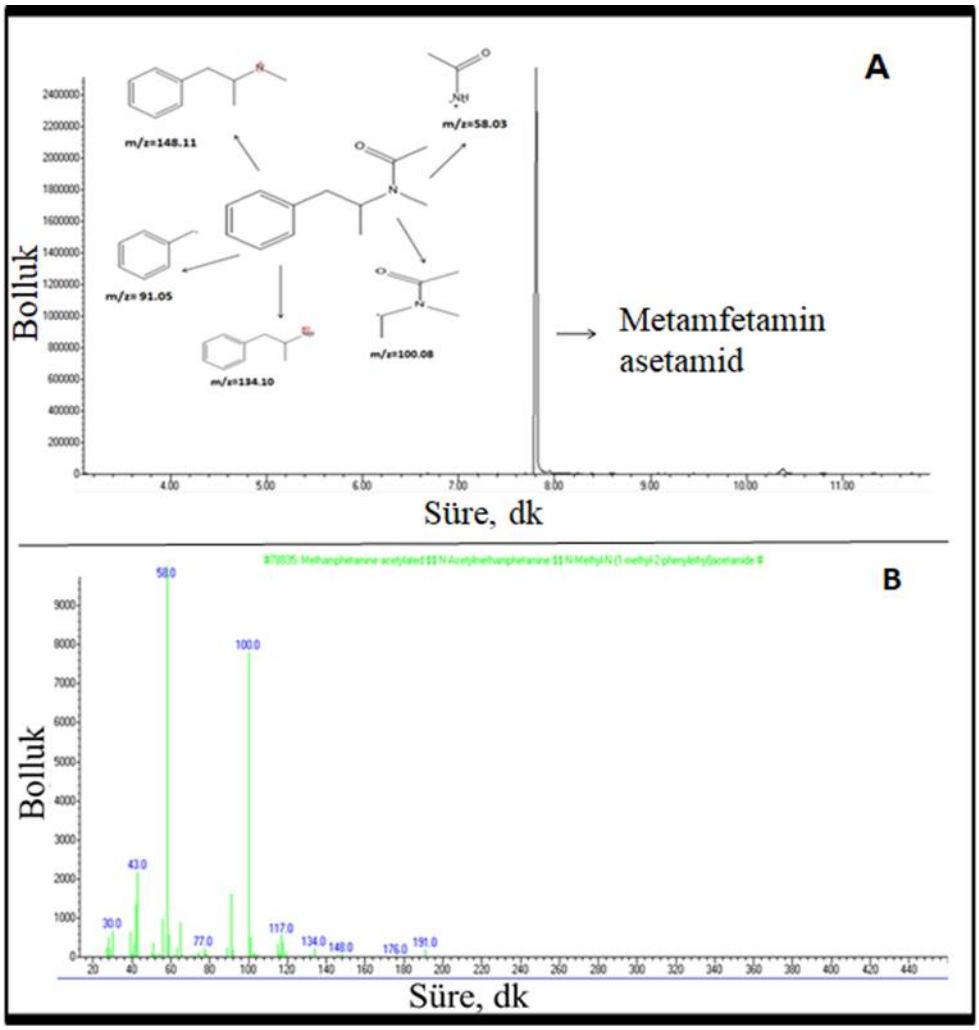
Şekil 4.2 Metamfetamine ait kütle spektrumu (A) ve parçalanma ürünleri (B)



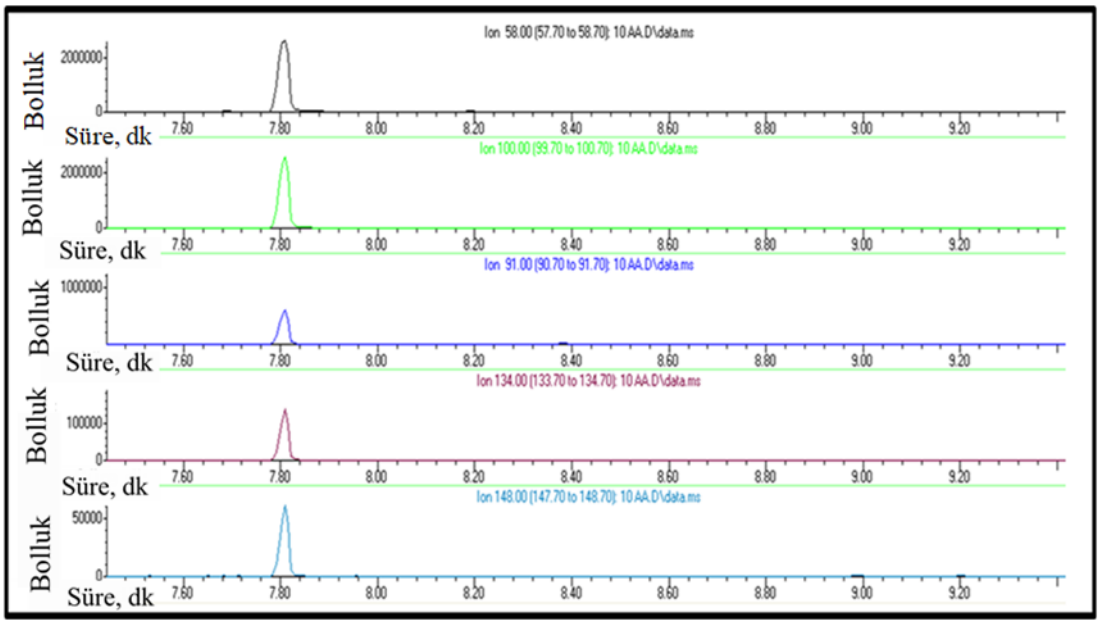
Şekil 4.3 Metamfetamine ait ChemStation MS kütüphane verileri

Metamfetaminin asetamid türevini elde etmek için türevlendirme reaktifi olarak asetik anhidrit kullanılmıştır ve metamfetamin, *Bölüm 3.3.1.1*'de verilen prosedüre göre türevlendirilmiştir. GC-MS sistemi ile elde edilen kütle spektrumu ve kromatogramlar (Şekil 4.4) sonucu, metamfetamin asetamid alıkonma

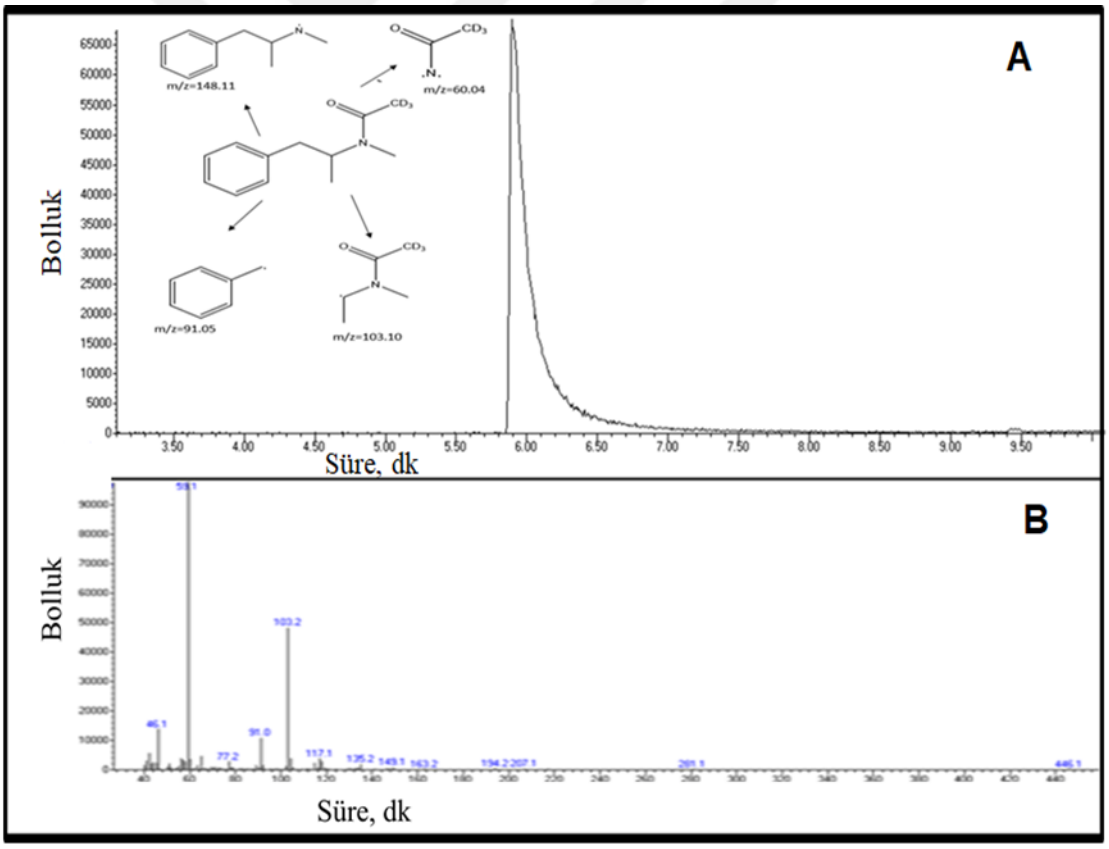
süresinin 7,8 dakika olduğu görülmüştür. Analitin türev formunun tanımlanması, aynı alıkonma süresinde örtüşen beş belirgin kütle fragmanıyla (58,0; 91,0; 100,0; 134,0; 148,0) gerçekleştirilmiş ve ChemStation kütle spektrum veri tabanı ile teyit edilmiştir. Beş farklı m/z değerinin üst üste çakıştırılmış seçili iyon görüntüleme modu kullanılarak alınan kromatogramlar Şekil 4.5'te verilmiştir. Tüm fragmantasyonlar arasında 58 ve 100 m/z, metamfetamin yapısında amid bağının varlığını kanıtlamıştır. *Bölüm 3.3.1.3*'de verilen prosedüre göre sentezi gerçekleştirilen metamfetamin asetamid-d3 (izotopik türev) için de Şekil 4.6'da görülebileceği gibi, 59 ve 103 m/z nedeniyle benzer parçalanma özellikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4 Metamfetamin asetamid türevi için GC-MS kromatogramı ve parçalanma ürünleri (A) ve kütle spektrumu (B)



Şekil 4.5 58,0; 91,0; 100,0; 134,0 and 148,0 m/z değerleri için üst üste çakıştırılmış kromatogramlar



Şekil 4.6 Metamfetamin asetamid-d3 için GC-MS kromatogramı (seçili iyon görüntüleme modu 103 m/z) ve parçalanma ürünleri (A) ve kütle spektrumu (B)

4.1.2 Optimizasyon ve Sistem Analitik Performans Çalışmaları

SD-DO-SFME yönteminin önemli parametreleri, ekstraksiyon ve türevlendirme verimini artırmak için tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı ile değerlendirilmiştir. Çalışmalar boyunca, her değişken için üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Optimum koşulları seçmek için ortalama ve standart sapma değerleri dikkate alınmıştır.

Tek değişkenli kalibrasyonda, bir analitik protokolün geliştirilmesi ve validasyonu sırasında sistem analitik performans değerlerini hesaplamak büyük önem taşımaktadır [399]. Sistem analitik performans değerlerinde en önemli hususlar, bağıl standart sapma yüzdesi (%BSS), doğrusal çalışma aralığı, korelasyon katsayısı (R^2), gözlenebilme limiti (GL) ve tayin limitini (TL) içermektedir [400]. Bu çalışmada kullanılan her sistemin analitik performansı, optimum koşullar altında kalibrasyon doğruları oluşturularak değerlendirilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı, korelasyon katsayısının (R^2) 0,999'dan büyük olması esas alınarak belirlenmiştir ve kalibrasyon doğrularının en düşük derişimlerinin, 10'a eşit veya daha büyük (S/N≥10) bir sinyal/gürültü oranına (S/N) sahip olması sağlanmıştır. GL, TL ve %BSS değerlerini hesaplamak için, kalibrasyon grafiklerinden en düşük derişimin altı tekrarlı ölçümünün ortalama (x) ve standart sapma (s) değerleri kullanılmıştır. Hesaplamalar için aşağıdaki matematiksel denklemler kullanılmıştır:

$$GL = \frac{\mathbf{3}.\boldsymbol{s}}{\boldsymbol{m}} \quad (4.1)$$

$$TL = \frac{\mathbf{10}.\boldsymbol{s}}{\boldsymbol{m}} \quad (4.2)$$

$$\%BSS = \frac{\boldsymbol{s}}{\boldsymbol{x}} \times 100 \quad (4.3)$$

Burada m, kalibrasyon doğrusunun eğimi, s, ölçümlerin standard sapması ve x ölçümlerin ortalamasıdır.

Ayrıca, geliştirilen yöntemin gerçek örneklere uygulanabilirliğini ve doğruluğunu kanıtlamak geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yüzde geri kazanım (%GK) sonuçları Denklem 4.4'te verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%GK=\frac{C_D}{C_T} \text{ x } 100 \quad (4.4)$$

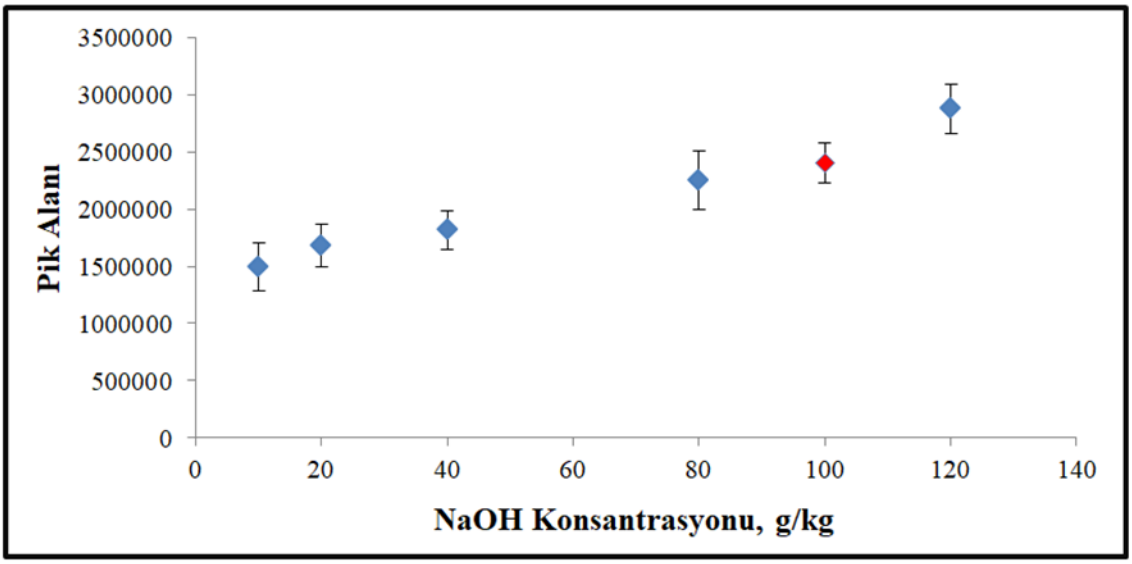
Burada, C_D, uygulanan kalibrasyon tekniği üzerinden hesaplanan analitin deneysel derişimini, C_T ise, numune içerisine teorik olarak eklenen analitin derişimini temsil etmektedir.

Kullanılan matrikslerin karmaşık doğasından kaynaklanan girişim etkileri mevcut olabilmektedir. Bu çalışmada, matriks bileşenlerinin geri kazanım sonuçları üzerindeki etkisi, gerçek örneklerdeki ($A_{örnek}$) analit pik alanlarından elde edilen yüzde oranın standart çözeltilere ($A_{standart}$) bölünmesiyle değerlendirilmiştir. Yüzde matris etkisinin (%ME) hesaplanması için Denklem 4.5 kullanılmıştır.

$$\%ME = \left(\frac{A_{örnek}}{A_{standart}} - 1\right) \text{ x } 100 \quad (4.5)$$

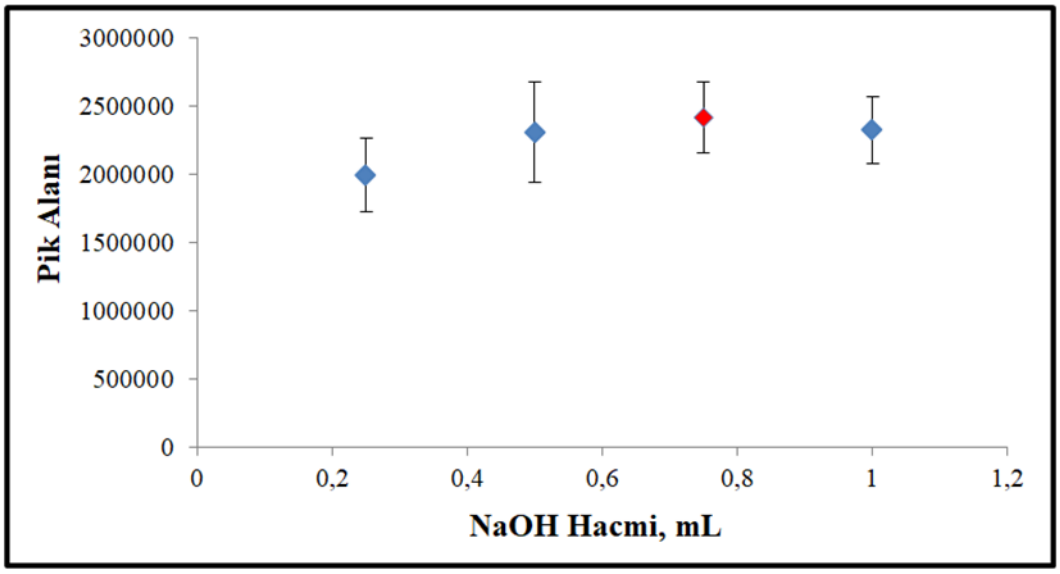
4.1.2.1 Sodyum Hidroksit Derişimi ve Hacmi Optimizasyonu

Metamfetaminin asetik anhidrit ile reaksiyonu sonucunda analitte bir C-N bağı oluşmaktadır. Böylece, reaksiyon ortamında serbest halde bulunan H^+ iyonu ve asetat, asetik asit meydana getirmektedir ve ortamın pH değeri düşmektedir. Bu çalışmada, türevlendirme reaksiyonu için bazik bir ortam elde etmek üzere standart/numune çözeltisine sodyum hidroksit eklenmiştir. NaOH derişim optimizasyonu, ortamın pH değerini ayarlamak ve türevlendirme sürecini verimli kılmak için önemlidir. Bu amaçla 10, 20, 40, 80, 100 ve 120 g/kg derişimlerinde sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanarak test edilmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi pik alanlarında, artan derişim seviyeleri boyunca doğrusal bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek pik alanı 120 g/kg için gözlemlenmekle birlikte, ekstraksiyon aşaması sırasında ara fazda çökelme olma olasılığı göz önünde bulundurularak ve bu oluşan çökelme faz alımını güçlendireceği için optimum derişim 100 g/kg sodyum hidroksit olarak seçilmiştir.



Şekil 4.7 Sodyum hidroksit derişiminin optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,5 mg/L / 8,0 mL, NaOH hacmi: 0,5 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %20,82 (a/a)/ 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s

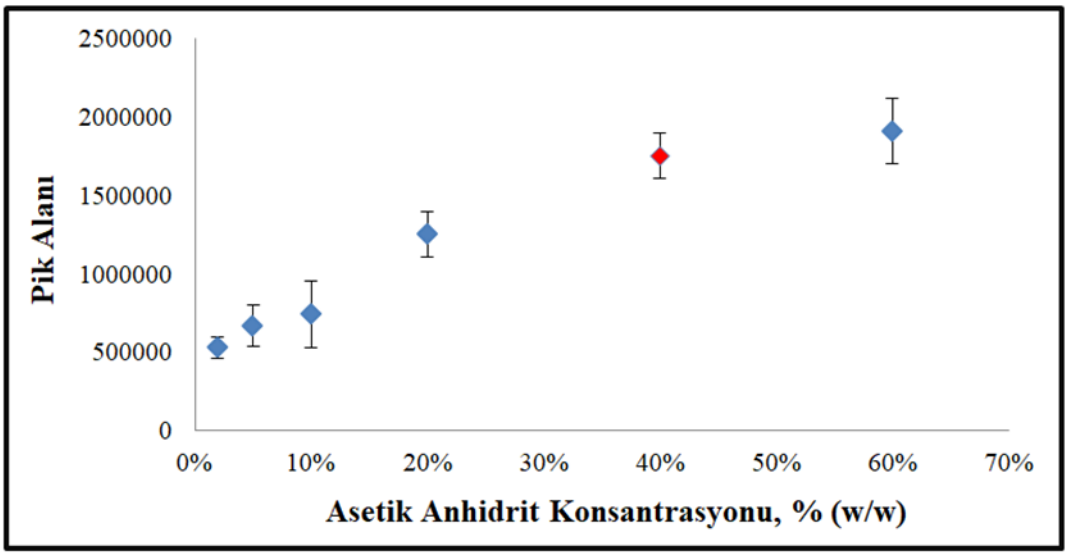
Ayrıca, 0,25 ve 1,0 mL aralığında farklı sodyum hidroksit hacimleri test edilmiştir. Ek olarak, NaOH eklemesi yapılmadan ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve analite ait herhangi bir sinyal elde edilememiştir. Yapılan deneyler sonucunda 0,50, 0,75 ve 1,0 mL NaOH hacimlerinden benzer analitik sinyaller elde edilmiştir (Şekil 4.8) fakat 0,50 mL NaOH hacmi kullanılmasının yüksek standart sapmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda, optimum değer olarak 0,75 mL seçilmiştir.



Şekil 4.8 Sodyum hidroksit hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,5 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi: 100 g/kg, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %20,82 (a/a)/ 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s

4.1.2.2 Asetik Anhidrit Derişim Optimizasyonu

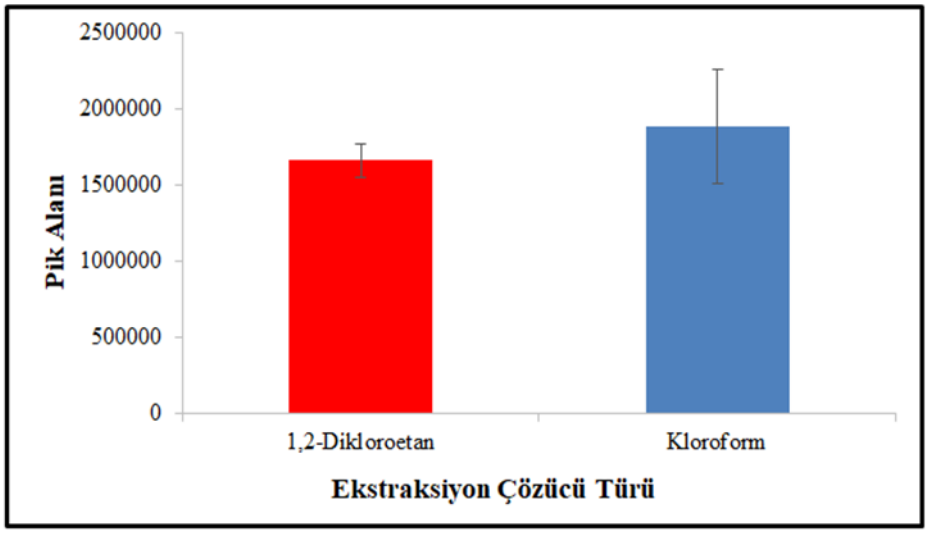
Analitin asetamid türevini elde etmek için türevlendirme reaktifi olarak asetik anhidrit kullanılmıştır. 1,2-dikloroetan içinde çözülen asetik anhidrit, aynı zamanda bir ekstraksiyon çözücüsü olarak da işlev görmektedir ve analitin polaritesini azaltarak ekstraksiyon verimini arttırmaktadır. Türevlendirme verimini artırmak için asetik anhidrit çözeltisinin derişimi optimize edilmiştir. Bu amaçla, asetik anhidritin %2,0; %5,0; %10; %20; %40; %60 ve %80 (a/a) olmak üzere farklı derişimleri ile deneyler yapılmıştır. %80 (a/a) asetik anhidrit çözeltisi için organik faz elde edilememiştir ve bu durum, çözeltinin hazırlanmasında kullanılan organik çözücü miktarının düşük olmasından kaynaklıdır. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, her derişim değeri için elde edilen pik alanlarına göre, %40 ve %60 derişim değerleri için önemli bir fark yoktur. Bu nedenle, asetik anhidrit derişimi için optimum değer olarak %40 seçilmiştir.



Şekil 4.9 Asetik anhidrit derişimi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit çözücüsü: 1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s

4.1.2.3 Ekstraksiyon Çözücüsü Seçimi Optimizasyonu

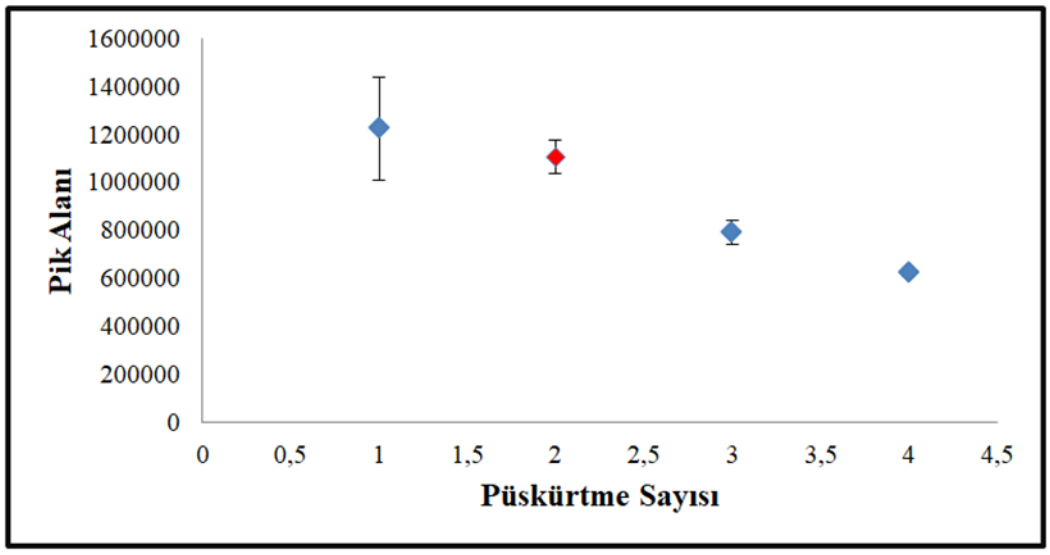
Uygun bir ekstraksiyon çözücüsünün seçilmesi, ekstraksiyon ve türevlendirme verimliliğini doğrudan etkilediği için sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri için çok önemlidir. Ekstraksiyon çözücüsünün polaritesindeki farklılık, sulu çözeltiden ayrılmayı mümkün kılmaktadır ve numune hacmine göre düşük hacimlerin kullanılması, analitin zenginleştirme faktörünü arttırmaktadır. İdeal bir ekstraksiyon çözücüsü, sulu çözelti ile karışmama, suda kolay dağılma, düşük uçuculuk ve düşük kaynama noktası özelliklerine sahip olmalı ve ilgili analiti ekstrakte edebilmelidir. Ayrıca, yoğunluğu sudan daha yüksek olan organik çözücüler, sulu çözeltinin altına toplandığı ve buharlaşma kaybını önlendiği için mikroekstraksiyon prosedürlerinde tercih edilmektedir [401], [402]. Burada kullanılan ekstraksiyon çözücüsü, ayrıca, türevlendirme reaktifini çözebilme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu amaçla, sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemlerinde en sık kullanılan iki ekstraksiyon çözücüsü, kloroform ve 1,2-diklorometan [403], optimize edilmiş ve ekstraksiyon kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu iki çözücü benzer pik alan değerleri vermiştir ancak 1,2-dikloroetan düşük standart sapma değeri nedeniyle optimum değer olarak seçilmiştir (Şekil 4.10)



Şekil 4.10 Ekstraksiyon çözücü türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi: %40 (a/a), Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 75 s

4.1.2.4 Püskürtme Sayısı Optimizasyonu

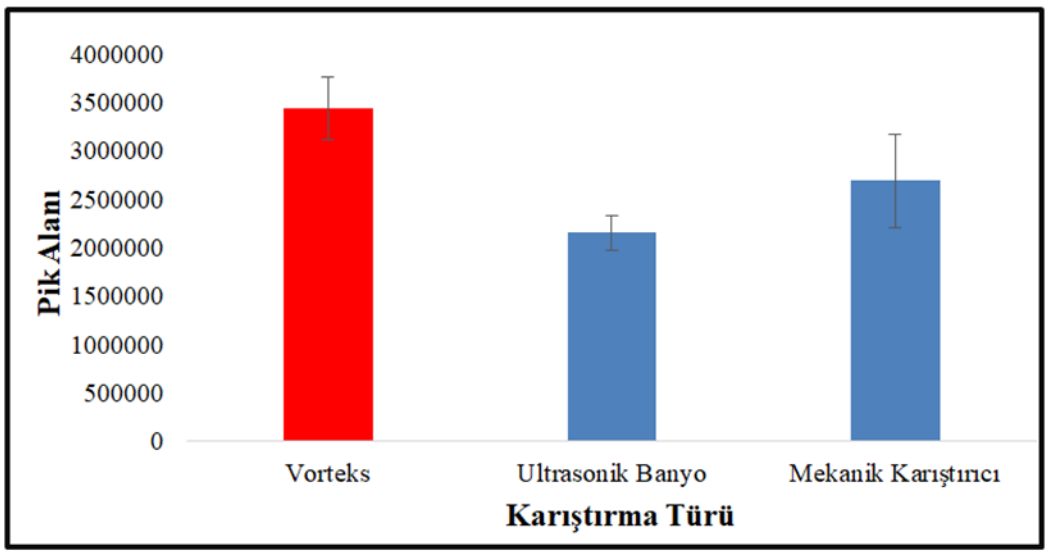
Klasik DSSME yönteminde, bir dağıtıcı çözücü (etanol, metanol, izopropil alkol) kullanarak, ekstraksiyon çözücüsünün ince damlacıklar halinde sulu faz boyunca dağılmasını içermektedir [404], [405]. Burada, dağıtıcı olarak ikinci bir çözücüye olan ihtiyaç klasik yöntemin ana dezavantajıdır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek amacıyla, günümüzde, dağıtıcı çözücüyü ortadan kaldıran ve organik çözücülerin hacminin en aza indirilmesine izin veren çeşitli çevre dostu analitik yöntemlere bir eğilim olmuştur. Toksik çözücü kullanımının minimuma indirilmesinin yanı sıra, maliyet ve zamandan tasarruf bu yöntemlerin diğer avantajlarıdır [406]. Çalışmada püskürtme aparatı, dağıtıcı çözücü kullanımını ortadan kaldırarak, sulu çözeltide ince organik çözücü damlacıklarının oluşturulması için kullanılmıştır. Türevlendirme reaktifi ayrıca püskürtme aparatı vasıtasıyla standart/numune çözeltisine püskürtülmüştür, böylece reaktifin türevlendirme reaksiyonu için hedef analit ile etkileşiminin arttırılması sağlanmıştır. Bu amaçla 1, 2, 3 ve 4 püskürtme sayıları test edilerek incelenmiştir. Şekil 4.11'den görülebileceği gibi pik alanları artan püskürtme sayıları ile azalmıştır. 1 kez spreylemeye kıyasla, 2 kez spreyleme için daha düşük standart sapma değerine sahip yüksek pik alanı elde edildiğinden, uygun püskürtme sayısı olarak 2 seçilmiştir.



Şekil 4.11 Spreyleme sayısı optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 30 s

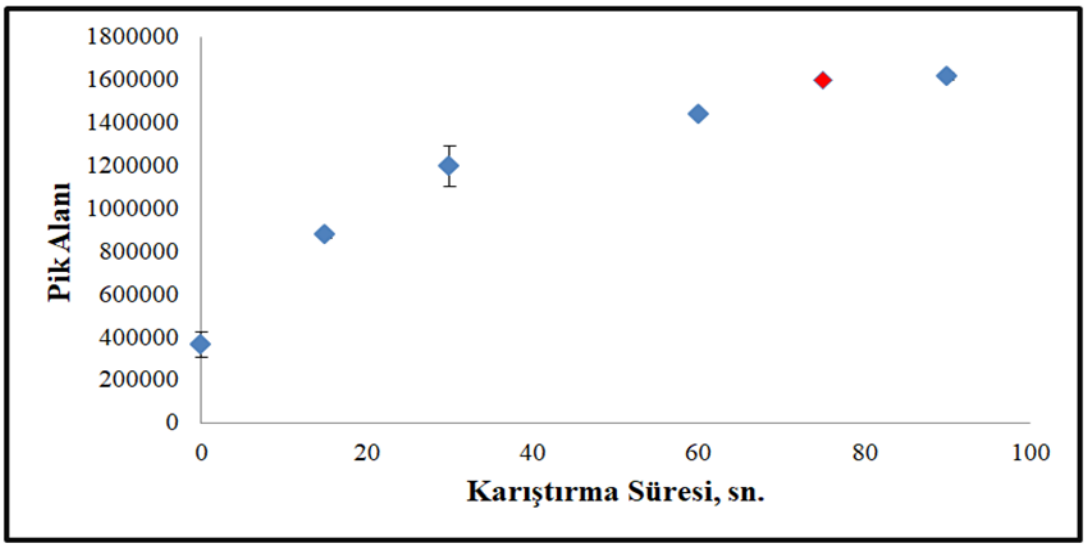
4.1.2.5 Karıştırma Türü ve Süresi Optimizasyonu

Karıştırma işlemi, analitin ve ekstraksiyon çözücüsünün dağılımını ve/veya etkileşimini iyileştirdiği ve çözücü moleküllerinin hareketini arttırdığı için önemlidir. Bu amaçla, karıştırma tipi olarak vorteks, mekanik çalkalayıcı ve ultrasonik banyo ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. El ile çalkalama da bir karıştırma tipi olarak optimize edilmiştir ancak herhangi bir faz ayrımı elde edilememiştir. Düşük standart sapma ve yüksek pik alan değerleri nedeniyle optimum karıştırma türü vorteks olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Karıştırma türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL , NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma süresi: 45 s

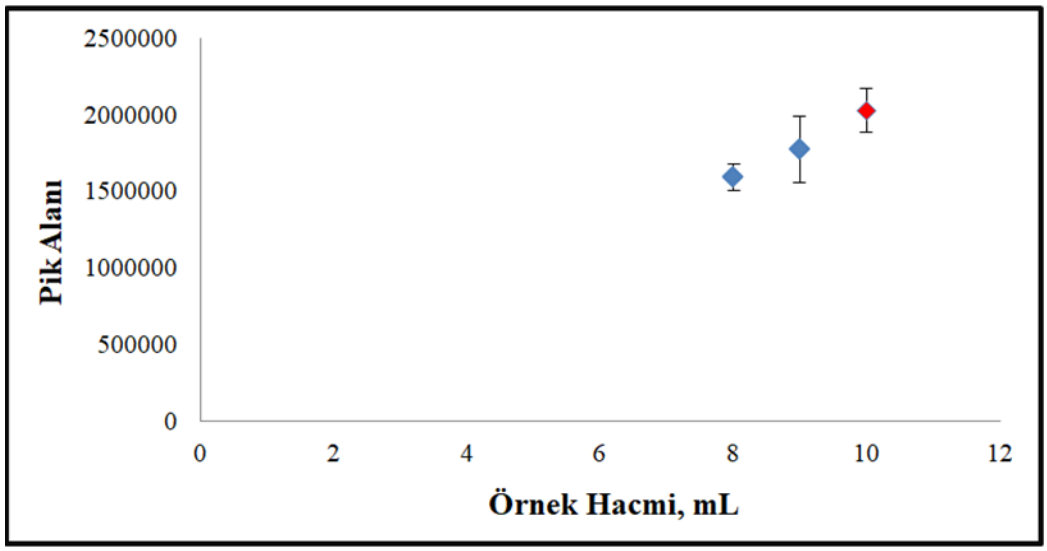
Karıştırma türü belirlendikten sonra, standart çözeltilere 15 s ile 90 s arasındaki farklı vorteks periyotları ayrı ayrı uygulanmıştır. Ayrıca, vorteks ile karıştırmanın sonuçlar üzerindeki etkisini göstermek amacıyla hiçbir karıştırma yapmadan da denemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13'te verilen deneysel sonuçlara göre, 75 ve 90 saniyeye ait pik alanları diğer değerlerden daha yüksek ve birbirine yakın çıkmıştır. Bu nedenle önerilen SD-DO-SFME yöntemi için optimum karıştırma süresi olarak 75 s seçilmiştir. Optimum değer, karıştırma uygulanmadan yapılan denemeler ile karşılaştırıldığında, kromatografik sinyaller için %22,8 artış kaydedilmiştir.



Şekil 4.13 Karıştırma süresi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 0,3 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü : %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü: vorteks

4.1.2.6 Örnek Hacim Optimizasyonu

Örnek hacminin, ekstraksiyon çözücüsündeki analit miktarını ve zenginleştirme faktörünü etkilediği iyi bilinmektedir [407]. 8,0 mL ile 11,0 mL aralığındaki numune hacimleri türevlendirilmiş ve SD-DO-SFME yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Ancak 11,0 mL için net faz ayrımı elde edilememiştir. Bu nedenle ileri çalışmalar için optimum değer olarak 10,0 mL seçilmiştir (Şekil 4.14).



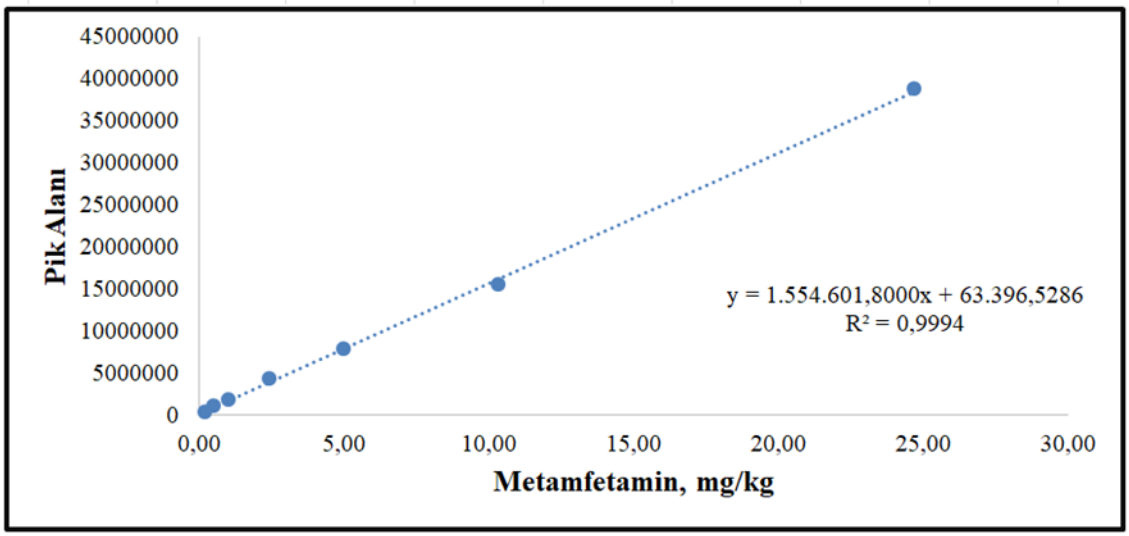
Şekil 4.14 Başlangıç numune hacminin optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi: 0,3 mg/L, NaOH derişimi/hacmi: 100 g/kg/ 0,75 mL, Asetik anhidrit derişimi/çözücüsü: %40 (a/a)/1,2-dikloroetan, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/süresi: vorteks/ 75 s

4.1.2.7 Sistem Analitik Performans Çalışmaları

Geliştirilen SD-DO-SFME yönteminin analitik performansını belirlemek için 0,20 mg/kg ile 100,0 mg/kg aralığında (9 farklı derişim) standard çözeltiler hazırlanmış ve Tablo 4.1'de verilen optimum koşullar altında önderiştirilerek en düşük derişimden en yükseğe doğru GC-MS sistemine gönderilmiştir. Önerilen yöntem için doğrusal aralık, 0,9994 belirleme katsayısı ile 0,20 – 25,0 mg/kg olarak bulunmuştur. Metamfetamin için GL ve TL değerleri sırasıyla 48,0 ve 159,9 µg/kg olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2) ve bu hesaplama sırasıyla *Denklem 4.1* ve *Denklem 4.2* kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca kalibrasyon doğrusundaki %BSS değeri, en düşük derişim için %7,2 olarak hesaplanırken, kalibrasyon grafiğindeki daha yüksek derişimler için %6,5'ten daha düşük olarak hesaplanmıştır ve böylece, geliştirilen SD-DO-SFME yönteminin kesinliği kanıtlanmıştır. Metamfetamin için elde edilen SD-DO-SFME-GC-MS sistemi kalibrasyon doğrusu Şekil 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.1 Tek değişkenli yaklaşımla belirlenen tüm optimum koşullar

Parametre	Optimum Değer
Örnek Hacmi	10 mL
NaOH Derişimi / Hacmi	100 g/kg / 0,75 mL
Asetik Anhidrit Derişimi / Çözücü Türü	%40 (a/a) /1,2-dikloroetan
Püskürtme Sayısı	2 kez
Karıştırma Türü / Süresi	Vorteks / 75 s



Şekil 4.15 Metamfetamin tayini için SD-DO-SFME-GC-MS kalibrasyon doğrusu

Tablo 4.2 Optimum koşullar altında SD-DO-SFME-GC-MS sistemi için sistem analitik performans değerleri

Gözlenebilme Limiti	0,0480 mg/kg
Tayin Limiti	0,1599 mg/kg
Doğrusal Aralık	0,20 – 25,0 mg/kg
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0,9994

Literatürde metamfetaminin, farklı birleştirilmiş teknikler aracılığıyla tayini geçekleştirilmiştir. 2017'de bir çalışma, metamfetamin, morfin ve kodein dahil

olmak üzere farklı ilaçlar için katı faz ekstraksiyon-sıvı kromatografi – tandem kütle spektrometresi önerilmiştir. Önerilen yöntem için GL ve TL değerleri sırasıyla 1,0 ng/mL ve 5,0 ng/mL olarak bulunmuştur [408]. Bununla birlikte, bu yöntemin birden fazla ekstraksiyon adımı ve yüksek çözücü tüketimi mevcuttur. Geliştirilen SD-DO-SFME yönteminde ise, analitin saflaştırılması ve önderiştirilmesi için yalnızca bir protein çökeltme aşaması ve 2 kez püskürtme işlemi yeterlidir. Bir başka çalışma da, GC-MS ile metamfetaminin belirlenmesi için iki farklı türevlendirme reaktifi (trifloroasetik asit ve heptaflorobütirik asit anhidrit) araştırılmıştır ve trifloroasetik asit ile heptaflorobutirik asit anhidrit türevlendirmesi için GL değerleri sırasıyla 0,20 ng/mg ve 2,5 ng/mg olarak bulunmuştur [409]. SD-DO-SFME yönteminde analit için türevlendirme reaktifi olarak asetik anhidrit kullanılmış ve üretilen türev eş zamanlı olarak SD-DO-SFME yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Öte yandan, yukarıda bahsedilen çalışmada metanol, etil asetat, izopropil alkol gibi yüksek hacimlerde organik çözücüler kullanılmıştır. Cao ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir başka yöntem, yüzey plazmon rezonans tekniğine dayanmaktadır. Yöntem, kompetitif bir inhibisyon immünolojik test ile metamfetaminin tayinini gerçekleştirebilmek için bir monoklonal antikora ihtiyaç duymaktadır. Bu yöntem için GL ve TL değerleri sırasıyla 0,13 ng/mL ve 0,49 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Önerilen yöntemle daha düşük GL ve TL değerleri elde edilmesine rağmen, yöntem pahalı kimyasallar içermektedir [15].

4.1.2.8 SD-DO-SFME Yönteminin Geri Kazanım Çalışmaları

İnsan serumu ve idrarı, çeşitli uyarıcı bileşiklerin insan vücudunda varlığını, oluşumunu, dağılımını ve/veya metabolizmasını değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan matrikslerdir [410]. Bu nedenle, geliştirilen SD-DO-SFME-GC-MS yönteminin uygulanabilirliğini ve doğruluğunu değerlendirmek amacıyla insan serumu ve idrarı örneklerinde geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, üç tekrarlı olacak şekilde, örneklerin analizleri gerçekleştirilmiştir ve analite ait hiçbir sinyal gözlemlenmemiştir. Örnke analizleri yapıldıktan sonra, serum ve idrar örneklerine iki farklı derişim seviyesi eklenerek *Bölüm 3.3.1.4'*de verildiği şekilde hazırlanmıştır ve ardından, optimum koşullar altında türevlendirme ve ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, protein içeriğini tamamen çökeltmek için asetonitril yüzdesinin önemli olduğu belirtilmelidir.

Yapılan denemeler sonucunda yüzde değer %50'den düşük olduğunda tam çökelme gerçekleşmemiştir ve organik faz elde edilememiştir. Aşırı bir asetonitril yüzdesi, ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözelti içindeki dağılımını arttırmıştır ve son derece düşük organik faza yol açmıştır. Geri kazanım çalışmaları sonucunda, 7,27 mg/kg ve 15,29 mg/kg derişimlerinde ekleme yapılan serum örnekleri için, standart sapmaları ile yüzde geri kazanım sonuçları sırasıyla %61,0 ± 0,3 ve %57,6 ± 1,2 olarak hesaplanmıştır. 7,72 mg/kg ve 15,20 mg/kg derişimlerinde ekleme yapılan idrar örnekleri için ise, geri kazanım değerleri sırasıyla %31,7 ± 1,4 ve %30,5 ± 3,8'dir. Serum ve idrar numunelerinin geri kazanım değerleri ile yüzde matriks etkileri Tablo 4.3'de verilmiştir ve bu değerler *Denklem 4.4* ve *Denklem 4.5* ile hesaplanmıştır. İdrar ve serum örneklerinin geri kazanım sonuçlarına göre, numuneler için matriks etkisinin yüzdesi %38,8 ile %69,3 arasında değişmektedir ve bu yüzde değerler analit üzerinde negatif matriks etkilerinin olduğunu göstermiştir. Ancak doğruluk ve kesinlik, izotop seyreltme stratejisi gibi üstün bir yöntemle geliştirilebilir. Bu amaçla IS^4 yöntemi, yüksek tekrarlanabilirlik ile kabul edilebilir geri kazanım sonuçları elde etmek için SD-DO-SFME yöntemiyle birleştirilmiştir.

Tablo 4.3 Serum ve idrar örneklerinde metamfetamin tayini için yüzde geri kazanım sonuçları ve matris etkileri

Örnek	Eklenen Derişim, mg/kg	Bulunan Derişim, mg/kg	%Geri Kazanım±Standart Sapma	%Matriks Etkisi
Serum	7,27	4,40	61,0 ± 0,3	-38,8
	15,29	8,80	57,6 ± 1,2	-42,3
İdrar	7,72	2,40	31,7 ± 1,4	-68,0
	15,20	4,60	30,5 ± 3,8	-69,3

4.1.2.9 SD-DO-SFME ve IS^{4}MS Yöntemlerinin Birleştirilmesi

IS^4 yöntemi için analitin izotopça zengin materyali olarak metamfetamin asetamid-d3 kullanılmıştır. Örnek (A) ve izotop açısından zengin materyal (B) karışımları, matriks etkilerini ortadan kaldırmak ve SD-DO-SFME yönteminin doğruluğunu ve kesinliğini arttırmak için hazırlanmıştır. Kalibrasyon ve örnek karışımları toplam kütle 11,0 g olacak şekilde, *Bölüm 3.3.1.5*'te detaylandırılan izotopik bileşimlere göre hazırlanmıştır ve 3,0 saatlik denge süresinden sonra, hazırlanan örnek ve kalibrasyon karışımlarına geliştirilen SD-DO-SFME yöntemi uygulanmıştır. Karışım hazırlama için kullanılan tüm deneysel kütle değerleri, Tablo 4.6-4.9'da özetlenmiştir. AB ve A*B karışımları için izotopik oranlar (r_{AB} ve r_{A*B}), metamfetamin pik alanının metamfetamin asetamid-d_3 pik alanına bölünmesiyle elde edilmiştir. Karışımların izotopik oran değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Pagliano ve diğerleri tarafından sunulan IS^4 matematiksel formulü [389], eklenmiş numunelerin deneysel derişimlerini hesaplamak için kullanılmıştır. Tablo 4.5'te gösterildiği gibi SD-DO-SFME-IS^4-MS yöntemi, %100'e yakın yüzde geri kazanım sonuçları ve düşük standart sapma değerleri nedeniyle yüksek kantitatif doğruluk ve kesinlik sağlamıştır. İdrar ve serum örnekleri için yüzde bağıl standart sapma değerleri ise %0,3 ile %1,5 arasında bulunmuştur. Dolayısıyla, IS^4 yöntemi ile negatif girişim etkisinin ortadan kaldırıldığı sonucuna varılabilmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, numune hazırlama adımlarından veya kromatografik şartlardan kaynaklanan tüm hataların, izotop seyreltme stratejisinin uygulanmasıyla karmaşık matrikslerde bile tamamen telafi edilebileceğini göstermiştir.

Tablo 4.4 Karışımların izotopik oran değerleri

	Karışımlar	**r_{A*B} / r_{AB} (2,0 ppm)**	**r_{A*B} / r_{AB} (5,0 ppm)**
Kalibrasyon Karışımları	A*B-1-a	1,4566	1,3803
	A*B-1-b	1,4736	1,3942
	A*B-1-c	1,4463	1,3134
	A*B-2-a	0,5131	0,4211

Tablo 4.4 Karışımların izotopik oran değerleri (devamı)

Kalibrasyon Karışımları	A*B-2-b	0,4981	0,3888
	A*B-2-c	0,4988	0,3998
	A*B-3-a	0,1631	0,1669
	A*B-3-b	0,1699	0,1595
	A*B-3-c	0,1752	0,1489
Numune Karışımları	AB-a (Serum)	0,5703	0,4500
	AB-b (Serum)	0,5652	0,4384
	AB-c (Serum)	0,5604	0,4532
	AB-a (İdrar)	0,3181	0,2782
	AB-b (İdrar)	0,3215	0,2629
	AB-c (İdrar)	0,3240	0,2630

Tablo 4.5 Serum ve idrar numunelerinde yüzde geri kazanım sonuçları ve bağıl standart sapma değerleri

	Teorik Derişim, mg/kg	**Deneysel Derişim, mg/kg**	**%Geri Kazanım**	**%BSS**
Serum	1,99	2,00	%100,2	%0,3
	4,98	4,95	%99,4	%1,5
İdrar	1,99	1,98	%99,7	%0,4
	5,01	5,01	%100,0	%0,7

Tablo 4.6 Düşük seviye (2,0 mg/kg) için kalibrasyon ve numune karışımı bileşimleri

Karışımlar	A*,g	B,g	A,g	Asetonitril,g	Amonyak,g	Toplam,g
A*B-1-a	3,0229	1,0086	-	-	-	11,0234
A*B-1-b	3,0037	1,0071	-	-	-	11,0082
A*B-1-c	3,0033	1,0079	-	-	-	11,0515
A*B-2-a	2,0167	1,9973	-	-	-	11,0401
A*B-2-b	2,0001	2,0181	-	-	-	11,0181
A*B-2-c	2,0063	2,0087	-	-	-	11,0268
A*B-3-a	1,0007	3,0019	-	-	-	11,0395
A*B-3-b	1,0095	2,9965	-	-	-	11,0366
A*B-3-c	1,0018	2,9987	-	-	-	11,0051
AB-1-S	-	2,0009	2,0036	5,4348	-	11,0728
AB-2-S	-	2,0105	2,0059	5,4053	-	11,0114
AB-3-S	-	2,0115	2,0099	5,4090	-	11,0616
AB-1-İ	-	2,0215	2,0055	3,0205	0,7048	11,0715
AB-2-İ	-	2,0074	2,0313	3,0808	0,6014	11,1952
AB-3-İ	-	1,9955	2,0254	3,0430	0,7199	11,0117

A: Metamfetamin standart çözeltisi*

B: İzotopik analog metamfetamin asetamid-d3

A: Numune çözeltileri

S: Serum

İ: İdrar

Tablo 4.7 *Tablo 4.6*'daki proses için, örnek çözeltilerinde matriks seyreltmeleri

Numune	Karışım	Supernatant,g	Toplam,g	A, mg/kg	Matriks Seyreltme
Serum	AB-a	1,7616	11,0247	1,99	6,3
	AB-b	1,7614	11,0213	2,00	6,3
	AB-c	1,7661	11,0337	2,00	6,2
İdrar	AB-a	3,1008	11,0364	1,96	3,6
	AB-b	3,1137	11,0536	1,97	3,5
	AB-c	3,1483	11,0077	2,03	3,5

Tablo 4.8 Yüksek seviye (5,0 mg/kg) için kalibrasyon ve numune karışımı bileşimleri

Karışımlar	A*,g	B,g	A,g	Asetonitril,g	Amonyak,g	Toplam,g
A*B-1-a	3,0072	1,0166	-	-	-	11,0246
A*B-1-b	3,0129	0,9961	-	-	-	11,0105
A*B-1-c	3,0012	1,0450	-	-	-	11,0006
A*B-2-a	2,0539	2,0010	-	-	-	11,0071
A*B-2-b	2,0280	2,0372	-	-	-	11,0140
A*B-2-c	2,0175	1,9998	-	-	-	11,0053
A*B-3-a	1,0070	3,0245	-	-	-	11,0708
A*B-3-b	1,0026	3,0022	-	-	-	11,0123

Tablo 4.8 Yüksek seviye (5,0 mg/kg) için kalibrasyon ve örnek karışımı bileşimleri (devamı)

A*B-3-c	1,0066	3,0142	-	-	-	11,0106
AB-1-S	-	2,0189	2,0076	4,9003	-	11,0238
AB-2-S	-	2,0089	2,0054	4,9044	-	11,0375
AB-3-S	-	1,9999	2,0062	4,9023	-	11,1677
AB-1-İ	-	1,9985	2,0059	2,8692	0,7018	11,0288
AB-2-İ	-	1,9906	2,0108	2,8023	0,7866	11,0261
AB-3-İ	-	1,9961	2,0157	2,8016	0,7089	11,0099

A: Metamfetamin standart çözeltisi*

B: İzotopik analog metamfetamin asetamid-d3

A: Numune çözeltileri

S: Serum

İ: İdrar

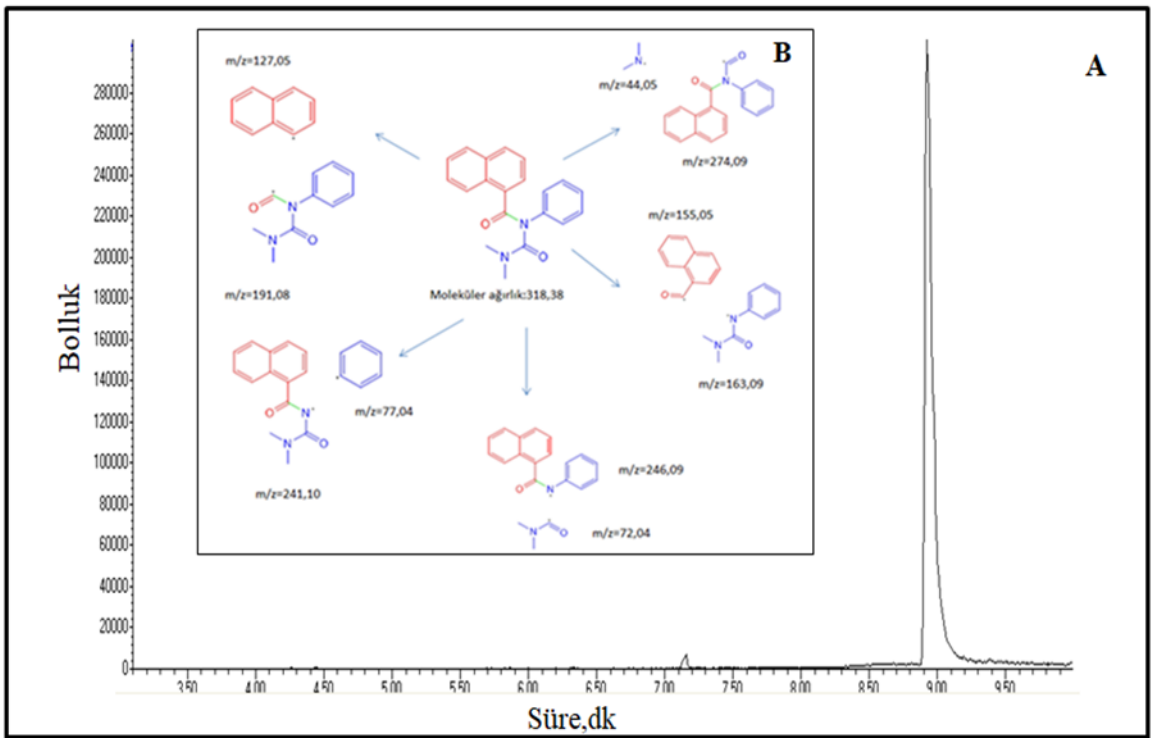
Tablo 4.9 *Tablo 4.8'*deki proses için, örnek çözeltilerinde matriks seyreltmeleri

Numune	**Karışım**	**Supernatant, g**	**Toplam,g**	**A, mg/kg**	**Matriks Seyreltme**
Serum	AB-a	1,7618	11,0323	5,01	6,3
	AB-b	1,7602	11,0182	5,00	6,3
	AB-c	1,7622	11,0302	4,94	6,3
İdrar	AB-a	3,1101	11,0250	4,99	3,5
	AB-b	3,1172	11,017	5,02	3,5
	AB-c	3,1038	11,0267	5,02	3,6

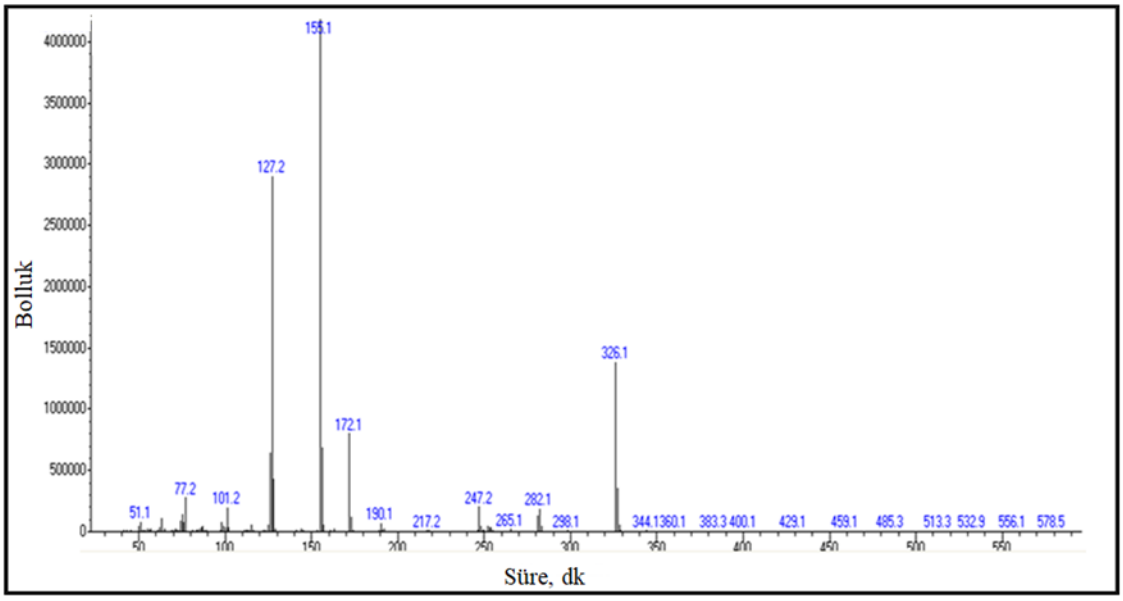
4.2 Fenuron

4.2.1 Kromatografik Tanımlama ve Türevlendirilmeye Ait Karakterizasyon

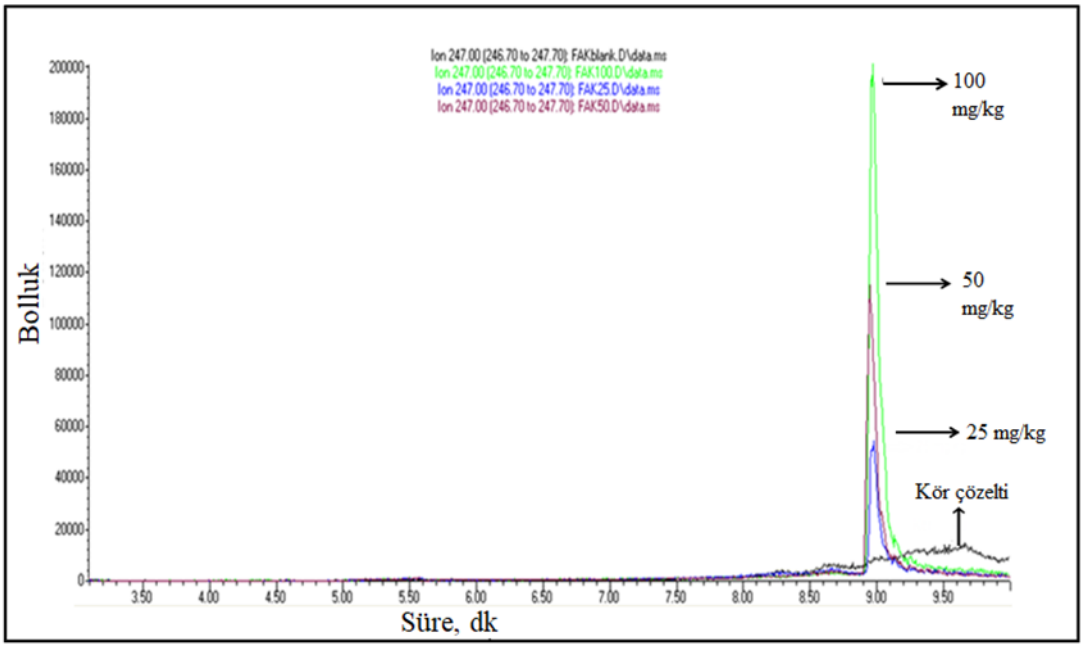
Fenuron bileşiği, *Bölüm 3.3.2.1*'de ayrıntılarıyla sunulan şekilde, 2-naftoil klorür ile türevlendirilmiştir. Fenuron üzerindeki amin grubu ile türevlendirme maddesi üzerindeki klorür arasındaki nükleofilik sübstitüsyon reaksiyonu, bazik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Türeve ait kromatogram, parçalanma ürünleri ve kütle spektrumu Şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir. Fenuron türevinin tüm parçalanma ürünleri, Şekil 4.17'de gösterilen kütle spektrumları ile doğrulanmıştır. 127 m/z ve 155 m/z oranına sahip pik bollukları yüksek olmasına rağmen, bu parçalanma ürünleri sadece türevlendirme ajanına aittir, ancak 247 m/z, türevlendirilmiş fenuronun bir parçalanma ürünüdür. Dolayısıyla türevlendirilmiş analit için kantitatif tayinler 247 m/z ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18'de seçili iyon izleme modu (247 m/z) kullanılarak, artan analit derişimlerine (25, 50 ve 100 mg/kg) ait üst üste çakıştırılmış kromatogramlar görülmektedir. Ek olarak, kör çözelti analizi gerçekleştirilmiş ve 247 m/z'e ait bir sinyal elde edilmemiştir.



Şekil 4.16 Türevlendirilmiş fenurona ait seçimli iyon izleme modu (247 m/z) ile elde edilen kromatogram (A) ve parçalanma ürünleri (B)



Şekil 4.17 Fenuron türevine ait MS spektrumu



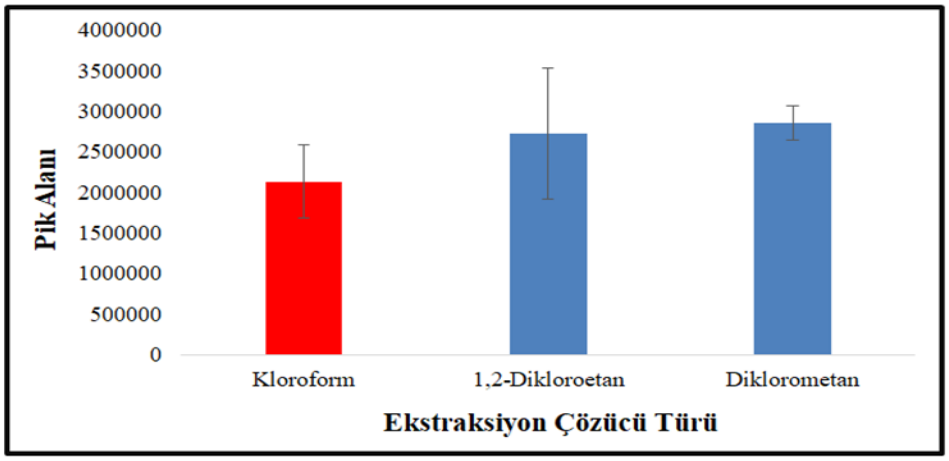
Şekil 4.18 Seçimli iyon izleme modu (247 m/z) kullanılarak, 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg fenuron derişimlerine ait üst üste çakıştırılmış kromatogramlar ve kör çözelti

4.2.2 Optimizasyon ve Sistem Analitik Performans Çalışmaları

Fenurona ait tüm optimizasyon ve validasyon çalışmaları *Bölüm 4.1.2*'de bahsedilen bilgiler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1 Ekstraksiyon Çözücü Türü Optimizasyonu

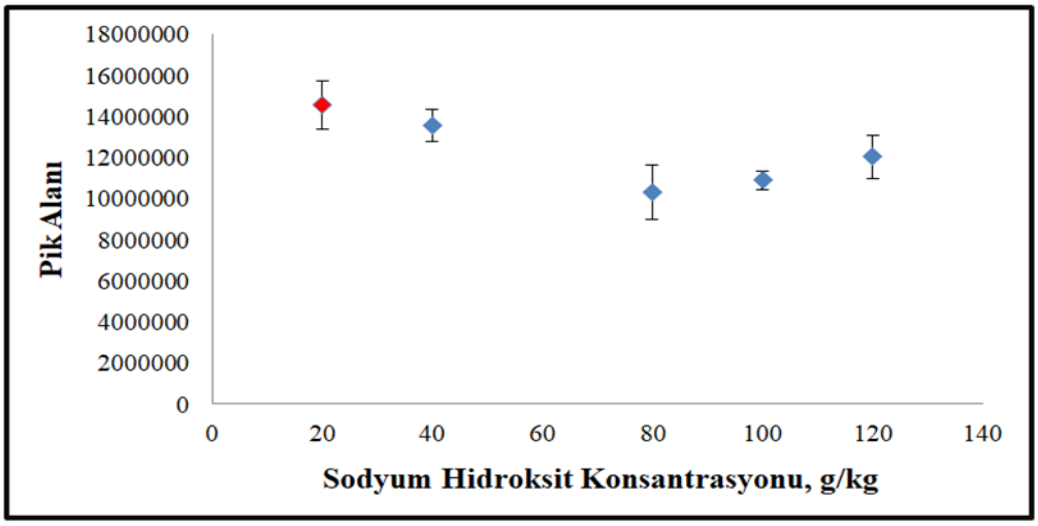
Sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan ekstraksiyon çözücüsünün türü, verimli ekstraksiyon için önemli bir husustur, çünkü zenginleştirme faktörü ve ekstraksiyon verimi, ekstraksiyon çözücü türünden doğrudan etkilenmektedir. Genel olarak, ekstraksiyon çözücü seçimi sırasında üç gereklilik vardır. İlk olarak, sudan daha yüksek yoğunluğa sahip olmalıdır. İkincisi, ekstraksiyon sırasında çözücü kaybını önlemek için suda düşük çözünürlüğe sahip olmalıdır ve son olarak uçucu olmamalıdır [411]. Literatürde, n-hekzan, ekstraksiyon çözücüsü olarak sıklıkla kullanılmaktadır, ancak düşük yoğunluğu nedeniyle ekstraksiyon çözücü ve diğer uçucu türlerin uçuculuğuna duyarlı olabilen bir üst faza yol açmaktadır [412]. Çalışmada, üç çeşit suda karışmayan çözücü, kloroform, 1,2-dikloroetan ve diklorometan optimize edilmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü üzere, diklorometan ile diğer çözücülere nazaran daha yüksek pik alanları ve daha düşük standart sapma değerleri elde edilmiştir. Ancak, türevlendirme ajanı 2-naftoil klorürün, 1,2-dikloroetan ve diklorometan içerisinde çözünmesi sırasında çökelti oluşumu gözlemlenmiştir ve bu nedenle, optimum çözücü türü olarak kloroform seçilmiştir.



Şekil 4.19 Ekstraksiyon solvent türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 40 g/kg/ 1,0 mL, 2-Naftoil klorür derişimi: %0,20 (a/a), Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s

4.2.2.2 Sodyum Hidroksit Derişim ve Hacim Optimizasyonu

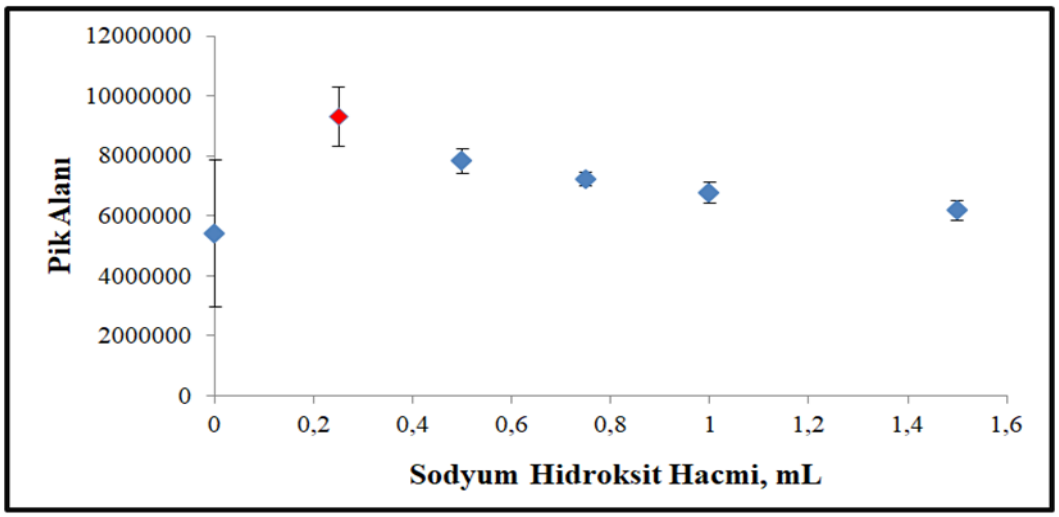
Literatürde, 2-naftoil klorür ile türevlendirme reaksiyonlarının bazik ortamda meydana geldiği bilinmektedir [413], [414] ve bu sebeple, SD-DO-SFME yöntemi uygulanmadan önce sulu çözeltiye sodyum hidroksit ilave edilerek bazik ortam sağlanmıştır. Sodyum hidroksit derişiminin türevlendirme ve ekstraksiyon işlemi üzerine etkilerini gözlemlemek amacıyla, 20, 40, 80, 100 ve 120 g/kg olmak üzere beş farklı derişimde NaOH çözeltileri hazırlanarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20'de verilen sonuçlar, en verimli ekstraksiyonun 20 g/kg derişimine sahip sodyum hidroksit çözeltisi ile gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. Görüldüğü üzere en yüksek pik alanı bu değerde elde edilmiştir, dolayısıyla optimum derişim olarak 20 g/kg seçilmiştir.



Şekil 4.20 Sodyum hidroksit derişim optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH hacmi: 1,0 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s

Optimum derişimin belirlenmesinin ardından, NaOH çözeltisinin hacmi optimize edilmiştir. Hacim optimizasyonu için 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,50 mL hacimlerinde, 20 g/kg derişiminde NaOH çözeltisi kullanılarak, ayrı ayrı denemeler gerçekleştirilmiştir. NaOH çözelti ilavesi olmadığı durum da test edilmiştir ve NaOH ilavesiz çözeltiye ait pik alanlarının, NaOH ilaveli çözeltilere göre daha düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür. En yüksek pik alanları 0,25 mL için elde edilmiştir ve bu değer optimum hacim olarak seçilmiştir (Şekil 4.21).

Artan sodyum hidroksit hacimleri ile, artan iyonik kuvvetten ve/veya sulu çözeltinin aşırı seyreltilmesinden kaynaklanabilecek pik alanlarında bir azalma gözlemlenmiştir.

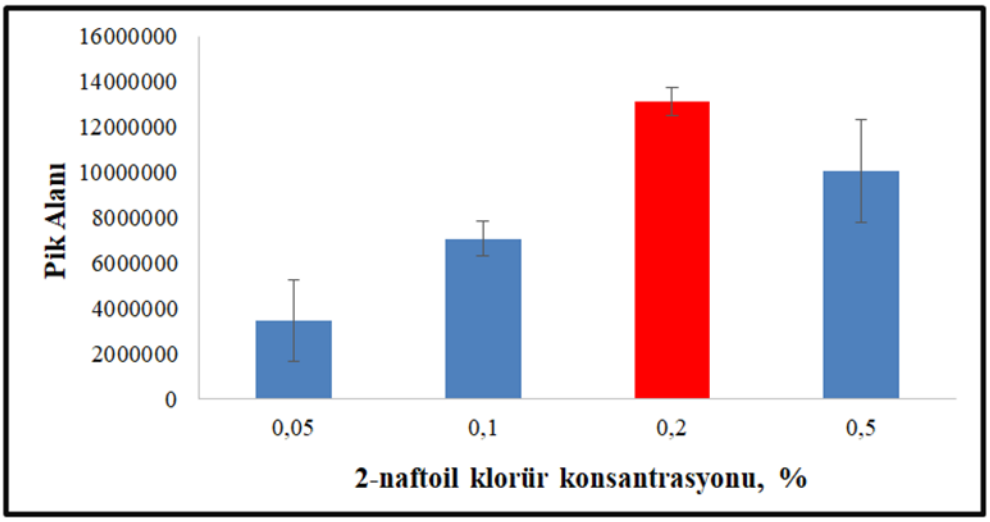


Şekil 4.21 Sodyum hidroksit hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi: 20 g/kg, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s

4.2.2.3 2-Naftoil Klorür Derişim Optimizasyonu

Fenuron bileşiğinin suda çözünürlüğü yüksektir ve polar bir yapıya sahiptir [415]. Bu nedenle sulu ortamdan ekstraksiyonu zor ve zahmetlidir. 2-naftoil klorür ile türevlendirme reaksiyonu, bileşiğin sudaki çözünürlüğünü ve polaritesini azaltarak ekstraksiyon etkinliğini arttırmaktadır ve böylece, polar analitin GC-MS sistemindeki hassasiyeti/seçiciliği de artmış olur. Geliştirilen SD-DO-SFME yönteminde, kullanılan ekstraksiyon çözücüsü içerisinde 2-naftoil klorür çözeltisi hazırlanmış ve sulu çözelti içerisine sprey aparatı ile püskürtülerek hem türevlendirme hem de ekstraksiyon işleminin eş zamanlı olarak yapılması sağlanmıştır. Bu nedenle, 2-naftoil klorür çözeltisinin kloroform (ekstraksiyon çözücüsü) içindeki derişimi, yüksek türevlendirme verimliliği elde etmek için optimize edilmelidir. Bu amaçla, %0,37 (a/a) aseton içeren kloroform içerisinde, %0,05, %0,10, %0,20 ve %0,50 (a/a) derişimlerinde 2-naftoil klorür çözeltileri hazırlanmıştır. Aseton ilavesinin amacı, 2-naftoil klorürü, kloroform içinde tamamen çözmektir. 2-naftoil klorürün çözünme işlemi, asetonsuz sadece kloroform ile sağlanamamıştır. Denemeler sonucunda %0,20 (a/a) derişimine

sahip türevlendirme ajanı çözeltisi en yüksek pik alanına ve en düşük standart sapma değerine sahip olmuştur (Şekil 4.22). Daha yüksek derişimlerde ise, kloroformun türevlendirme maddesi ile doygunluğu, fenuron türevinin ekstraksiyon veriminde bir azalma ile ilişkilendirilmiştir.

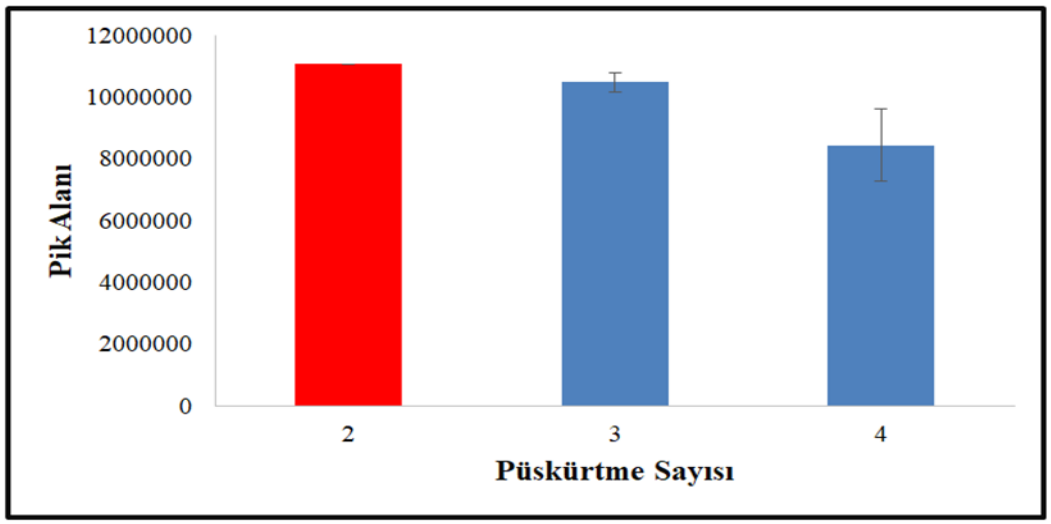


Şekil 4.22 2-Naftoil klorür derişimi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür çözücüsü: kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/15 s

4.2.2.4 Püskürtme Sayısı Optimizasyonu

Klasik sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemlerinde ekstraksiyon çözücü hacimleri, hedef analitin standart/numune çözeltisinden ekstraksiyon çözücüsüne daha yüksek kütle transferini sağlamak için optimize edilmektedir. Ancak SD-DO-SFME yönteminde, türevlendirme maddesini içeren ekstraksiyon çözücüsü, bir sprey aparatı kullanılarak sulu numune çözeltisine püskürtülmektedir ve kullanılan sprey aparatının ekstraksiyon çözücüsü hacimlerinin ayarlanması, manuel püskürtme opsiyonu nedeniyle mümkün değildir. Bu nedenle, ekstraksiyon çözücü hacmi yerine, püskürtme sayısı optimize edilmiştir. Püskürtme işleminin sayısı önemli bir parametredir, çünkü püskürtme aparatı ekstraksiyon çözücüsünün sulu çözelti içerisine homojen dağılmasını sağlamaktadır ve analit için analitik tepkileri doğrudan etkileyen türevlendirme reaktifini içermektedir. Optimizasyon işlemi 1, 2, 3 ve 4 kez püskürtme işlemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. 1 kez püskürtme işlemi ile yapılan denemeler

sonucunda belirgin bir organik faz elde edilememiştir. Şekil 4.23'te sunulduğu üzere, diğerlerine göre daha yüksek sinyal/gürültü oranları ve daha düşük standart sapma değerleri verdiği için 2 kez püskürtme optimum değer olarak seçilmiştir. 3 ve 4 kez gerçekleştirilen püskürtme işlemlerinde, ekstraksiyon işleminin sonunda artan organik faz miktarı, pik alanı değerlerindeki düşüş eğilimine sebebiyet veren aşırı seyreltmeye yol açmıştır.

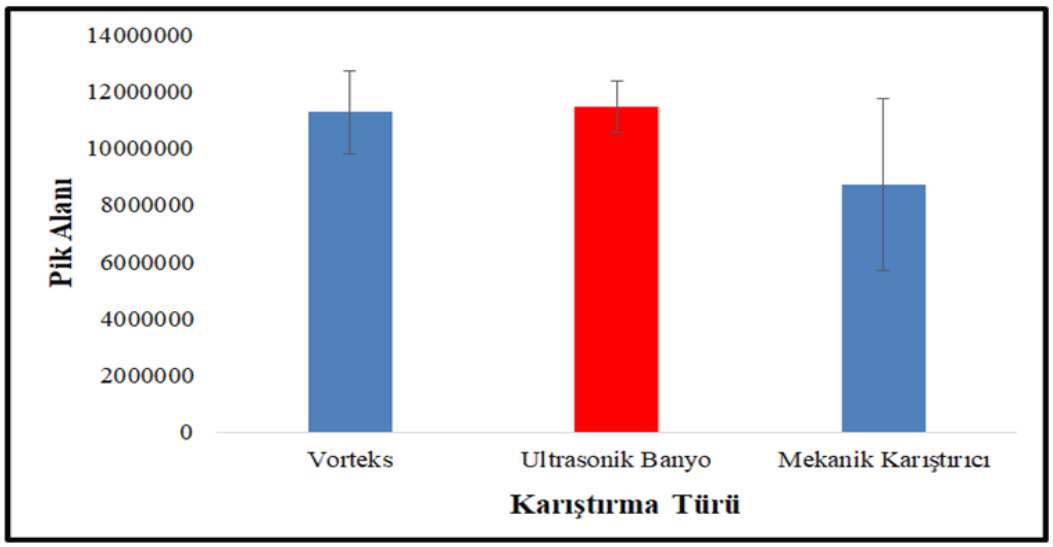


Şekil 4.23 Püskürtme sayısı optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Karıştırma türü/ süresi: vorteks/ 15 s

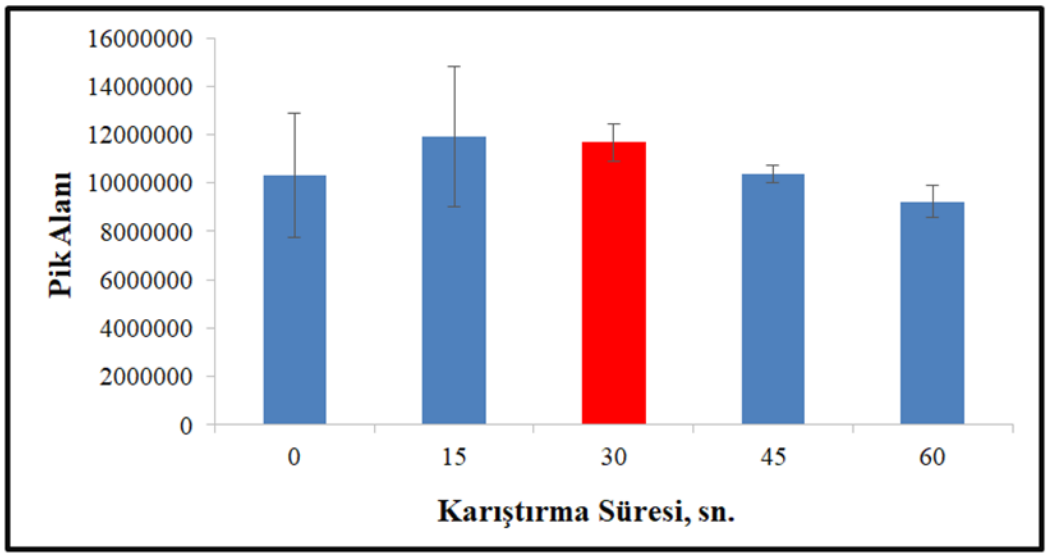
4.2.2.5 Karıştırma Türü ve Süresi Optimizasyonu

SD-DO-SFME yöntemi, ekstraksiyon çözücüsünü dağıtmak için ek bir organik çözücü gerektirmemektedir ancak analit(ler)in ekstraksiyon verimini artırmak için çeşitli karıştırma modları kullanılabilmektedir [416]. Karıştırma tipinin analit türevlerinin sulu çözeltiden organik faza kütle transferi üzerindeki etkisini değerlendirmek için mekanik çalkalama, vorteks karıştırıcı, ultrasonik banyo ve el ile karıştırma ayrı ayrı test edilmiştir. El ile çalkalama/karıştırma denemeleri sonucunda belirgin bir organik faz elde edilememiştir. Şekil 4.24'te görüldüğü gibi, vorteks ve ultrasonikasyonun benzer pik alanları olmasına rağmen, ultrasonik banyonun standart sapması vorteks karıştırıcıya göre daha düşük olduğu için optimum karıştırma türü olarak seçilmiştir. Süre optimizasyonu için, 0 ile 60 saniye arasındaki karıştırma süreleri ile denemeler yapılmıştır ve 15 ile 30 saniye karıştırma süreleri için yüksek sinyal/gürültü oranları elde edilmiştir ancak

30 s için standart sapma değeri daha düşüktür. Diğer değerlerden daha yüksek pik alanı ve daha düşük standart sapma nedeniyle optimum süre olarak 30 saniye seçilmiştir (Şekil 4.25).



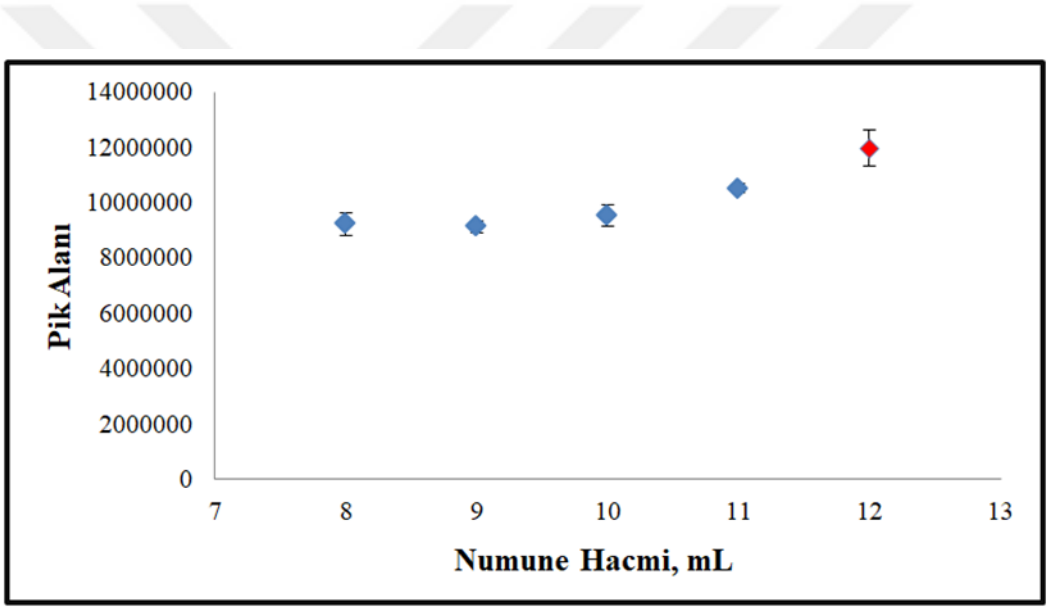
Şekil 4.24 Karıştırma türü optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25 mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma süresi: 15 s



Şekil 4.25 Karıştırma süresi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi/hacmi: 20 mg/L / 8,0 mL, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü: ultrasonik banyo

4.2.2.6 Örnek/Standart Hacim Optimizasyonu

Eser düzeylerde analit(ler) için yüksek zenginleştirme faktörleri eldesinde örnek/standart hacmi son derece önemlidir [407]. Örnek hacminin optimize edilmesi amacıyla 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 ve 12,0 mL hacimlerinde denemeler yapılmıştır ve örnek hacmi arttıkça pik alanlarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Şekil 4.26'da görüldüğü üzere, en yüksek pik alanı 12,0 mL örnek hacminden elde edilmiştir ve optimum örnek hacmi olarak 12,0 mL seçilmiştir. Bu değerden daha yüksek hacimler denenememiştir çünkü kullanılan santrifüj tüpü, püskürtme sistemini verimli bir şekilde kullanmak için maksimum hacmine ulaşmıştır.



Şekil 4.26 Numune/standart hacmi optimizasyonu. Deneysel koşullar; Standart çözelti derişimi: 20 mg/L, NaOH derişimi/hacmi: 20 g/kg / 0,25mL, 2-Naftoil klorür derişimi/çözücüsü: %0,20 (a/a)/kloroform, Püskürtme sayısı: 2 kez, Karıştırma türü/süresi: ultrasonik banyo/ 30 s

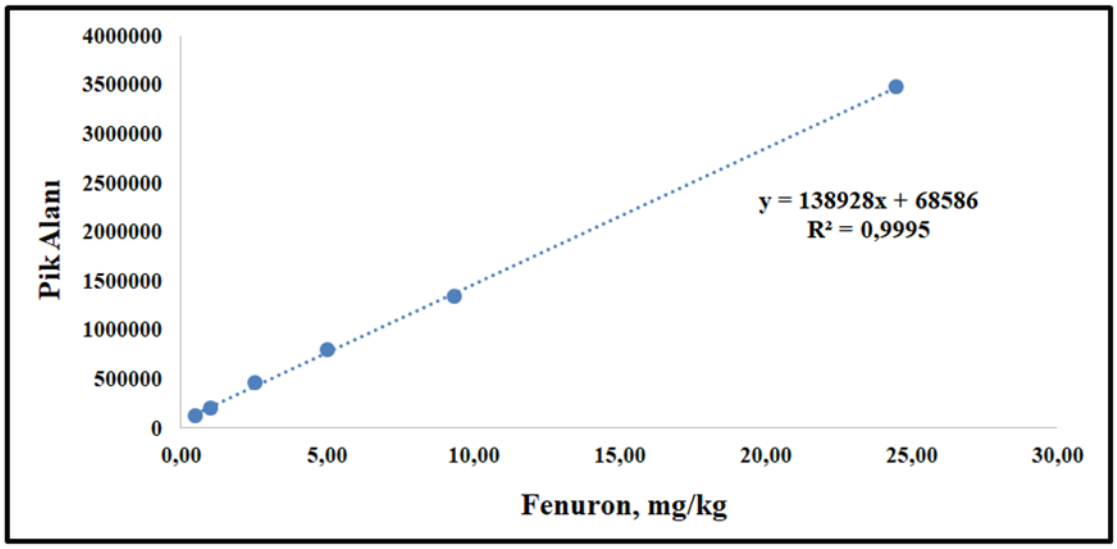
4.2.2.7 SD-DO-SFME-GC-MS Yönteminin Sistem Analitik Performans Değerleri

Tablo 4.10'da verilen optimum koşullar altında, SD-DO-SFME-GC-MS yönteminin analitik performansı, doğrusal aralık, gözlenebilme limiti (GL), tayin limiti (TL) ve belirleme katsayısı (R^2)'na göre değerlendirilmiştir. Gravimetrik olarak hazırlanmış dokuz farklı derişimdeki (0,26-97,92 mg/kg) fenuron standart çözeltisi, geliştirilen türevlendirme ve mikroekstraksiyon prosedürleri

uygulandıktan sonra GC-MS sistemine gönderilmiştir. Optimum kromatografik koşullar altında, en küçük derişime sahip standart çözelti 6 kez ve diğerleri 3 kez olacak şekilde GC-MS sisteminde okutmalar yapılmıştır. Kalibrasyon doğrusu, fenuron derişim değerlerine karşı pik alanları kullanılarak oluşturulmuştur. Doğrusal aralık, 0,9995 gibi yüksek bir belirleme katsayısı değeri ile 0,51 ve 24,50 mg/kg arasında elde edilmiştir. GL ve TL değerleri, Bölüm 4.1.2' de bahsedilen formüllere göre, s/m oranının 3 ve 10 katı olarak hesaplanmıştır (s: kalibrasyon doğrusundaki en düşük derişimin altı tekrarlı ölçümüyle elde edilen standart sapma, m: kalibrasyon doğrusunun eğimi) ve sırasıyla 0,15 mg/kg ve 0,49 mg/kg olarak bulunmuştur. Ayrıca kalibrasyon doğrusunda bulunan en düşük derişimin yüzde bağıl standart sapması (%BSS) %2,0'dir ve bu, enstrümantal ölçümlerde yüksek kesinlik sağlamıştır. Geliştirilen SD-DO-SFME-GC-MS sistemine ait kalibrasyon doğrusu Şekil 4.27'de sunulmaktadır.

Tablo 4.10 SD-DO-SFME yöntemine ait tüm optimum parametreler

Parametre	**Optimum Değer**
Numune/Standart Hacmi	12,0 mL
NaOH Derişimi; Hacmi	20 g/kg; 0,25 mL
2-Naftoil Klorür Derişimi	%0,20 (a/a)
Ekstraksiyon Çözücü Türü	Kloroform
Püskürtme Sayısı	2 Kez
Karıştırma Türü ; Süresi	Ultrasonik banyo; 30 s



Şekil 4.27 Fenuron için GC-MS kalibrasyon doğrusu

GC sistemleri ile fenuron tayinine yönelik çok sayıda makale yoktur ve literatürde bulunan makaleler fenuronun bozunma ürünlerinin tanımlanmasına dayanmaktadır [417], [418]. Ayrıca bu makalelerde GC sistemleri tarafından fenuron tespiti için hiçbir analitik performans verisi verilmemiştir. Literatürde, LC ve florimetri tabanlı sistem analizlerine odaklanılmıştır. Örneğin, nehir ve deniz suyunda fenuron ile diğer bir fenilüre herbisit tayini için doğrudan lazer foto-indüklemeli floresans yöntemine dayanan bir çalışma rapor edilmiştir. Çalışmada, fenurona ait GL değeri 0,0015 µg/mL ve TL değeri 0,005 µg/mL olarak hesaplanmıştır. 0,9952 belirleme katsayısı ile 0,02–10 µg/mL aralığında bir doğrusallık elde edilmiştir [155]. Bir başka çalışmada, UV ayrıştırma/kolon sonrası türevlendirme ile birleştirilmiş floresans detektörlü HPLC sistemi ile, pirinç ve mısır numunelerinde fenuron ve diğer 14 fenilüre herbisitin eş zamanlı tayini gerçekleştirilmiştir. Pirinç örnekleri için, fenurona ait gözlenebilme limiti 0,003 mg/kg ve tayin limiti 0,010 mg/kg, doğrusal aralık 0,01-1,0 mg/L ve belirleme katsayısı 0,9986 olarak hesaplanmıştır. Mısır numunelerinde ise GL ve TL değerleri sırasıyla 0,003 mg/kg ; 0,009 mg/kg iken, doğrusal aralık, yine 0,9986 belirleme katsayısı ile 0,01–1,0 mg/L aralığındadır [31]. Diğer bir çalışmada ise, 10 sülfonilüre ve fenilüre herbisitin tayinine yönelik katı faz ekstraksiyonu-sıvı kromatografi-elektrosprey kütle spektrometrisi (KFE–LC–ESI–MS) yöntemi geliştirilmiştir. Fenuronun gözlenebilme limiti 14,0 ng/L olarak hesaplanmıştır ve 0,9980 R^2 değeri ile doğrusal aralık 0.05-2 µg/L olarak

bulunmuştur [419]. Bahsedilen tüm bu yöntemler, zahmetli olmaları, çoklu örnek hazırlık aşamaları içermeleri ve LC sistemlerinde mobil faza olan ihtiyaç nedeniyle ekstra çözücü kullanmaları gibi birçok dezavantaj sunmaktadır. Öte yandan, geliştirilen SD-DO-SFME-GC-MS yöntemi, eser seviyelerde fenuronun hızlı, kolay ve düşük maliyetli tayinini önermektedir ve literatür bulguları ile karşılaştırıldığında, yöntemin ucuz kimyasallara ve hızlı uygulanabilirliğe sahip olduğu görülmüştür.

4.2.2.8 Geri Kazanım Çalışmaları

SD-DO-SFME-GC-MS yönteminin doğruluğunu ve uygulanabilirliğini test etmek için iki farklı evsel atık su örneğinde, optimum şartlarda, geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Evsel atık su numuneleri *Bölüm 3.3.2.2*'de ayrıntılarıyla verilen prosedür ile hazırlanmıştır. İlk olarak, önerilen yöntem ile örnek analizleri gerçekleştirilmiştir ve iki evsel atık su numunesi için tespit edilebilir bir fenuron sinyali gözlemlenmemiştir. Atık su matriksinin karmaşık doğasından kaynaklanan girişim etkileri göz ardı edilmemelidir. Örnek ve çözeltiler için matriks etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla matriks eşleştirme kalibrasyon stratejisi kullanılmış ve örnek çözeltilere 1,0-10,0 mg/kg aralığında farklı derişimlerde analit eklenmiştir. Fenuronun ana stok çözeltisi ve çalışma standardı çözeltileri asetonitril içinde hazırlanmıştır ve tüm çözeltilerdeki asetonitril miktarı %0,75'te sabit tutulmuştur. Tablo 4.11'de görüldüğü gibi, matriks eşleştirme kalibrasyon yöntemi, %10'dan az standart sapmalarla %100'e yakın yüzde geri kazanım sonuçları sağlamıştır. Ayrıca, sonuçlar *Denklem 4.4* ile hesaplanmıştır. Yüksek geri kazanım yüzdesi sonuçları, geliştirilen yöntemin atık su numunelerine uygulanabilir olduğunu ve evsel atık sularda fenuronun eser seviyelerde bulunması durumunda doğru bir şekilde tespit edilebileceğini göstermiştir.

Tablo 4.11 Evsel atık su örnekleri için yüzde geri kazanım sonuçları ve standart sapma değerleri

Numune	Eklenen Derişim, mg/kg	%Geri Kazanım±Standart Sapma
Evsel Atık Su 1	1,00	106,1 ± 0,6
	2,50	112,8 ± 0,8
	5,01	120,9 ± 3,5
	7,41	112,2 ± 5,7
Evsel Atık Su 2	1,01	88,6 ± 8,2
	2,58	85,9 ± 0,3
	5,06	87,6 ± 7,6
	7,56	87,6 ± 3,2

5
SONUÇ

Bu tez kapsamında, biyolojik ve çevresel numunelerden metamfetamin ve fenuronun GC-MS ile tayini için farklı analitik stratejiler önerilmiştir. Tezin ana amacı, incelenen analitler için çok yüksek zenginleştirme faktörleriyle sonuçlanan doğru, hassas, kesin ve çevre dostu ekstraksiyon/önderiştirme yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Biyolojik sıvılarda (idrar ve serum) eser düzeydeki metamfetamin tayini SD-DO-SFME-GC-MS ve SD-DO-SFME-IS^4-GC-MS sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen SD-DO-SFME yöntemi ile eş zamanlı türevlendirme ve ekstraksiyon başarıyla uygulanmış ve dağıtıcı çözücü kullanımı ortadan kaldırılmıştır. Prosedür, reaktif tüketimini, analiz süresini ve işlem adımlarını en aza indirmek için özelleştirilmiş, uygun maliyetli ve taşınabilir bir püskürtme aparatı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Sodyum hidroksit derişimi/hacmi, ekstraksiyon çözücü tipi, türevlendirme ajanı derişimi, püskürtme sayısı ve karıştırma türü/süresi gibi parametreler, analitin sinyal/gürültü oranını arttırmak amacıyla tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında sistemin analitik performansı değerlendirilmiş ve GC-MS sistemindeki gözlenebilme ve tayin limitleri, SD-DO-SFME yöntemi ile 48,0 µg/kg ve 159,9 µg/kg'a düşürülmüştür. Geliştirilen yöntemin doğruluğunu/uygulanabilirliğini belirlemek için serum ve idrar örneklerinde geri kazanım deneyleri yapılmıştır ve SD-DO-SFME-GC-MS yöntemi sonucunda yüzde geri kazanım sonuçları %30,5- %61,0 aralığında hesaplanmıştır. Sonuçlar, analit üzerinde negatif matriks etkileri olduğunu göstermektedir. İzotop seyreltme stratejileri arasında IS^{4}MS, düşük belirsizliklerle, doğru ve kesin sonuçlara sahiptir ve matriksten etkilenmemektedir. Bu amaçla, bu iki yöntem eser düzeylerde metamfetaminin yüksek doğruluk ve hassasiyetle tayini için birleştirilmiştir. SD-DO-SFME ve IS^{4}MS kombinasyonu, SD-DO-SFME ile karşılaştırıldığında, kayda değer ve yüksek yüzde geri kazanım sonuçları (idrar örnekleri için %99,7 - %100,0 ve serum örnekleri için %99,4 - %100,2) vermiştir. Sonuçta, IS^4 yöntemi, karmaşık örnek matrikslerinden kaynaklanan negatif matriks etkilerini telafi etmiş ve yöntemin doğruluğu ve kesinliği arttırılmıştır. Ek

olarak, çalışmada kullanılan metamfetamin ve izotopça zengin materyal ticari alternatiflerini satın almak yerine, bu çalışmada sentezlenmiştir.

Fenilüre herbisitlerin eser düzeyde belirlenmesi, kanserojen etkileri, biyobirikimleri ve çevrede kalıcılıkları nedeniyle önemli bir konudur. Fenuronun evsel atık su örneklerinden önderiştirilmesi ve ekstraksiyonu için yeşil analitik kimyaya uygun bir SD-DO-SFME yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen SD-DO-SFME yöntemi, kolay erişilebilir ve işlevsel bir püskürtme aparatının kullanımına dayalı, hızlı, basit, uygun maliyetli ve çevre dostu bir mikroekstraksiyon yöntemi sunmaktadır. Mikroekstraksiyon yönteminin önemli parametreleri, ekstraksiyon ve türevlendirme verimini arttırmak için tek değişkenli optimizasyon yaklaşımıyla dikkatlice optimize edilmiştir ve optimum koşullar altında sistemin analitik performansı değerlendirilmiştir. Fenurona ait GL ve TL değerleri sırasıyla 0,15 mg/kg ve 0,49 mg/kg olarak belirlenmiştir. Yöntemin evsel atık su örneklerine uygulanabilirliği ve doğruluğu yapılan geri kazanım çalışmaları sonucu belirlenmiştir. SD-DO-SFME-GC-MS yöntemi, matriks eşleştirme stratejisi kullanılarak %100'e yakın hesaplanan geri kazanım sonuçları ile evsel atık su örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin atık su örnekleri için iyi bir uygulanabilirliğe ve kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

[1] N. Daglioglu, E. Y. Guzel, and S. Kilercioglu, "Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey," *Forensic Sci. Int.*, vol. 294, pp. 132–139, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.11.012.

[2] M. Kuloglu Genc *et al.*, "Monitoring geographical differences in illicit drugs, alcohol, and tobacco consumption via wastewater-based epidemiology: Six major cities in Turkey," *Sci. Total Environ.*, vol. 797, p. 149156, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149156.

[3] D. Kaya Akyüzlü and Z. Kayaalti, "KAN, SAÇ, İDRAR VE NEFES ÖRNEKLERİNİN BAĞIMLILIK YAPAN MADDELERİN ANALİZİNDE KULLANIMI," *MARMARA Pharm. J.*, vol. 19, Apr. 2015, doi: 10.12991/mpj.20151900817.

[4] M. Y. Lee, B. H. Lee, H. Y. Kim, and C. H. Yang, "Bidirectional role of acupuncture in the treatment of drug addiction," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 126, pp. 382–397, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.04.004.

[5] J. T. Madden, N. C. Reyna, E. V Goranson, T. A. Gonzalez, A. R. Zavala, and N. S. Pentkowski, "Blocking serotonin 2A (5-HT2A) receptors attenuates the acquisition of methamphetamine-induced conditioned place preference in adult female rats," *Behav. Brain Res.*, vol. 415, p. 113521, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113521.

[6] M. Shukla and B. Vincent, "Methamphetamine abuse disturbs the dopaminergic system to impair hippocampal-based learning and memory: An overview of animal and human investigations," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 131, pp. 541–559, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.09.016.

[7] S. Xu, K. Zhang, and T. Luo, "Development of the Risk of Relapse Assessment Scale for methamphetamine abusers in China," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 227, p. 108992, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108992.

[8] A. L. Ciesielski, M. K. Green, and J. R. Wagner, "Characterization of One Pot methamphetamine laboratories using GC-MS and LC-MS/MS," *Forensic Chem.*, vol. 19, p. 100244, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100244.

[9] A. Maas, M. Losacker, and C. Hess, "Chromatographic separation of R/S-enantiomers of amphetamine and methamphetamine: Pathways of methamphetamine synthesis and detection in blood samples by qualitative enantioselective LC–MS/MS analysis," *Forensic Sci. Int.*, vol. 291, pp. 138–143, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.013.

[10] H. Deen *et al.*, "Stigma, discrimination and crystal methamphetamine ('ice'): Current attitudes in Australia," *Int. J. Drug Policy*, vol. 87, p. 102982, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.102982.

[11] V. Puthaviriyakorn, N. Siriviriyasomboon, J. Phorachata, W. Pan-ox, T.

Sasaki, and K. Tanaka, “Identification of impurities and statistical classification of methamphetamine tablets (Ya-Ba) seized in Thailand,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 126, no. 2, pp. 105–113, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00018-X.

[12] Z. M. Hein, N. Kraiwattanapirom, S. Mukda, and B. Chetsawang, “The induction of Neuron-Glial2 (NG2) expressing cells in methamphetamine toxicity-induced neuroinflammation in rat brain are averted by melatonin,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 344, p. 577232, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577232.

[13] J. Li *et al.*, “Major and trace elements changes of female methamphetamine addicts during six months’ compulsory treatment: Biomarkers discovery,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 325, p. 110892, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110892.

[14] I. Shu, A. Alexander, M. Jones, J. Jones, and A. Negrusz, “Determination of methamphetamine enantiomer composition in human hair by non-chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry method,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1028, pp. 145–152, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.015.

[15] F. Cao *et al.*, “A surface plasmon resonance-based inhibition immunoassay for forensic determination of methamphetamine in human serum,” *Forensic Chem.*, vol. 8, pp. 21–27, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.forc.2018.01.003.

[16] S. K. Shahvandi, M. H. Banitaba, and H. Ahmar, “Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine,” *Talanta*, vol. 184, pp. 103–108, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.115.

[17] A. Taghvimi, A. B. Tabrizi, S. Dastmalchi, and Y. Javadzadeh, “Metal organic framework based carbon porous as an efficient dispersive solid phase extraction adsorbent for analysis of methamphetamine from urine matrix,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1109, pp. 149–154, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.005.

[18] S.-Y. Fan *et al.*, “Simultaneous LC-MS/MS screening for multiple phenethylamine-type conventional drugs and new psychoactive substances in urine,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 325, p. 110884, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110884.

[19] M. Kumihashi *et al.*, “Simultaneous determination of methamphetamine and its metabolite, amphetamine, in urine using a high performance liquid chromatography column-switching method,” *J. Chromatogr. B*, vol. 845, no. 1, pp. 180–183, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.049.

[20] O. Al-Dirbashi, J. Qvarnstrom, K. Irgum, and K. Nakashima, “Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of methamphetamines in human urine as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new fluorescence derivatization reagent,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 712, no. 1, pp. 105–

112, 1998, doi: https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00128-5.

[21] O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, S. Akiyama, and K. Nakashima, "High-performance liquid chromatography of methamphetamine and its related compounds in human urine following derivatization with fluorescein isothiocyanate," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 695, no. 2, pp. 251–258, 1997, doi: https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00168-0.

[22] D. Djozan, M. A. Farajzadeh, S. M. Sorouraddin, and T. Baheri, "Molecularly imprinted-solid phase extraction combined with simultaneous derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction for selective extraction and preconcentration of methamphetamine and ecstasy from urine samples followed by gas chromatogra," *J. Chromatogr. A*, vol. 1248, pp. 24–31, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.085.

[23] F. Lai *et al.*, "A comparative study on the degradation of phenylurea herbicides by UV/persulfate process: Kinetics, mechanisms, energy demand and toxicity evaluation associated with DBPs," *Chem. Eng. J.*, vol. 428, p. 132088, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132088.

[24] L. Guo *et al.*, "A core-shell structured magnetic covalent organic framework as a magnetic solid-phase extraction adsorbent for phenylurea herbicides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1651, p. 462301, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462301.

[25] Q.-Y. Wang *et al.*, "Zirconium metal-organic framework assisted miniaturized solid phase extraction of phenylurea herbicides in natural products by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 180, p. 113071, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113071.

[26] W. Hayat, Z. Liu, Y. Wan, and Y. Zhang, "The analysis of efficiency of activated peroxymonosulfate for fenuron degradation in water," *Environ. Technol. Innov.*, vol. 26, p. 102352, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102352.

[27] I. Ali, O. M. L. Alharbi, Z. A. ALOthman, A. M. Al-Mohaimeed, and A. Alwarthan, "Modeling of fenuron pesticide adsorption on CNTs for mechanistic insight and removal in water," *Environ. Res.*, vol. 170, pp. 389–397, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.066.

[28] J. Fenoll, P. Hellín, C. M. Martínez, P. Flores, and S. Navarro, "High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantifying phenylurea herbicides and their main metabolites in amended and unamended soils," *J. Chromatogr. A*, vol. 1257, pp. 81–88, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.014.

[29] J.-H. Han, Y.-Y. Cui, X.-Q. He, Y. Zhang, and C.-X. Yang, "Fabrication of carboxyl functionalized microporous organic network coated stir bar for efficient extraction and analysis of phenylurea herbicides in food and water samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1640, p. 461947, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461947.

[30] Y. Dan *et al.*, "Impact of rice straw biochar addition on the sorption and leaching of phenylurea herbicides in saturated sand column," *Sci. Total Environ.*, vol. 769, p. 144536, 2021, doi:

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144536.

[31] R.-X. Mou, M.-X. Chen, and J.-L. Zhi, “Simultaneous determination of 15 phenylurea herbicides in rice and corn using HPLC with fluorescence detection combined with UV decomposition and post-column derivatization,” *J. Chromatogr. B*, vol. 875, no. 2, pp. 437–443, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.022.

[32] K. Haruna *et al.*, “Conformational profile, vibrational assignments, NLO properties and molecular docking of biologically active herbicide1,1-dimethyl-3-phenylurea,” *Heliyon*, vol. 5, no. 6, p. e01987, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01987.

[33] M. A. Oturan, M. C. Edelahi, N. Oturan, K. El kacemi, and J.-J. Aaron, “Kinetics of oxidative degradation/mineralization pathways of the phenylurea herbicides diuron, monuron and fenuron in water during application of the electro-Fenton process,” *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 97, no. 1, pp. 82–89, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.03.026.

[34] Y. Liu, W. Zhou, W. Sun, and Z. Chen, “Analysis of fluorinated compounds by micellar electrokinetic chromatography - mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1645, p. 462123, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462123.

[35] J. Langeron, S. Sayen, M. Couderchet, and E. Guillon, “Leaching potential of phenylurea herbicides in a calcareous soil: comparison of column elution and batch studies.,” *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 21, no. 7, pp. 4906–4913, Apr. 2014, doi: 10.1007/s11356-012-1244-y.

[36] M. L. Escuderos-Morenas, M. J. Santos-Delgado, S. Rubio-Barroso, and L. M. Polo-Díez, “Direct determination of monolinuron, linuron and chlorbromuron residues in potato samples by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1011, no. 1, pp. 143–153, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01139-7.

[37] A. C. Gerecke, C. Tixier, T. Bartels, R. P. Schwarzenbach, and S. R. Müller, “Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng l−1 using solid-phase extraction, derivatization, and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 930, no. 1, pp. 9–19, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01192-X.

[38] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, and M. Valcárcel, “Analysis of phenylurea herbicides from plants by GC/MS,” *Talanta*, vol. 56, no. 4, pp. 727–734, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00616-6.

[39] Q. Wang *et al.*, “Sensitive determination of phenylurea herbicides in soybean milk and tomato samples by a novel hypercrosslinked polymer based solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography,” *Food Chem.*, vol. 317, p. 126410, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126410.

[40] M. Saraji, L. Mohammadipour, and N. Mehrafza, “An effective configuration for automated magnetic micro solid-phase extraction of phenylurea herbicides from water samples followed by high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1617, p. 460829, 2020,

doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460829.

[41] H.-H. Lin, Y.-H. Sung, and S.-D. Huang, “Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of phenylurea herbicides in aqueous samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1012, no. 1, pp. 57–66, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01169-5.

[42] A. Taghvimi and H. Hamishehkar, “Carbon coated magnetic nanoparticles as a novel magnetic solid phase extraction adsorbent for simultaneous extraction of methamphetamine and ephedrine from urine samples,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1041–1042, pp. 113–119, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.039.

[43] P. Khurana, R. Pulicharla, and S. Kaur Brar, “Analytical challenges of antibiotic-metal complexes in wastewaters: A mini-review,” *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, vol. 18, p. 100747, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100747.

[44] S.-L. Lin, Y.-R. Wu, and M.-R. Fuh, “Polymer monolith microextraction using poly(butyl methacrylate-co-1,6-hexanediol ethoxylate diacrylate) monolithic sorbent for determination of phenylurea herbicides in water samples,” *Talanta*, vol. 147, pp. 199–206, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.057.

[45] Z. Huang and S. Zhang, “Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry after immunoassay screening,” *J. Chromatogr. B*, vol. 792, no. 2, pp. 241–247, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00269-1.

[46] M. Li, J. Wang, C. Jiao, C. Wang, Q. Wu, and Z. Wang, “Graphene oxide framework: An adsorbent for solid phase extraction of phenylurea herbicides from water and celery samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1469, pp. 17–24, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.056.

[47] K. Kuwayama *et al.*, “Contribution of thermal desorption and liquid–liquid extraction for identification and profiling of impurities in methamphetamine by gas chromatography–mass spectrometry,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 171, no. 1, pp. 9–15, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.09.007.

[48] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, and C. Bendicho, “Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 7, pp. 617–628, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.016.

[49] E. Carasek, L. Morés, and J. Merib, “Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 19, p. e00060, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2018.e00060.

[50] R. Carabias-Martı́nez, C. Garcı́a-Hermida, E. Rodrı́guez-Gonzalo, F. E. Soriano-Bravo, and J. Hernández-Méndez, “Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas, by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass

spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1002, no. 1, pp. 1–12, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00642-3.

[51] M. C. Gennaro, E. Marengo, V. Gianotti, and V. Maurino, "New strategies for the determination of phenylurea pesticides by gas chromatography with hot splitless inlet systems," *J. Chromatogr. A*, vol. 910, no. 1, pp. 79–86, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01182-1.

[52] M. Sajid and J. Płotka-Wasylka, "'Green' nature of the process of derivatization in analytical sample preparation," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 102, pp. 16–31, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.005.

[53] D. M. Pavlović, S. Babić, A. J. M. Horvat, and M. Kaštelan-Macan, "Sample preparation in analysis of pharmaceuticals," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 26, no. 11, pp. 1062–1075, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.010.

[54] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, and A. Sanz-Medel, "Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 60, no. 2, pp. 151–207, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.01.005.

[55] S. L. Greene, F. Kerr, and G. Braitberg, "Review article: amphetamines and related drugs of abuse.," *Emerg. Med. Australas.*, vol. 20, no. 5, pp. 391–402, Oct. 2008, doi: 10.1111/j.1742-6723.2008.01114.x.

[56] S. Hashemnia, F. Khajavi Fard, and Z. Mokhtari, "A study of the interactions between ephedrine and human serum albumin based on spectroscopic, electrochemical and docking assessments," *J. Mol. Liq.*, vol. 348, p. 118058, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118058.

[57] D. Vearrier, M. I. Greenberg, S. N. Miller, J. T. Okaneku, and D. A. Haggerty, "Methamphetamine: History, Pathophysiology, Adverse Health Effects, Current Trends, and Hazards Associated with the Clandestine Manufacture of Methamphetamine," *Disease-a-Month*, vol. 58, no. 2, pp. 38–89, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2011.09.004.

[58] W. J. Panenka *et al.*, "Methamphetamine use: A comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 129, no. 3, pp. 167–179, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.11.016.

[59] M. D. Anglin, C. Burke, B. Perrochet, E. Stamper, and S. Dawud-Noursi, "History of the methamphetamine problem.," *J. Psychoactive Drugs*, vol. 32, no. 2, pp. 137–141, 2000, doi: 10.1080/02791072.2000.10400221.

[60] J. W. Alexander, "Japan's hiropon panic: Resident non-Japanese and the 1950s meth crisis," *Int. J. Drug Policy*, vol. 24, no. 3, pp. 238–243, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2012.12.001.

[61] M. Morelli and E. Tognotti, "Brief history of the medical and non-medical use of amphetamine-like psychostimulants," *Exp. Neurol.*, vol. 342, p. 113754, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113754.

[62] L. Degenhardt *et al.*, "Meth/amphetamine use and associated HIV: Implications for global policy and public health," *Int. J. Drug Policy*, vol. 21, no. 5, pp. 347–358, 2010, doi:

https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2009.11.007.

[63] K. E. Courtney and L. A. Ray, "Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature.," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 143, pp. 11–21, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.003.

[64] N. Ropek *et al.*, "Methamphetamine ('crystal meth') causes induction of DNA damage and chromosomal aberrations in human derived cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 128, pp. 1–7, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.035.

[65] R. McKetin, S. S. Kaye, K. J. Clemens, and D. Hermens, "Chapter 70 - Methamphetamine Addiction," P. M. B. T.-P. of A. Miller, Ed. San Diego: Academic Press, 2013, pp. 689–698.

[66] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, and N. NicDaeid, "A sol–gel colorimetric sensor for methamphetamine detection," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 215, pp. 553–560, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.089.

[67] S. Rouhani and S. Haghgoo, "A novel fluorescence nanosensor based on 1,8-naphthalimide-thiophene doped silica nanoparticles, and its application to the determination of methamphetamine," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 209, pp. 957–965, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.035.

[68] A. Mayer and G. Miskelly, "A review on the current methods of methamphetamine remediation, their limitations, and chemical degradation techniques that have been investigated," *Forensic Chem.*, vol. 27, p. 100399, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.forc.2022.100399.

[69] L. Ti *et al.*, "The impact of engagement in street-based income generation activities on stimulant drug use cessation among people who inject drugs," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 141, pp. 58–64, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.05.003.

[70] E. S. Almazrouei, A. A. Bintamim, S. E. A. Khalil, R. Alremeithi, and S. Gewily, "The identification of drugs of abuse in E-cigarette samples seized in Dubai between 2016 and 2020," *Forensic Sci. Int.*, vol. 333, p. 111233, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111233.

[71] R. Jones, K. Usher, and C. Woods, "Crystal methamphetamine's impact on frontline emergency services in Victoria, Australia," *Australas. Emerg. Care*, vol. 22, no. 4, pp. 201–205, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.auec.2019.07.004.

[72] J. M. Lappin and S. Darke, "Methamphetamine and heightened risk for early-onset stroke and Parkinson's disease: A review," *Exp. Neurol.*, vol. 343, p. 113793, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113793.

[73] K. Yeh, L. Li, F. Wania, and J. P. D. Abbatt, "Thirdhand smoke from tobacco, e-cigarettes, cannabis, methamphetamine and cocaine: Partitioning, reactive fate, and human exposure in indoor environments," *Environ. Int.*, vol. 160, p. 107063, 2022, doi:

https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107063.

[74] R. Pal, M. Megharaj, K. P. Kirkbride, and R. Naidu, “Fate of 1-(1′,4′-cyclohexadienyl)-2-methylaminopropane (CMP) in soil: Route-specific by-product in the clandestine manufacture of methamphetamine,” *Sci. Total Environ.*, vol. 416, pp. 394–399, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.023.

[75] B. K. Logan, “Methamphetamine - Effects on Human Performance and Behavior.,” *Forensic Sci. Rev.*, vol. 14, no. 1–2, pp. 133–151, Feb. 2002.

[76] C. Wei, K. Yi, G. Sun, and J. Wang, “Synthesis of novel sonocatalyst Er3+:YAlO3/Nb2O5 and its application for sonocatalytic degradation of methamphetamine hydrochloride,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 42, pp. 57–67, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.031.

[77] T. J. Gelmi, M. Verrijken, and W. Weinmann, “Determination of the stereoisomeric distribution of R-(−)- and S-(+)-methamphetamine in Thai pills in the legal context of “not inconsiderable quantities",” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 116, p. 104747, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104747.

[78] R. R. Matsumoto *et al.*, “Methamphetamine-induced toxicity: An updated review on issues related to hyperthermia,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 144, no. 1, pp. 28–40, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.001.

[79] D. S. Harris, H. Boxenbaum, E. T. Everhart, G. Sequeira, J. E. Mendelson, and R. T. Jones, “The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine.,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 74, no. 5, pp. 475–486, Nov. 2003, doi: 10.1016/j.clpt.2003.08.002.

[80] C. C. Cruickshank and K. R. Dyer, “A review of the clinical pharmacology of methamphetamine,” *Addiction*, vol. 104, no. 7, pp. 1085–1099, Jul. 2009, doi: https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x.

[81] S. J. Brookfield, L. Selvey, L. Maher, and L. Fitzgerald, “‘It Just Kind of Cascades’: A critical ethnography of methamphetamine-related pleasure among people in recovery,” *Int. J. Drug Policy*, vol. 98, p. 103427, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2021.103427.

[82] D. Salani, B. Valdes, J. De Santis, and M. Zdanowicz, “Back With a Vengeance: The Reappearance of Methamphetamine and its Implications for Health Care Providers,” *J. Nurse Pract.*, vol. 16, no. 7, pp. 483–488, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2020.03.005.

[83] H. Kalant, “The pharmacology and toxicology of ‘ecstasy’ (MDMA) and related drugs.,” *C. Can. Med. Assoc. J. = J. l’Association medicale Can.*, vol. 165, no. 7, pp. 917–928, Oct. 2001.

[84] M. Rezazadeh, Y. Yamini, and S. Seidi, “Application of a new nanocarbonaceous sorbent in electromembrane surrounded solid phase microextraction for analysis of amphetamine and methamphetamine in human urine and whole blood,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1396, pp. 1–6, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.077.

[85] S. Glasner-Edwards, L. J. Mooney, P. Marinelli-Casey, M. Hillhouse, A. Ang, and R. Rawson, “Anxiety disorders among methamphetamine

dependent adults: association with post-treatment functioning.," *Am. J. Addict.*, vol. 19, no. 5, pp. 385–390, 2010, doi: 10.1111/j.1521-0391.2010.00061.x.

[86] T. Rau, J. Ziemniak, and D. Poulsen, "The neuroprotective potential of low-dose methamphetamine in preclinical models of stroke and traumatic brain injury," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 64, pp. 231–236, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.013.

[87] D. DiCaro, H. H. Lee, C. Belisario, R. L. Ramos, and L. R. Martinez, "Combination of acute intravenous methamphetamine injection and LPS challenge facilitate leukocyte infiltration into the central nervous system of C57BL/6 mice.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 75, p. 105751, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.105751.

[88] A. Ishigami, I. Tokunaga, T. Gotohda, and S. Kubo, "Immunohistochemical study of myoglobin and oxidative injury-related markers in the kidney of methamphetamine abusers," *Leg. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 42–48, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S1344-6223(03)00005-1.

[89] L.-Y. Liang *et al.*, "Chronic toxicity of methamphetamine: Oxidative remodeling of pulmonary arteries," *Toxicol. Vitr.*, vol. 62, p. 104668, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104668.

[90] X. Sun *et al.*, "Methamphetamine produces cardiac damage and apoptosis by decreasing melusin," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 378, p. 114543, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.015.

[91] C. Bloxom and C. Dika, "Oral Health in People Who Use Methamphetamine," *J. Nurse Pract.*, vol. 17, no. 6, pp. 661–664, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2021.02.011.

[92] L. N. Coughlin, L. (Allison) Lin, M. Jannausch, M. A. Ilgen, and E. E. Bonar, "Methamphetamine use among American Indians and Alaska Natives in the United States," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 227, p. 108921, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108921.

[93] N. Manousi and V. Samanidou, "Green sample preparation of alternative biosamples in forensic toxicology," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 20, p. 100388, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100388.

[94] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, and Y. Wen, "Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 102, pp. 123–146, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005.

[95] G. Mahajan, "Chapter 46 - Urine Drug Testing in Pain Medicine," H. T. Benzon, S. N. Raja, S. S. Liu, S. M. Fishman, and S. P. B. T.-E. of P. M. (Fourth E. Cohen, Eds. Elsevier, 2018, pp. 405-418.e2.

[96] G. Skopp, "Preanalytic aspects in postmortem toxicology," *Forensic Sci. Int.*, vol. 142, no. 2, pp. 75–100, 2004, doi: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.012.

[97] T. Kumazawa *et al.*, "Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction

and gas chromatography–mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 44, no. 2, pp. 602–607, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.025.

[98] E. J. Cone, "New developments in biological measures of drug prevalence.," *NIDA Res. Monogr.*, vol. 167, pp. 108–129, 1997.

[99] M. Otero-Fernández, J. Á. Cocho, M. J. Tabernero, A. M. Bermejo, P. Bermejo-Barrera, and A. Moreda-Piñeiro, "Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots," *Anal. Chim. Acta*, vol. 784, pp. 25–32, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.061.

[100] H. D. de Faria *et al.*, "Online biological sample preparation with restricted access hybrid carbon nanotubes for determination of anti-smoking drugs," *J. Chromatogr. A*, vol. 1669, p. 462931, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462931.

[101] P. Bottoni, P. Grenni, L. Lucentini, and A. B. Caracciolo, "Terbuthylazine and other triazines in Italian water resources," *Microchem. J.*, vol. 107, pp. 136–142, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.011.

[102] J. Hu *et al.*, "Raman spectrum classification based on transfer learning by a convolutional neural network: Application to pesticide detection," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 265, p. 120366, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120366.

[103] C. Ji *et al.*, "Enantioselectivity in the toxicological effects of chiral pesticides: A review," *Sci. Total Environ.*, vol. 857, p. 159656, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159656.

[104] S. Liang, H. Li, Q. Chang, R. Bai, Z. Zhao, and G. Pang, "Residual levels and dietary exposure risk assessment of banned pesticides in fruits and vegetables from Chinese market based on long-term nontargeted screening by HPLC-Q-TOF/MS," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 248, p. 114280, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114280.

[105] M. Shahid and M. S. Khan, "Ecotoxicological implications of residual pesticides to beneficial soil bacteria: A review," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 188, p. 105272, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105272.

[106] A. Sharma *et al.*, "Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 201, p. 110812, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812.

[107] M. A. Hassaan and A. El Nemr, "Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques," *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 207–220, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007.

[108] Y.-X. Zhang, Q. Xiong, G. Yang, and M.-L. Li, "Computer-assisted prediction of the classification of the pesticide chemical structure in mass spectra," *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 35, no. 10, pp. 1449–1454, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60088-7.

[109] Y. Zhang, H. Zhang, J. Wang, Z. Yu, H. Li, and M. Yang, "Suspect and

target screening of emerging pesticides and their transformation products in an urban river using LC-QTOF-MS," *Sci. Total Environ.*, vol. 790, p. 147978, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147978.

[110] A. L. C. de Barros *et al.*, "Aqueous chlorination of herbicide metribuzin: Identification and elucidation of 'new' disinfection by-products, degradation pathway and toxicity evaluation," *Water Res.*, vol. 189, p. 116545, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116545.

[111] M. Tankiewicz, J. Fenik, and M. Biziuk, "Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 9, pp. 1050–1063, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.008.

[112] Y. Zheng, B. Han, X. Xu, and L. Zheng, "Distribution characteristics, sources, and risk assessment of organochlorine pesticides in the Fildes Peninsula and Adelaide Island," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 185, p. 114284, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114284.

[113] P. Phosiri, Y. Santaladchaiyakit, and R. Burakham, "Natural deep eutectic solvent-decorated magnetic layered double hydroxide as a sorbent for the enrichment of organochlorine pesticides in environmental samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1673, p. 463111, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463111.

[114] G. A. Idowu, A. F. Aiyesanmi, and F. O. Oyegoke, "Organochlorine pesticide residues in pods and beans of cocoa (Theobroma cacao L.) from Ondo State Central District, Nigeria.," *Environ. Adv.*, vol. 7, p. 100162, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100162.

[115] C. Yang, J. Wang, W. Yan, and Y. Xia, "Facile synthesis disposable MOF membrane filter: Growth of NH2-MIL-125 (Ti) on filter paper for fast removal of organophosphorus pesticides in aqueous solution and vegetables," *Food Chem.*, vol. 389, p. 133056, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133056.

[116] G. Liu *et al.*, "Adsorption and removal of organophosphorus pesticides from Chinese cabbages and green onions by using metal organic frameworks based on the mussel-inspired adhesive interface," *Food Chem.*, vol. 393, p. 133337, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133337.

[117] M. R. Mahajan and P. O. Patil, "Design of zero-dimensional graphene quantum dots based nanostructures for the detection of organophosphorus pesticides in food and water: A review," *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 144, p. 109883, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109883.

[118] Y. Wu *et al.*, "Association between organophosphorus pesticide exposure and depression risk in adults: A cross-sectional study with NHANES data," *Environ. Pollut.*, vol. 316, p. 120445, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120445.

[119] N. Manousi *et al.*, "Green capsule phase microextraction employing hydrophobic monolithic sol-gel octadecyl siloxane platforms for the monitoring of organophosphorus pesticides in environmental water samples," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 30, p. 100892, 2022, doi:

https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100892.

[120] T. O. Ajiboye, P. O. Oladoye, C. A. Olanrewaju, and G. O. Akinsola, "Organophosphorus pesticides: Impacts, detection and removal strategies," *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, vol. 17, p. 100655, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100655.

[121] W. Rakkhun, J. Jantra, C. Cheubong, and S. Teepoo, "Colorimetric test strip cassette readout with a smartphone for on-site and rapid screening test of carbamate pesticides in vegetables," *Microchem. J.*, vol. 181, p. 107837, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107837.

[122] H. Guo *et al.*, "Efficient Extraction and Determination of Carbamate Pesticides in Vegetables Based on a Covalent Organic Frameworks with Acylamide Sites," *J. Chromatogr. A*, vol. 1664, p. 462799, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462799.

[123] Y. Fan, K. Lai, B. A. Rasco, and Y. Huang, "Determination of carbaryl pesticide in Fuji apples using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 60, no. 1, pp. 352–357, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.011.

[124] R. Yang, J. Wu, G. Lu, and X. Huang, "Efficient capture of carbamate and triazole pesticides in environmental waters by functional groups-rich monolithic fibers prior to chromatographic quantification," *Microchem. J.*, vol. 171, p. 106833, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106833.

[125] A. Boudebbouz *et al.*, "Pesticide residues levels in raw cow's milk and health risk assessment across the globe: A systematic review," *Environ. Adv.*, vol. 9, p. 100266, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100266.

[126] L. Li *et al.*, "The toxicokinetics and risk assessment of pyrethroids pesticide in tilapia (Oreochromis mossambicus) upon short-term water exposure," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 241, p. 113751, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113751.

[127] C. Hu, L. Wang, Y. Ma, Z. Xu, and H. Lu, "Investigation on the interaction of pyrethroid pesticides to estrogen receptor alpha through computational and experimental methods," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 216, p. 112565, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112565.

[128] C. Bolognesi and F. D. Merlo, "Pesticides: Human Health Effects☆," J. B. T.-E. of E. H. (Second E. Nriagu, Ed. Oxford: Elsevier, 2019, pp. 118–132.

[129] A. Khursheed *et al.*, "Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects," *Microb. Pathog.*, vol. 173, p. 105854, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854.

[130] M. Felix, N. Holst, and A. Sharp, "PestTox: An object oriented model for modeling fate and transport of pesticides in the environment and their effects on population dynamics of non-target organisms," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 166, p. 105022, 2019, doi:

https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.105022.

[131] Y. Abubakar *et al.*, “Chapter 3 - Pesticides, History, and Classification,” C. Egbuna and B. B. T.-N. R. for P. Sawicka Disease and Weed Control, Eds. Academic Press, 2020, pp. 29–42.

[132] Y. Wang *et al.*, “A comprehensive review on the pretreatment and detection methods of neonicotinoid insecticides in food and environmental samples,” *Food Chem. X*, vol. 15, p. 100375, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100375.

[133] H. Zhao *et al.*, “Simultaneous determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide traces in cereals by QuEChERS preparation and UPLC-MS/MS analysis,” *Food Chem.*, vol. 396, p. 133708, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133708.

[134] I. Fourel, “Enantiomer fraction evaluation of the four stereoisomers of second-generation anticoagulant rodenticides in biological matrices with polysaccharide-based chiral selectors and liquid chromatography tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1676, p. 463209, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463209.

[135] X. Cao, D. Qiu, R. Zhang, Z. Li, and X. Xu, “Synthesis, nematicidal evaluation, and SAR study of benzofuran derivatives containing 2-carbonyl thiophene,” *Chinese Chem. Lett.*, p. 107800, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.cclet.2022.107800.

[136] P. K. Raul *et al.*, “Green synthesis of carbon dot silver nanohybrids from fruits and vegetable’s peel waste: Applications as potent mosquito larvicide,” *Curr. Res. Green Sustain. Chem.*, vol. 4, p. 100158, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100158.

[137] L. A. Garibaldi *et al.*, “Smaller agricultural fields, more edges, and natural habitats reduce herbicide-resistant weeds,” *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 342, p. 108260, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108260.

[138] J. Werner, J. Świtek, R. Frankowski, and A. Zgoła-Grześkowiak, “Development of a green deep eutectic solvent-based thin film solid phase microextraction technique for the preconcentration of chlorophenoxy acid herbicides in drainage ditches and river waters using a central composite design,” *Microchem. J.*, vol. 183, p. 108101, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108101.

[139] P. Woliński, A. Kącka-Zych, B. Mirosław, E. Wielgus, A. Olszewska, and R. Jasiński, “Green, one-pot synthesis of 1,2-oxazine-type herbicides via non-catalyzed Hetero Diels-Alder reactions comprising (2E)-3-aryl-2-nitroprop-2-enenitriles,” *J. Clean. Prod.*, vol. 356, p. 131878, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131878.

[140] A. Can, I. Yildiz, and G. Guvendik, “The determination of toxicities of sulphonylurea and phenylurea herbicides with quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) studies,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 35, no. 3, pp. 369–379, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.001.

[141] Y. Zhang *et al.*, “Aryl ketones-derived porous organic polymer for

enrichment and sensitive detection of phenylurea herbicides in water, tea drink and mushroom samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1685, p. 463621, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463621.

[142] W. Wang, P. Yang, Y. Guo, H. Ji, and F. Liang, "Phenylurea herbicide degradation and N-nitrosodimethylamine formation under various oxidation conditions: Relationships and transformation pathways," *Environ. Pollut.*, vol. 269, p. 116122, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116122.

[143] Y. Guo and Z. Li, "A lognormal model for evaluating maximum residue levels of pesticides in crops," *Environ. Pollut.*, vol. 278, p. 116832, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116832.

[144] L. Pareja, V. Cesio, H. Heinzen, and A. R. Fernández-Alba, "Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC–MS/MS," *Talanta*, vol. 83, no. 5, pp. 1613–1622, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.052.

[145] Y. Xu *et al.*, "A possible but unrecognized risk of acceptable daily intake dose triazole pesticides exposure—bile acid disturbance induced pharmacokinetic changes of oral medication," *Chemosphere*, vol. 322, p. 138209, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138209.

[146] T. M. Osaili *et al.*, "Detection and risk associated with organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and carbamate pesticide residues in chicken muscle and organ meats in Jordan," *Food Control*, vol. 144, p. 109355, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109355.

[147] C. Palladino *et al.*, "Evaluation of Fusarium mycotoxins and fungicide residues in barley grain produced in Uruguay," *J. Agric. Food Res.*, vol. 3, p. 100092, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100092.

[148] L. J. Melnyk, Z. Wang, Z. Li, and J. Xue, "Prioritization of pesticides based on daily dietary exposure potential as determined from the SHEDS model," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 96, pp. 167–173, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.025.

[149] M. Moxon *et al.*, "An analysis of the setting of the acute reference dose (ARfD) for pesticides in Europe," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 113, p. 104638, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104638.

[150] R. Solecki, L. Davies, V. Dellarco, I. Dewhurst, M. van Raaij, and A. Tritscher, "Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, no. 11, pp. 1569–1593, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.04.005.

[151] C. Panis *et al.*, "Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil," *Environ. Int.*, vol. 165, p. 107321, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107321.

[152] G. Wang *et al.*, "Risk assessment of organophosphorus pesticide residues in drinking water resources: Statistical and Monte-Carlo approach," *Chemosphere*, vol. 307, p. 135632, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135632.

[153] D. Orazbayeva, A. Muratuly, M. Bektassov, A. Zhakupbekova, and B. Kenessov, "Chromatographic determination of pesticides in soil: Current trends in analysis and sample preparation," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 35, p. e00174, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00174.

[154] L. Rani *et al.*, "An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment," *J. Clean. Prod.*, vol. 283, p. 124657, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657.

[155] P. A. Diaw *et al.*, "Determination of phenylurea pesticides by direct laser photo-induced fluorescence," *Talanta*, vol. 116, pp. 569–574, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.014.

[156] P. A. Diaw *et al.*, "Removal of the herbicide monolinuron from waters by the electro-Fenton treatment," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 864, p. 114087, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114087.

[157] D. Pimentel, "Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics," *J. Agric. Environ. Ethics*, vol. 8, no. 1, pp. 17–29, 1995, doi: 10.1007/BF02286399.

[158] J. Wang, R. Guo, J. Chen, Q. Zhang, and X. Liang, "Phenylurea herbicides-selective polymer prepared by molecular imprinting using N-(4-isopropylphenyl)-N′-butyleneurea as dummy template," *Anal. Chim. Acta*, vol. 540, no. 2, pp. 307–315, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.057.

[159] J. Zeng *et al.*, "Common characteristic assessments of transformation mechanism for substituted phenylurea herbicides by reactive oxygen species (ROSs) during photocatalytic process," *Chem. Eng. J.*, vol. 273, pp. 519–526, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.027.

[160] A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, and A. Bautista-Sánchez, "High-performance liquid chromatographic determination of phenylureas by photochemically-induced fluorescence detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 950, no. 1, pp. 287–291, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00042-0.

[161] Y. Qian *et al.*, "Dissipation, occurrence and risk assessment of a phenylurea herbicide tebuthiuron in sugarcane and aquatic ecosystems in South China," *Environ. Pollut.*, vol. 227, pp. 389–396, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.082.

[162] M. Hasanuzzaman *et al.*, "Chapter 3 - Phytotoxicity, environmental and health hazards of herbicides: challenges and ways forward," M. N. V. B. T.-A. D. Prasad Treatment and Remediation, Ed. Butterworth-Heinemann, 2020, pp. 55–99.

[163] Y. Wang, L. Xiao, and M. Cheng, "Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 50, pp. 9115–9119, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.048.

[164] J. Zhang *et al.*, "In-situ metathesis reaction combined with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction method for the

determination of phenylurea pesticides in water samples," *Talanta*, vol. 98, pp. 145–151, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.062.

[165] M. Grodtke, A. Paschke, J. Harzdorf, M. Krauss, and G. Schüürmann, "Calibration and field application of the Atlantic HLB Disk containing Chemcatcher® passive sampler – Quantitative monitoring of herbicides, other pesticides, and transformation products in German streams," *J. Hazard. Mater.*, vol. 410, p. 124538, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124538.

[166] J. Wang *et al.*, "Preparation of a magnetic porous organic polymer for the efficient extraction of phenylurea herbicides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1519, pp. 19–27, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.001.

[167] J. P. Bakhoum *et al.*, "Development of a new automatic on-site detector of pesticides in natural waters by photo induced fluorescence, application to three phenylurea and benzoylurea herbicide," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 214, pp. 285–293, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.034.

[168] K. Gençdağ Şensoy, M. Muti, and A. E. Karagözler, "Highly selective molecularly imprinting polymer-based sensor for the electrochemical determination of metoxuron," *Microchem. J.*, vol. 158, p. 105178, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105178.

[169] Y. M. Ribeiro *et al.*, "Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: A review," *Aquat. Toxicol.*, vol. 252, p. 106293, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106293.

[170] M. E. DeLorenzo, G. I. Scott, and P. E. Ross, "Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, no. 1, pp. 84–98, Jan. 2001, doi: https://doi.org/10.1002/etc.5620200108.

[171] R. Rani, P. Sharma, R. Kumar, and Y. A. Hajam, "Chapter 3 - Effects of heavy metals and pesticides on fish," G. H. Dar, R. A. Bhat, H. Qadri, K. M. Al-Ghamdy, and K. R. B. T.-B. F. D. Hakeem, Eds. Academic Press, 2022, pp. 59–86.

[172] P. Ceger *et al.*, "Evaluation of the fish acute toxicity test for pesticide registration," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 139, p. 105340, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105340.

[173] M. Al Bahri, L. Calvo, A. M. Polo, M. A. Gilarranz, A. F. Mohedano, and J. J. Rodriguez, "Identification of by-products and toxicity assessment in aqueous-phase hydrodechlorination of diuron with palladium on activated carbon catalysts," *Chemosphere*, vol. 91, no. 9, pp. 1317–1323, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.065.

[174] M. Campbell, "Chemical Safety: International Reference Manual," 2007, pp. 513–531.

[175] X. Liu, C. Wang, Q. Wu, and Z. Wang, "Metal-organic framework-templated synthesis of magnetic nanoporous carbon as an efficient absorbent for enrichment of phenylurea herbicides," *Anal. Chim. Acta*, vol. 870, pp. 67–74, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.036.

[176] J. P. Quirino, N. Inoue, and S. Terabe, "Reversed migration micellar

electrokinetic chromatography with off-line and on-line concentration analysis of phenylurea herbicides," *J. Chromatogr. A*, vol. 892, no. 1, pp. 187–194, 2000, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01349-7.

[177] Y. Hu, "Simultaneous determination of phenylurea herbicides in yam by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection," *J. Chromatogr. B*, vol. 986–987, pp. 143–148, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.016.

[178] J. Wu, R. Ma, L. Hao, C. Wang, Q. Wu, and Z. Wang, "Triphenylamine-based hypercrosslinked organic polymer as adsorbent for the extraction of phenylurea herbicides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1520, pp. 48–57, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.012.

[179] G. Pérez-Lucas, M. Gambín, and S. Navarro, "Leaching behaviour appraisal of eight persistent herbicides on a loam soil amended with different composted organic wastes using screening indices," *J. Environ. Manage.*, vol. 273, p. 111179, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111179.

[180] X. Liang, J. Wang, Q. Wu, C. Wang, and Z. Wang, "Use of a hypercrosslinked triphenylamine polymer as an efficient adsorbent for the enrichment of phenylurea herbicides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1538, pp. 1–7, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.033.

[181] Z. Li, "A disease-specific screening-level modeling approach for assessing the cancer risks of pesticide mixtures," *Chemosphere*, vol. 286, p. 131811, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131811.

[182] I. M. de Brito Sá Stoppelli and S. Crestana, "Pesticide exposure and cancer among rural workers from Bariri, São Paulo State, Brazil," *Environ. Int.*, vol. 31, no. 5, pp. 731–738, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.002.

[183] J.-P. Antignac *et al.*, "Persistent organochlorine pesticides in periprostatic adipose tissue from men with prostate cancer: Ethno-geographic variations, association with disease aggressiveness," *Environ. Res.*, vol. 216, p. 114809, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114809.

[184] M. Landau-Ossondo *et al.*, "Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 63, no. 6, pp. 383–395, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.04.043.

[185] G. M. Calaf, "Role of organophosphorous pesticides and acetylcholine in breast carcinogenesis," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 76, pp. 206–217, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.016.

[186] D. Montes-Grajales and J. Olivero-Verbel, "Structure-based Identification of Endocrine Disrupting Pesticides Targeting Breast Cancer Proteins," *Toxicology*, vol. 439, p. 152459, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152459.

[187] W. J. Lee *et al.*, "Pesticide exposure and lung cancer mortality in Leningrad province in Russia," *Environ. Int.*, vol. 32, no. 3, pp. 412–416, 2006, doi:

https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.10.001.

[188] F. L. Martin, E. Z. Martinez, H. Stopper, S. B. Garcia, S. A. Uyemura, and V. Kannen, “Increased exposure to pesticides and colon cancer: Early evidence in Brazil,” *Chemosphere*, vol. 209, pp. 623–631, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.118.

[189] M. Brugel, C. Carlier, G. Reyes-Castellanos, S. Callon, A. Carrier, and O. Bouché, “Pesticides and pancreatic adenocarcinoma: A transversal epidemiological, environmental and mechanistic narrative review,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 54, no. 12, pp. 1605–1613, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.dld.2022.08.023.

[190] P. K. Mills and R. C. Yang, “Agricultural exposures and gastric cancer risk in Hispanic farm workers in California,” *Environ. Res.*, vol. 104, no. 2, pp. 282–289, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.11.008.

[191] E. Y. Park, J. Kim, E. Park, J.-K. Oh, B. Kim, and M. K. Lim, “Serum concentrations of persistent organic pollutants and colorectal cancer risk: A case-cohort study within Korean National Cancer Center Community (KNCCC) cohort,” *Chemosphere*, vol. 271, p. 129596, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129596.

[192] A. Saad-Hussein *et al.*, “Early prediction of liver carcinogenicity due to occupational exposure to pesticides,” *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 838, pp. 46–53, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.004.

[193] S. Mostafalou and M. Abdollahi, “Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 268, no. 2, pp. 157–177, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025.

[194] N. Mathas *et al.*, “Inhibition by pesticides of the DJ-1/Park7 protein related to Parkinson disease.,” *Toxicology*, vol. 487, p. 153467, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153467.

[195] K. C. Paul and B. Ritz, “Epidemiology meets toxicogenomics: Mining toxicologic evidence in support of an untargeted analysis of pesticides exposure and Parkinson’s disease,” *Environ. Int.*, vol. 170, p. 107613, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107613.

[196] Y. Li *et al.*, “The association between toxic pesticide environmental exposure and Alzheimer’s disease: A scientometric and visualization analysis,” *Chemosphere*, vol. 263, p. 128238, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128238.

[197] A. Moya *et al.*, “Reproductive toxicity by exposure to low concentrations of pesticides in Caenorhabditis elegans,” *Toxicology*, vol. 475, p. 153229, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153229.

[198] J. García, M. I. Ventura, M. Requena, A. F. Hernández, T. Parrón, and R. Alarcón, “Association of reproductive disorders and male congenital anomalies with environmental exposure to endocrine active pesticides,” *Reprod. Toxicol.*, vol. 71, pp. 95–100, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.011.

[199] M. Weselak, T. E. Arbuckle, D. T. Wigle, M. C. Walker, and D. Krewski, "Pre- and post-conception pesticide exposure and the risk of birth defects in an Ontario farm population," *Reprod. Toxicol.*, vol. 25, no. 4, pp. 472–480, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.05.060.

[200] C. Kielb *et al.*, "Maternal periconceptional occupational exposure to pesticides and selected musculoskeletal birth defects," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 217, no. 2, pp. 248–254, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.06.003.

[201] M. P. Montgomery, F. Kamel, T. M. Saldana, M. C. R. Alavanja, and D. P. Sandler, "Incident Diabetes and Pesticide Exposure among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 167, no. 10, pp. 1235–1246, May 2008, doi: 10.1093/aje/kwn028.

[202] E. Evangelou *et al.*, "Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis," *Environ. Int.*, vol. 91, pp. 60–68, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.013.

[203] I. Graiet, H. Hamdi, S. Abid-Essefi, and J. Eyer, "Fludioxonil, a phenylpyrrol pesticide, induces Cytoskeleton disruption, DNA damage and apoptosis via oxidative stress on rat glioma cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 170, p. 113464, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113464.

[204] Y.-H. Chiu *et al.*, "Association between intake of fruits and vegetables by pesticide residue status and coronary heart disease risk," *Environ. Int.*, vol. 132, p. 105113, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105113.

[205] J. Lv *et al.*, "National temporal trend for organophosphate pesticide DDT exposure and associations with chronic kidney disease using age-adapted eGFR model," *Environ. Int.*, vol. 169, p. 107499, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107499.

[206] A. M. Mora *et al.*, "Prenatal pesticide exposure and respiratory health outcomes in the first year of life: Results from the infants' Environmental Health (ISA) study," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 225, p. 113474, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113474.

[207] P. Mazellier, C. Busset, A. Delmont, and J. De Laat, "A comparison of fenuron degradation by hydroxyl and carbonate radicals in aqueous solution," *Water Res.*, vol. 41, no. 20, pp. 4585–4594, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.066.

[208] F. G. Tamayo, J. L. Casillas, and A. Martin-Esteban, "Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 482, no. 2, pp. 165–173, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00213-7.

[209] C. Federico, S. Motta, C. Palmieri, M. Pappalardo, V. Librando, and S. Saccone, "Phenylurea herbicides induce cytogenetic effects in Chinese hamster cell lines," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 721, no. 1, pp. 89–94, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.013.

[210] J. O. Ighalo, A. G. Adeniyi, and A. A. Adelodun, "Recent advances on the

adsorption of herbicides and pesticides from polluted waters: Performance evaluation via physical attributes," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 93, pp. 117–137, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.10.011.

[211] H. Ge, Z. Lin, Z. Yao, Y. Gao, Y. Cong, and H. Yu, "Balance between herbicidal activity and toxicity effect: A case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on Selenastrum capricornutum and Photobacterium phosphoreum," *Aquat. Toxicol.*, vol. 150, pp. 165–174, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.007.

[212] M. E. A. Kribéche, T. Sehili, G. Lesage, J. Mendret, and S. Brosillon, "Insight into photochemical oxidation of Fenuron in water using iron oxide and oxalate: The roles of the dissolved oxygen," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 329, pp. 120–129, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.06.021.

[213] W. Hayat, Z. Liu, Y. Wan, X. Du, S. Huang, and Y. Zhang, "The degradation of Fenuron in water by activated persulfate oxidation: An analysis of efficiency, influential parameters and potential applicability," *Chem. Eng. J.*, vol. 445, p. 136688, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136688.

[214] M. Canle L, S. Rodríguez, L. F. Rodríguez Vázquez, J. A. Santaballa, and S. Steenken, "First stages of photodegradation of the urea herbicides Fenuron, Monuron and Diuron," *J. Mol. Struct.*, vol. 565–566, pp. 133–139, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00940-6.

[215] E. Forgács and T. Cserháti, "9 - Gas chromatography," in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, M. B. T.-F. A. and T. Lees, Ed. Woodhead Publishing, 2003, pp. 197–217.

[216] A. G. Nicolaou, M. C. Christodoulou, I. J. Stavrou, and C. P. Kapnissi-Christodoulou, "Analysis of cannabinoids in conventional and alternative biological matrices by liquid chromatography: Applications and challenges," *J. Chromatogr. A*, vol. 1651, p. 462277, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462277.

[217] E. Baltussen, H. Snijders, H.-G. Janssen, P. Sandra, and C. A. Cramers, "Determination of phenylurea herbicides in water samples using on-line sorptive preconcentration and high-performance liquid chromatography with UV or electrospray mass spectrometric detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 802, no. 2, pp. 285–295, 1998, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01182-5.

[218] O. Coskun, "Separation techniques: Chromatography.," *North. Clin. Istanbul*, vol. 3, no. 2, pp. 156–160, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.

[219] "D. Skoog, F. Holler, and S. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, 7th ed. , 2018."

[220] S. W. Lewis, "Chromatography: Basic Principles," M. M. B. T.-E. of F. S. Houck Third Edition (Third Edition), Ed. Oxford: Elsevier, 2023, pp. 558–565.

[221] K. Sakodynskii, "The life and scientific workds of Michael Tswett," *J. Chromatogr. A*, vol. 73, no. 2, pp. 303–360, 1972, doi:

https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91213-0.

[222] F. Haghighi, Z. Talebpour, and A. S. Nezhad, “Towards fully integrated liquid chromatography on a chip: Evolution and evaluation,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 105, pp. 302–337, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.002.

[223] C. Fernandes, R. Lima, M. M. M. Pinto, and M. E. Tiritan, “Chromatographic supports for enantioselective liquid chromatography: Evolution and innovative trends,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1684, p. 463555, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463555.

[224] R. M. Smith, “Chapter 2 Column liquid chromatography,” in *chromatography 6 edition*, vol. 69, E. B. T.-J. of C. L. Heftmann, Ed. Elsevier, 2004, pp. 95–138.

[225] H. Røberg-Larsen, E. Lundanes, T. A. Nyman, F. S. Berven, and S. R. Wilson, “Liquid chromatography, a key tool for the advancement of single-cell omics analysis,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1178, p. 338551, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338551.

[226] K. K. Unger, S. Lamotte, and E. Machtejevas, “Chapter 3 - Column Technology in Liquid Chromatography,” S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers, and D. B. T.-L. C. Lloyd, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2013, pp. 41–86.

[227] S. Czaplicki, “Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds,” 2013, pp. 99–122.

[228] E. Forgács and T. Cserháti, “CHROMATOGRAPHY | Principles,” B. B. T.-E. of F. S. and N. (Second E. Caballero, Ed. Oxford: Academic Press, 2003, pp. 1259–1267.

[229] K. NAGY and K. VÉKEY, “Chapter 5 - Separation methods,” K. Vékey, A. Telekes, and A. B. T.-M. A. of M. S. Vertes, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2008, pp. 61–92.

[230] M. Goli *et al.*, “Chapter 8 - LC-MS/MS in glycomics and glycoproteomics analyses,” Z. B. T.-C. A. by M. L. P. S. T. (Second E. El Rassi, Ed. Amsterdam: Elsevier, 2021, pp. 391–441.

[231] A. S. Rathore and S. Joshi, “Liquid Chromatography | Historical Development,” P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, and M. B. T.-E. of A. S. (Third E. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 86–92.

[232] R. P. W. Scott, “CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Detectors: Refractive Index Detectors,” I. D. B. T.-E. of S. S. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2000, pp. 623–630.

[233] R. M. Lamuela-Raventós, A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, M. Martínez-Huélamo, and P. Quifer-Rada, “Chapter 14 - Improved Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography,” R. R. B. T.-P. in P. Watson, Ed. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 261–292.

[234] K. D. Bartle and P. Myers, “History of gas chromatography,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 9, pp. 547–557, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00806-3.

[235] V. G. Berezkin and A. V. B. T.-R. M. in C. Topchiev Molecular Sciences and Chemical Engineering, “GAS CHROMATOGRAPHY | Gas–Solid Chromatography☆,” Elsevier, 2013.

[236] O. Deda, H. Gika, N. Raikos, and G. Theodoridis, “Chapter 4 - GC-MS-Based Metabolic Phenotyping,” J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and E. B. T.-T. H. of M. P. Holmes, Eds. Elsevier, 2019, pp. 137–169.

[237] D. French, “Chapter Five - Advances in Clinical Mass Spectrometry,” vol. 79, G. S. B. T.-A. in C. C. Makowski, Ed. Elsevier, 2017, pp. 153–198.

[238] R. A. Shellie, “Gas Chromatography,” J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. B. T.-E. of F. S. (Second E. Houck, Eds. Waltham: Academic Press, 2013, pp. 579–585.

[239] N. P. Cheremisinoff, “1 - CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES,” N. P. B. T.-P. C. Cheremisinoff, Ed. Westwood, NJ: William Andrew Publishing, 1996, pp. 1–15.

[240] D. S. Hage, “1 - Chromatography,” N. Rifai, A. R. Horvath, and C. T. B. T.-P. and A. of C. M. S. Wittwer, Eds. Elsevier, 2018, pp. 1–32.

[241] H. Uchikawa, “20 - Specialized Techniques,” V. S. Ramachandran and J. J. B. T.-H. of A. T. in C. S. and T. Beaudoin, Eds. Norwich, NY: William Andrew Publishing, 2001, pp. 820–934.

[242] K. L. Valkó, “Chapter 13 - Application of HPLC measurements for the determination of physicochemical and biomimetic properties to model in vivo drug distribution in support of early drug discovery,” in *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, vol. 8, K. l. B. T.-H. of A. S. Valkó, Ed. Elsevier Science B.V., 2020, pp. 667–758.

[243] E. Stauffer, J. A. Dolan, and R. Newman, “CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry,” E. Stauffer, J. A. Dolan, and R. B. T.-F. D. A. Newman, Eds. Burlington: Academic Press, 2008, pp. 235–293.

[244] C. M. Hussain, D. Rawtani, G. Pandey, and M. Tharmavaram, “Chapter 11 - Hyphenated techniques for forensic sample analysis,” C. M. Hussain, D. Rawtani, G. Pandey, and M. B. T.-H. of A. T. for F. S. Tharmavaram, Eds. Elsevier, 2021, pp. 189–211.

[245] M. Stoeppler, “Chapter 6 - Analytical methods and instrumentation – a summarizing overview,” in *Hazardous Metals in the Environment*, vol. 12, M. B. T.-T. and I. in A. C. Stoeppler, Ed. Elsevier, 1992, pp. 97–132.

[246] S. Paul, A. Saikia, V. Majhi, and V. K. Pandey, “Chapter 5 - Analytical instruments,” S. Paul, A. Saikia, V. Majhi, and V. K. B. T.-I. to B. I. and I. A. Pandey, Eds. Academic Press, 2021, pp. 213–250.

[247] G. S. Douglas, S. D. Emsbo-Mattingly, S. A. Stout, A. D. Uhler, and K. J. McCarthy, “Chapter 8 - Hydrocarbon Fingerprinting Methods,” B. L. Murphy and R. D. B. T.-I. to E. F. (Third E. Morrison, Eds. San Diego: Academic Press, 2015, pp. 201–309.

[248] A. I. Ruiz-Matute, S. Rodríguez-Sánchez, M. L. Sanz, and A. C. Soria, “Chapter 12 - Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC),”

D.-W. B. T.-M. T. for F. A. (Second E. Sun, Ed. Academic Press, 2018, pp. 415–458.

[249] C. F. Poole, “GAS CHROMATOGRAPHY | Instrumentation,” P. Worsfold, A. Townshend, and C. B. T.-E. of A. S. (Second E. Poole, Eds. Oxford: Elsevier, 2005, pp. 65–74.

[250] D. S. Hage, “Chapter 8 - Chromatography and electrophoresis,” W. Clarke and M. A. B. T.-C. P. in C. C. (Fourth E. Marzinke, Eds. Academic Press, 2019, pp. 135–157.

[251] H. Hopfer, “Gas Chromatography,” P. L. H. McSweeney and J. P. B. T.-E. of D. S. (Third E. McNamara, Eds. Oxford: Academic Press, 2022, pp. 382–390.

[252] John Roboz, “A History of Ion Current Detectors for Mass Spectrometry,” M. L. Gross and R. M. B. T.-T. E. of M. S. Caprioli, Eds. Boston: Elsevier, 2016, pp. 183–188.

[253] T. Feng, M. Sun, S. Song, H. Zhuang, and L. Yao, “12 - Gas chromatography for food quality evaluation,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, J. Zhong and X. B. T.-E. T. for F. Q. Wang, Eds. Woodhead Publishing, 2019, pp. 219–265.

[254] P. Q. Tranchida and L. Mondello, “Chapter 6 - Detectors and basic data analysis,” in *Basic Multidimensional Gas Chromatography*, vol. 12, N. H. B. T.-S. S. and T. Snow, Ed. Academic Press, 2020, pp. 205–227.

[255] P. Sudhakar, P. Latha, and P. V Reddy, “Chapter 17 - Analytical techniques,” P. Sudhakar, P. Latha, and P. V. B. T.-P. C. P. for P. and B. T. Reddy, Eds. Academic Press, 2016, pp. 137–149.

[256] E. Stauffer, J. A. Dolan, and R. Newman, “CHAPTER 5 - Detection of Ignitable Liquid Residues at Fire Scenes,” E. Stauffer, J. A. Dolan, and R. B. T.-F. D. A. Newman, Eds. Burlington: Academic Press, 2008, pp. 131–161.

[257] A. V JAIN, “CHAPTER 47 - Analysis of Organophosphate and Carbamate Pesticides and Anticholinesterase Therapeutic Agents,” R. C. B. T.-T. of O. & C. C. Gupta, Ed. Burlington: Academic Press, 2006, pp. 681–701.

[258] I. Ojanperä and I. Rasanen, “Chapter 11 Forensic screening by gas chromatography,” in *Forensic Science*, vol. 6, M. J. B. T.-H. of A. S. Bogusz, Ed. Elsevier Science B.V., 2008, pp. 403–424.

[259] R. A. Shellie and W. S. Heng, “Gas Chromatography,” M. M. B. T.-E. of F. S. Houck Third Edition (Third Edition), Ed. Oxford: Elsevier, 2023, pp. 1–9.

[260] C. F. Poole, “GAS CHROMATOGRAPHY | Detectors,” P. Worsfold, A. Townshend, and C. B. T.-E. of A. S. (Second E. Poole, Eds. Oxford: Elsevier, 2005, pp. 95–105.

[261] C. J. Cowper, “GAS ANALYSIS: GAS CHROMATOGRAPHY,” I. D. B. T.-E. of S. S. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2000, pp. 2925–2932.

[262] D. McMinn, “CHROMATOGRAPHY: GAS | Detectors: General (Flame Ionization Detectors and Thermal Conductivity Detectors),” I. D. B. T.-E.

of S. S. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2000, pp. 443–447.

[263] E. R. Adlard and C. F. Poole, “CHROMATOGRAPHY: GAS | Historical Development,” I. D. B. T.-E. of S. S. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2000, pp. 513–520.

[264] F. G. Kitson, B. S. Larsen, and C. N. McEwen, “Chapter 1 - What Is GC/MS?,” F. G. Kitson, B. S. Larsen, and C. N. B. T.-G. C. and M. S. McEwen, Eds. San Diego: Academic Press, 1996, pp. 3–23.

[265] G. Büyükköroğlu, D. D. Dora, F. Özdemir, and C. Hızel, “Chapter 15 - Techniques for Protein Analysis,” D. Barh and V. B. T.-O. T. and B.-E. Azevedo, Eds. Academic Press, 2018, pp. 317–351.

[266] R. W. Smith, “Mass Spectrometry,” J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. B. T.-E. of F. S. (Second E. Houck, Eds. Waltham: Academic Press, 2013, pp. 603–608.

[267] D. Zagorevskii, “2.28 - Mass Spectrometry,” J. A. McCleverty and T. J. B. T.-C. C. C. I. I. Meyer, Eds. Oxford: Pergamon, 2003, pp. 367–380.

[268] W. V Ligon, “Organic Mass Spectrometry,” K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilschner, E. J. Kramer, S. Mahajan, and P. B. T.-E. of M. S. and T. Veyssière, Eds. Oxford: Elsevier, 2001, pp. 6552–6555.

[269] R. Sleeman and J. F. Carter, “MASS SPECTROMETRY | Overview,” P. Worsfold, A. Townshend, and C. B. T.-E. of A. S. (Second E. Poole, Eds. Oxford: Elsevier, 2005, pp. 337–344.

[270] A. Saitman, “Chapter 13 - Overview of Analytical Methods in Drugs of Abuse Analysis: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Liquid Chromatography Combined With Tandem Mass Spectrometry and Related Methods,” A. B. T.-C. I. in A. and D. of A. T. (Second E. Dasgupta, Ed. Academic Press, 2019, pp. 157–171.

[271] Á. SOMOGYI, “Chapter 6 - Mass spectrometry instrumentation and techniques,” K. Vékey, A. Telekes, and A. B. T.-M. A. of M. S. Vertes, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2008, pp. 93–140.

[272] F. A. Mellon, “MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation,” B. B. T.-E. of F. S. and N. (Second E. Caballero, Ed. Oxford: Academic Press, 2003, pp. 3739–3749.

[273] A. Amoresano and P. Pucci, “Chapter 4 - Mass spectrometry in metabolomics,” J. B. T.-M. P. Troisi, Ed. Academic Press, 2022, pp. 109–147.

[274] W. B. Dunn, “Chapter two - Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction,” in *Methods in Systems Biology*, vol. 500, D. Jameson, M. Verma, and H. V. B. T.-M. in E. Westerhoff, Eds. Academic Press, 2011, pp. 15–35.

[275] W. Clarke, “Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls,” H. Nair and W. B. T.-M. S. for the C. L. Clarke, Eds. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 1–15.

[276] J. Schuberth, “ANALYTICAL TECHNIQUES | Mass Spectrometry,” J. A. B. T.-E. of F. S. Siegel, Ed. Oxford: Elsevier, 2000, pp. 155–161.

[277] A. Kashefian Naieni, F. Bahrami, N. Yasrebi, and B. Rashidian, “Design and study of an enhanced Faraday cup detector,” *Vacuum*, vol. 83, no. 8, pp. 1095–1099, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2009.01.005.

[278] J. D. Thomas, G. S. Hodges, D. G. Seely, N. A. Moroz, and T. J. Kvale, “Performance enhancement study of an electrostatic Faraday cup detector,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, vol. 536, no. 1, pp. 11–21, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.nima.2004.07.211.

[279] A. Masoumzadeh, M. Habibi, and M. Afsharmanesh, “Design, construction and test of an optimized Faraday cup for beam current determination of a helicon ion source,” *Vacuum*, vol. 159, pp. 99–104, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.10.008.

[280] R. J. N. Bettencourt da Silva, “Evaluation of trace analyte identification in complex matrices by low-resolution gas chromatography – Mass spectrometry through signal simulation,” *Talanta*, vol. 150, pp. 553–567, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.033.

[281] M. J. Kristo, “Chapter 13 - Nuclear forensics,” M. F. B. T.-H. of R. A. V. 2 (Fourth E. L’Annunziata, Ed. Academic Press, 2020, pp. 921–951.

[282] O. D. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. Kitson, “Chapter 1 - Introduction and History,” O. D. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. B. T.-G. C. and M. S. (Second E. Kitson, Eds. Amsterdam: Academic Press, 2011, pp. 2–13.

[283] A. L. Rockwood, M. M. Kushnir, and N. J. Clarke, “2 - Mass Spectrometry,” N. Rifai, A. R. Horvath, and C. T. B. T.-P. and A. of C. M. S. Wittwer, Eds. Elsevier, 2018, pp. 33–65.

[284] G. Kaklamanos, E. Aprea, and G. Theodoridis, “Chapter 9 - Mass Spectrometry,” Y. B. T.-C. A. of F. T. and A. Picó, Ed. Boston: Academic Press, 2012, pp. 249–283.

[285] S. Wu, G. Lyu, and R. Lou, “Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis,” 2012.

[286] Y. Picó, “3.28 - Recent Advances in Sample Preparation for Pesticide Analysis,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 569–590.

[287] S. I. Kaya, A. Cetinkaya, and S. A. Ozkan, “Molecularly imprinted polymers as highly selective sorbents in sample preparation techniques and their applications in environmental water analysis,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 37, p. e00193, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00193.

[288] D. T. P. Scanferla, R. Sano Lini, C. Marchioni, and S. A. G. Mossini, “Drugs of abuse: A narrative review of recent trends in biological sample preparation and chromatographic techniques,” *Forensic Chem.*, vol. 30, p. 100442, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.forc.2022.100442.

[289] Y. Meng and J. L. Anderson, “3.46 - Use of Unconventional Solvents for Sample Preparation in Environmental Analysis,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 943–970.

[290] B. Hu and M. He, “3.19 - Pre-concentration and Sample Treatment Techniques for Trace Element Analysis,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 365–394.

[291] Y.-X. Gu, T.-C. Yan, Z.-X. Yue, F.-M. Liu, J. Cao, and L.-H. Ye, “Recent developments and applications in the microextraction and separation technology of harmful substances in a complex matrix,” *Microchem. J.*, vol. 176, p. 107241, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107241.

[292] H. Kataoka, “2.29 - Column-Switching Sample Preparation,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 649–676.

[293] N. B. Turan, D. S. Chormey, Ç. Büyükpınar, G. O. Engin, and S. Bakirdere, “Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 91, pp. 1–11, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007.

[294] J. A. Khan and S. Jabin, “Chapter 8 - Ionic liquids as valuable assets in extraction techniques,” J. A. Siddique, S. P. Ansari, A. A. P. Khan, and A. M. B. T.-A. A. of I. L. Asiri, Eds. Elsevier, 2023, pp. 199–221.

[295] D. S. Chormey, B. T. Zaman, N. A. Kasa, and S. Bakırdere, “Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 128, p. 115917, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115917.

[296] P. B. Kyle, “Chapter 7 - Toxicology: GCMS,” H. Nair and W. B. T.-M. S. for the C. L. Clarke, Eds. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 131–163.

[297] T. Prasada Rao and V. M. Biju, “SPECTROPHOTOMETRY | Organic Compounds,” P. Worsfold, A. Townshend, and C. B. T.-E. of A. S. (Second E. Poole, Eds. Oxford: Elsevier, 2005, pp. 358–366.

[298] Z. Berk, “Chapter 11 - Extraction,” in *Food Science and Technology*, Z. B. T.-F. P. E. and T. (Third E. Berk, Ed. Academic Press, 2018, pp. 289–310.

[299] L. Humbert, G. Hoizey, and M. Lhermitte, “Chapter 7 - Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes (DFC): Analytical Aspects: 1—Blood and Urine,” P. B. T.-T. A. of D.-F. C. Kintz, Ed. Oxford: Academic Press, 2014, pp. 159–180.

[300] R. Keçili, S. Büyüktiryaki, İ. Dolak, and C. M. Hussain, “5 - The use of magnetic nanoparticles in sample preparation devices and tools,” C. B. T.-H. of N. in A. C. Mustansar Hussain, Ed. Elsevier, 2020, pp. 75–95.

[301] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, and V. Cerdà, “Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I),” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 641–654, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015.

[302] K. Bielicka-Daszkiewicz and A. Voelkel, “Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents,” *Talanta*, vol. 80, no. 2, pp. 614–621, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.037.

[303] P. K. Mukherjee, “Chapter 13 - Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs,” P. K. B. T.-Q. C. and E. of H. D. Mukherjee, Ed. Elsevier, 2019, pp. 515–537.

[304] N. Bagheri, H. A. J. Al Lawati, J. Hassanzadeh, and I. Al Lawati, “Novel amino-functionalized magnetic metal-organic framework/layered double hydroxide adsorbent for microfluidic solid phase extraction: Application for vitamin D3,” *Talanta*, vol. 256, p. 124272, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124272.

[305] G. J. Maranata, N. O. Surya, and A. N. Hasanah, “Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique,” *Heliyon*, vol. 7, no. 1, p. e05934, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05934.

[306] M. Rutkowska, J. Płotka-Wasylka, M. Sajid, and V. Andruch, “Liquid–phase microextraction: A review of reviews,” *Microchem. J.*, vol. 149, p. 103989, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103989.

[307] E. Karrar, I. A. M. Ahmed, M. F. Manzoor, W. Wei, F. Sarpong, and X. Wang, “Lipid-soluble vitamins from dairy products: Extraction, purification, and analytical techniques,” *Food Chem.*, vol. 373, p. 131436, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131436.

[308] D. S. Chormey and S. Bakırdere, “Chapter Seven - Principles and Recent Advancements in Microextraction Techniques,” in *Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors*, vol. 81, D. S. Chormey, S. Bakırdere, N. B. Turan, and G. Ö. B. T.-C. A. C. Engin, Eds. Elsevier, 2018, pp. 257–294.

[309] B. A. Weggler, B. Gruber, P. Teehan, R. Jaramillo, and F. L. Dorman, “Chapter 5 - Inlets and sampling,” in *Basic Multidimensional Gas Chromatography*, vol. 12, N. H. B. T.-S. S. and T. Snow, Ed. Academic Press, 2020, pp. 141–203.

[310] X. Song and X. Huang, “Recent developments in microextraction techniques for detection and speciation of heavy metals,” *Adv. Sample Prep.*, vol. 2, p. 100019, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100019.

[311] S. Risticevic, D. Vuckovic, H. L. Lord, and J. Pawliszyn, “2.21 - Solid-Phase Microextraction,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 419–460.

[312] B. Chiofalo and V. Lo Presti, “4.04 - Sampling Techniques for the Determination of Volatile Components in Food of Animal Origin,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 61–85.

[313] J. R. Dean, “SOLID-PHASE MICROEXTRACTION | Overview,” I. D. B. T.-E. of S. S. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2000, pp. 4190–4199.

[314] J. Lee, D.-H. Kim, P.-S. Chang, and J. Lee, “Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) analysis of oxidized volatiles from free fatty acids (FFA) and application for measuring hydrogen donating antioxidant activity,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 1, pp. 414–420, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.059.

[315] Y. Nolvachai, M. S. S. Amaral, R. Herron, and P. J. Marriott, “Solid phase microextraction for quantitative analysis – Expectations beyond design?,” *Green Anal. Chem.*, vol. 4, p. 100048, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100048.

[316] S. Tang *et al.*, “Single-drop microextraction,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 108, pp. 306–313, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.016.

[317] E. Psillakis and N. Kalogerakis, “Developments in single-drop microextraction,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 54–64, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00126-1.

[318] Z. A. ALOthman, M. Dawod, J. Kim, and D. S. Chung, “Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 739, pp. 14–24, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.005.

[319] S. K. Kailasa, J. R. Koduru, T. J. Park, R. K. Singhal, and H.-F. Wu, “Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 29, p. e00113, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00113.

[320] I. Delove Tegladza *et al.*, “Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 393, p. 122403, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122403.

[321] D. Bitas and V. Samanidou, “Chapter 23 - Biomedical Applications,” in *Handbooks in Separation Science*, C. F. B. T.-L.-P. E. Poole, Ed. Elsevier, 2020, pp. 683–723.

[322] G. Leng *et al.*, “A simple and rapid head space-single drop microextraction-‘spectro-pipette’ (HS-SDME-SP) method for the on-site measurement of arsenic species in natural waters,” *Microchem. J.*, vol. 168, p. 106441, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106441.

[323] I. Kiszkiel-Taudul and B. Starczewska, “Single drop microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SDME-LC-MS/MS) for determination of ranitidine in water samples,” *Microchem. J.*, vol. 145, pp. 936–941, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.12.015.

[324] L. Xu, C. Basheer, and H. K. Lee, “Developments in single-drop microextraction,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1152, no. 1, pp. 184–192, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.073.

[325] Ł. Marcinkowski, F. Pena-Pereira, A. Kloskowski, and J. Namieśnik, “Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 153–168, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.024.

[326] S. Dadfarnia and A. M. Haji Shabani, “Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 658, no. 2, pp. 107–119, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.022.

[327] J. Yan, C. zhang, C. Wang, D. Lu, and S. Chen, “Solidified floating organic drop microextraction in tandem with syringe membrane miro-solid phase extraction for sequential detection of thallium (III) and thallium (I) by graphite furnace atomic absorption spectrometry,” *Arab. J. Chem.*, vol. 15, no. 12, p. 104335, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104335.

[328] A. R. Hussein, M. S. Gburi, N. M. Muslim, and E. A. Azooz, “A greenness evaluation and environmental aspects of solidified floating organic drop microextraction for metals: A review,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 37, p. e00194, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00194.

[329] C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M. E. Torres-Padrón, and J. J. Santana-Rodríguez, “Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 5, pp. 731–748, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.011.

[330] P. Viñas, N. Campillo, and V. Andruch, “Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 48–77, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.005.

[331] M. Beiranvand and A. Ghiasvand, “The comparison of two microextraction methods for the determination of safranal from Iranian saffron,” *Green Anal. Chem.*, vol. 3, p. 100021, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100021.

[332] M. Chamsaz, J. Akhoundzadeh, and M. H. Arbab-zavar, “Preconcentration of lead using solidification of floating organic drop and its determination by electrothermal atomic absorption spectrometry,” *J. Adv. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 361–366, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.002.

[333] M. S. Bidabadi, S. Dadfarnia, and A. M. H. Shabani, “Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS),” *J. Hazard. Mater.*, vol. 166, no. 1, pp. 291–296, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.052.

[334] C. M. Hussain and R. Keçili, “Chapter 4 - Sampling and Sample preparation techniques for environmental analysis,” C. M. Hussain and R. B. T.-M. E. A. T. for P. Keçili, Eds. Elsevier, 2020, pp. 75–119.

[335] I. Rykowska, J. Ziemblińska, and I. Nowak, “Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review,” *J. Mol. Liq.*, vol. 259, pp. 319–339, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.043.

[336] X.-H. ZANG, Q.-H. WU, M.-Y. ZHANG, G.-H. XI, and Z. WANG, “Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique,” *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 37, no. 2, pp. 161–168, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1.

[337] A. Zgoła-Grześkowiak and T. Grześkowiak, “Dispersive liquid-liquid microextraction,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 9, pp. 1382–1399, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.trac.2011.04.014.

[338] M. Rezaee, Y. Yamini, and M. Faraji, “Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2342–2357, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088.

[339] E. G. Primel, S. S. Caldas, L. C. Marube, and A. L. V. Escarrone, “An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 14, pp. 1–18, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.03.001.

[340] B. M. C. Botrel, D. C. P. Abreu, A. A. Saczk, M. J. F. Bazana, C. de F. Nascimento, and P. V. e Rosa, “Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of menthol residue in fish by GC–MS,” *Microchem. J.*, vol. 133, pp. 70–75, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.008.

[341] M.-J. LI, H.-Y. ZHANG, X.-Z. LIU, C.-Y. CUI, and Z.-H. SHI, “Progress of Extraction Solvent Dispersion Strategies for Dispersive Liquid-liquid Microextraction,” *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 43, no. 8, pp. 1231–1240, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60851-9.

[342] L. F. de M. Guedes, B. F. Braz, A. S. Freire, and R. E. Santelli, “Assessing the harmfulness of high-salinity oilfield-produced water related to trace metals using vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with inductively coupled plasma optical emission spectrometry,” *Microchem. J.*, vol. 155, p. 104714, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104714.

[343] M. Shahvalinia, A. Larki, and K. Ghanemi, “Smartphone-based colorimetric determination of triclosan in aqueoussamples after ultrasound assisted-dispersive liquid–liquid microextraction under optimized response surface method conditions,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 278, p. 121323, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121323.

[344] M. A. Vargas-Muñoz, V. Cerdà, L. S. Cadavid-Rodríguez, and E. Palacio, “Automated method for volatile fatty acids determination in anaerobic processes using in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with flame ionization detector,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1643, p. 462034, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462034.

[345] A. K. El-Deen and K. Shimizu, “A green air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of a novel low viscous ternary deep eutectic solvent for the enrichment of endocrine disrupting compounds from water,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1629, p. 461498, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461498.

[346] D. Wianowska, M. Gil, and M. Olszowy, “Chapter 5 - Miniaturized methods of sample preparation,” C. M. B. T.-H. on M. in A. C. Hussain, Ed. Elsevier, 2020, pp. 99–125.

[347] S. Bodur and E. G. Bakırdere, “Simultaneous determination of selected herbicides in dam lake, river and well water samples by gas chromatography mass spectrometry after vortex assisted binary solvent

liquid phase microextraction," *Microchem. J.*, vol. 145, pp. 168–172, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.033.

[348] A. Elik, D. Bingöl, and N. Altunay, "Ionic hydrophobic deep eutectic solvents in developing air-assisted liquid-phase microextraction based on experimental design: Application to flame atomic absorption spectrometry determination of cobalt in liquid and solid samples," *Food Chem.*, vol. 350, p. 129237, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129237.

[349] J. M. Kokosa and A. Przyjazny, "Green microextraction methodologies for sample preparations," *Green Anal. Chem.*, vol. 3, p. 100023, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100023.

[350] Y. Dikmen, A. Güleryüz, B. Metin, S. Bodur, M. Öner, and S. Bakirdere, "A novel and rapid extraction protocol for sensitive and accurate determination of prochloraz in orange juice samples: Vortex assisted spraying based fine droplet formation liquid phase microextraction before gas chromatography-mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 55, p. e4622, Jul. 2020, doi: 10.1002/jms.4622.

[351] "Bilimsel Görüntü ve İllüstrasyon Yazılımları | BioRender." https://www.biorender.com/.

[352] R. Gotti, B. Pasquini, S. Orlandini, and S. Furlanetto, "Recent applications of the derivatization techniques in capillary electrophoresis," *J. Pharm. Biomed. Anal. Open*, vol. 1, p. 100003, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.jpbao.2023.100003.

[353] S. Görög, "Chromatography | Derivatization of Analytes☆," P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, and M. B. T.-E. of A. S. (Third E. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 42–52.

[354] C. D. Stalikas and Y. C. Fiamegos, "Microextraction combined with derivatization," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 27, no. 6, pp. 533–542, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.04.005.

[355] C. K. Choi and M. W. Dong, "5 - Sample Preparation for HPLC Analysis of Drug Products," in *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, vol. 6, S. Ahuja and M. W. B. T.-S. S. and T. Dong, Eds. Academic Press, 2005, pp. 123–144.

[356] B.-L. Qi, P. Liu, Q.-Y. Wang, W.-J. Cai, B.-F. Yuan, and Y.-Q. Feng, "Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 59, pp. 121–132, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.013.

[357] "D. R. Knapp, Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley & Sons, 1979."

[358] D. Parkinson, *Analytical Techniques for Scientists*. 2014.

[359] P. W. Emery, "Amino Acids: Chemistry and Classification," B. B. T.-E. of H. N. (Third E. Caballero, Ed. Waltham: Academic Press, 2013, pp. 64–71.

[360] A. V Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, and M. Á. Rodríguez-Delgado, "Pesticides and Herbicides: Types, Uses, and Determination of Herbicides," B. Caballero, P. M. Finglas, and F. B. T.-E.

of F. and H. Toldrá, Eds. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 326–332.

[361] Z. Tang and F. P. Guengerich, “Dansylation of unactivated alcohols for improved mass spectral sensitivity and application to analysis of cytochrome P450 oxidation products in tissue extracts.,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 18, pp. 7706–7712, Sep. 2010, doi: 10.1021/ac1015497.

[362] J. Segura, R. Ventura, and C. Jurado, “Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 713, no. 1, pp. 61–90, 1998, doi: https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00089-9.

[363] Y. He, “3.41 - Liquid-Based Microextraction Techniques for Environmental Analysis,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 835–862.

[364] H. L. Lord and E. A. Pfannkoch, “2.27 - Sample Preparation Automation for GC Injection,” J. B. T.-C. S. and S. P. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 597–612.

[365] H. T. Rasmussen and K. Huang, “8.7 Chromatographic Separations and Analysis: Chromatographic Separations and Analysis of Enantiomers,” E. M. Carreira and H. B. T.-C. C. Yamamoto, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2012, pp. 96–114.

[366] V. Zaikin and J. Halket, “Review: Derivatization in mass spectrometry 2. Acylation,” *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng).*, vol. 9, pp. 421–434, Feb. 2003, doi: 10.1255/ejms.576.

[367] A. Dobos, E. Hidvégi, and G. P. Somogyi, “Comparison of Five Derivatizing Agents for the Determination of Amphetamine-Type Stimulants in Human Urine by Extractive Acylation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 5, pp. 340–344, Jun. 2012, doi: 10.1093/jat/bks026.

[368] R. F. Kranenburg *et al.*, “Benefits of derivatization in GC–MS-based identification of new psychoactive substances,” *Forensic Chem.*, vol. 20, p. 100273, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100273.

[369] Y. Su, S. Xia, R. Wang, and L. Xiao, “13 - Phytohormonal quantification based on biological principles,” J. Li, C. Li, and S. M. B. T.-H. M. and S. in P. Smith, Eds. Academic Press, 2017, pp. 431–470.

[370] A. P. de Leenheer and L. M. Thienpont, “Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 11, no. 4, pp. 249–307, Jul. 1992, doi: https://doi.org/10.1002/mas.1280110402.

[371] F. M. Lagerwerf, W. D. van Dongen, R. J. J. M. Steenvoorden, M. Honing, and J. H. G. Jonkman, “Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC–MS–MS,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 19, no. 7, pp. 418–427, 2000, doi: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00009-1.

[372] L. Cuadros-Rodríguez, M. G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado, and A. M. Gómez-Sáez, “Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences,” *J. Chromatogr. A*,

vol. 1158, no. 1, pp. 33–46, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.030.

[373] K. G. Heumann, “Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 11, no. 1, pp. 41–67, Jan. 1992, doi: https://doi.org/10.1002/mas.1280110104.

[374] E. Pagliano and J. Meija, “A tool to evaluate nonlinearity in calibration curves involving isotopic internal standards in mass spectrometry,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 464, p. 116557, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijms.2021.116557.

[375] B. D. Roach, E. K. Fenske, R. H. Ilgner, C. R. Hexel, T. J. Haverlock, and J. M. Giaquinto, “Development of a fast and efficient analytical technique for the isotopic analysis of fission and actinide elements in environmental matrices,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1587, pp. 155–165, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.029.

[376] P. Rodríguez-González and J. I. García Alonso, “Mass Spectrometry | Isotope Dilution Mass Spectrometry,” P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, and M. B. T.-E. of A. S. (Third E. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 411–420.

[377] A. M. Zyakun, “What factors can limit the precision of isotope ratio measurements in the isotopomer pool?,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 229, no. 3, pp. 217–224, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S1387-3806(03)00342-7.

[378] J. Meija and Z. Mester, “Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 607, no. 2, pp. 115–125, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.050.

[379] E. Roth, “Critical evaluation of the use and analysis of stable isotopes (Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 69, no. 8, pp. 1753–1828, 1997, doi: doi:10.1351/pac199769081753.

[380] M. Henriksen-Lacey, V. Bramwell, and Y. Perrie, “Radiolabelling of Antigen and Liposomes for Vaccine Biodistribution Studies,” *Pharmaceutics*, vol. 2, pp. 91–104, Jun. 2010, doi: 10.3390/pharmaceutics2020091.

[381] J. Vogl and W. Pritzkow, “Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification,” *Mapan - J. Metrol. Soc. India*, vol. 25, pp. 135–164, Sep. 2010, doi: 10.1007/s12647-010-0017-7.

[382] A. Alvarez-Toral *et al.*, “Isotope dilution mass spectrometry for quantitative elemental analysis of powdered samples by radiofrequency pulsed glow discharge time of flight mass spectrometry,” *Talanta*, vol. 115, pp. 657–664, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.024.

[383] C. Hernández, M. Fernández, A. J. Quejido, D. M. Sánchez, R. Morante, and R. Martín, “Isotope dilution–thermal ionisation mass spectrometric analysis for tin in a fly ash material,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 571, no. 2, pp. 279–287, 2006, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.072.

[384] H. D. Wizemann, “Quantitative element analysis by isotope dilution in

diode laser graphite furnace atomic absorption spectrometry," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 63, no. 5, pp. 539–560, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.03.003.

[385] E. Pagliano and J. Meija, "Reducing the matrix effects in chemical analysis: Fusion of isotope dilution and standard addition methods," *Metrologia*, vol. 53, pp. 829–834, Apr. 2016, doi: 10.1088/0026-1394/53/2/829.

[386] E. Pagliano, Z. Mester, and J. Meija, "Reduction of measurement uncertainty by experimental design in high-order (double, triple, and quadruple) isotope dilution mass spectrometry: application to GC-MS measurement of bromide," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 9, pp. 2879–2887, 2013, doi: 10.1007/s00216-013-6724-5.

[387] R. M. Essex *et al.*, "Isotope dilution mass spectrometry as an independent assessment method for mass measurements of milligram quantities of aqueous solution," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 483, p. 116969, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116969.

[388] J. Vogl, "Measurement uncertainty in single, double and triple isotope dilution mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 3, pp. 275–281, Feb. 2012, doi: https://doi.org/10.1002/rcm.5306.

[389] E. Pagliano, J. Meija, and Z. Mester, "High-precision quadruple isotope dilution method for simultaneous determination of nitrite and nitrate in seawater by GCMS after derivatization with triethyloxonium tetrafluoroborate," *Anal. Chim. Acta*, vol. 824, pp. 36–41, 2014, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.018.

[390] P. Bedson, "Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS).," *R. Soc. Chem.*, 2002.

[391] C. Molíns Legua, P. Campíns Falcó, and A. Sevillano Cabeza, "Amphetamine and methamphetamine determination in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with sodium 1,2-napthoquinone 4-sulfonate as derivatizing agent and solid-phase extraction for sample clean-up," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 672, no. 1, pp. 81–88, 1995, doi: https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00201-S.

[392] H.-C. Chen, P.-D. Lee, and Y.-Z. Chang, "Development of a rapid and sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of commonly abused drugs in Asia in a micro-segment of a single hair using microwave-assisted extraction and dansyl chloride derivatization," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 213, p. 114678, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114678.

[393] S.-M. Wang, T.-C. Wang, and Y.-S. Giang, "Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid–liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic–isotope dilution mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, vol. 816, no. 1, pp. 131–143, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.11.027.

[394] B. P. dos Santos *et al.*, "A multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of 57 pharmaceuticals and illicit drugs in plasma, and its application to poisoning cases," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 222, p.

115082, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115082.

[395] L.-W. Chung, K.-L. Lin, T. C.-C. Yang, and M.-R. Lee, “Orthogonal array optimization of microwave-assisted derivatization for determination of trace amphetamine and methamphetamine using negative chemical ionization gas chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 18, pp. 4083–4089, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.020.

[396] S. Oflu, S. Erarpat, B. T. Zaman, Ö. T. Günkara, S. Bakırdere, and F. Turak, “Combination of quadrupole isotope dilution mass spectrometry with simultaneous derivatization and spray assisted droplet formation-liquid phase microextraction for the determination of methamphetamine in human urine and serum samples by gas chromatography,” *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 119, p. 107207, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.vascn.2022.107207.

[397] S. Oflu, S. Erarpat, B. T. Zaman, K. Eroğlu, Ö. T. Günkara, S. Bakırdere and F. Turak, “Quantification of trace fenuron in waste water samples by matrix matching calibration strategy and gas chromatography-mass spectrometry after simultaneous derivatization and preconcentration.,” *Environ. Monit. Assess.*

[398] S. Topal, M. Şaylan, B. T. Zaman, and S. Bakırdere, “Determination of trace cadmium in saliva samples using spray assisted droplet formation-liquid phase microextraction prior to the measurement by slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrophotometry,” *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 68, p. 126859, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126859.

[399] S. A. Gegenschatz, F. A. Chiappini, C. M. Teglia, A. Muñoz de la Peña, and H. C. Goicoechea, “Binding the gap between experiments, statistics, and method comparison: A tutorial for computing limits of detection and quantification in univariate calibration for complex samples,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1209, p. 339342, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339342.

[400] A. Shrivastava, “Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods,” *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, pp. 21–25, Jun. 2011, doi: 10.4103/2229-5186.79345.

[401] A. K. El-Deen and K. Shimizu, “Deep eutectic solvent as a novel disperser in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet (DLLME-SFOD) for preconcentration of steroids in water samples: Assessment of the method deleterious impact on the e,” *Microchem. J.*, vol. 149, p. 103988, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103988.

[402] C. Jia, X. Zhu, L. Chen, M. He, P. Yu, and E. Zhao, “Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification–mixroextraction,” *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 244–250, Feb. 2010, doi: https://doi.org/10.1002/jssc.200900581.

[403] B. Peng *et al.*, “A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid–liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food

samples," *Microchem. J.*, vol. 149, p. 104072, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104072.

[404] M. Sajid, "Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 152, p. 116636, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116636.

[405] P. H. C. Lima *et al.*, "Factorial design optimization of dispersive liquid–liquid microextraction for analysis of metals in natural and drinking waters," *Microchem. J.*, vol. 183, p. 108029, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108029.

[406] H. Sereshti, P. Khorram, and N. Nouri, "Recent trends in replacement of disperser solvent in dispersive liquid-liquid microextraction methods," *Sep. Purif. Rev.*, vol. 48, no. 2, pp. 159–178, Apr. 2019, doi: 10.1080/15422119.2018.1460851.

[407] M. Soylak and F. Uzcan, "A novel ultrasonication-assisted deep eutectic solvent microextraction procedure for tartrazine at trace levels from environmental samples," *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 17, no. 2, pp. 461–467, 2020, doi: 10.1007/s13738-019-01781-5.

[408] C.-A. Yang, H.-C. Liu, D.-L. Lin, R. H. Liu, Y.-Z. Hsieh, and S.-P. Wu, "Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and their Metabolites in Urine by SPE and LC–MS-MS," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 41, no. 8, pp. 679–687, Oct. 2017, doi: 10.1093/jat/bkx057.

[409] M. Forouzesh, A. Shekari, and R. Valipour, "Qualitative and quantitative analyses of methamphetamine in hair following derivatization with trifluoroacetic acid or heptafluorobutyric acid anhydride," *Cogent Chem.*, vol. 4, no. 1, p. 1453594, Jan. 2018, doi: 10.1080/23312009.2018.1453594.

[410] A. Li *et al.*, "Rapid and simultaneous determination of multiple endocrine-disrupting chemicals and their metabolites in human serum and urine samples," *Talanta*, vol. 248, p. 123639, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123639.

[411] H. Jiang, Y. Qin, and B. Hu, "Dispersive liquid phase microextraction (DLPME) combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for determination of trace Co and Ni in environmental water and rice samples," *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1160–1165, 2008, doi: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.022.

[412] G. A. Zachariadis and E. Rosenberg, "Speciation of organotin compounds in urine by GC–MIP-AED and GC–MS after ethylation and liquid–liquid extraction," *J. Chromatogr. B*, vol. 877, no. 11, pp. 1140–1144, 2009, doi: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.065.

[413] E. Öztürk Er, S. Erarpat, S. Bodur, Ö. T. Günkara, B. Özbek, and S. Bakırdere, "Accurate determination of amino acids by quadruple isotope dilution-reverse phase liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry after derivatization with 2-Naphthoyl chloride," *J. Chromatogr. A*, vol. 1667, p. 462870, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462870.

[414] A. Escrig-Doménech, E. F. Simó-Alfonso, J. M. Herrero-Martínez, and G. Ramis-Ramos, "Derivatization of hydroxyl functional groups for liquid

chromatography and capillary electroseparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1296, pp. 140–156, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.027.

[415] V. Mani, R. Devasenathipathy, S.-M. Chen, T.-Y. Wu, and K. Kohilarani, "High-performance electrochemical amperometric sensors for the sensitive determination of phenyl urea herbicides diuron and fenuron," *Ionics (Kiel).*, vol. 21, no. 9, pp. 2675–2683, 2015, doi: 10.1007/s11581-015-1459-2.

[416] C. Bosch Ojeda and F. Sánchez Rojas, "Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction (VALLME): Applications," *Chromatographia*, vol. 77, no. 11, pp. 745–754, 2014, doi: 10.1007/s10337-014-2669-x.

[417] O. Brahmia, A. Boulkamh, T. Sehili, J.-P. Aguer, and C. Richard, "Kinetics of photocatalytic decomposition of Fenuron over TiO2 in aqueous solution," *Int. J. Photoenergy*, vol. 4, Jan. 2002, doi: 10.1155/S1110662X02000132.

[418] P. A. Diaw *et al.*, "Combination of photoinduced fluorescence and GC–MS for elucidating the photodegradation mechanisms of diflubenzuron and fenuron pesticides," *Luminescence*, vol. 34, no. 5, pp. 465–471, Aug. 2019, doi: https://doi.org/10.1002/bio.3612.

[419] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, and J. Hernández-Méndez, "Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection," *Anal. Chim. Acta*, vol. 517, no. 1, pp. 71–79, 2004, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.007.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. S. Oflu, S. Erarpat, B. T. Zaman, Ö. T. Günkara, S. Bakırdere, and F. Turak, "Combination of quadrupole isotope dilution mass spectrometry with simultaneous derivatization and spray assisted droplet formation-liquid phase microextraction for the determination of methamphetamine in human urine and serum samples by gas chromatography," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 119, p. 107207, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.vascn.2022.107207

Konferans Bildirileri

Sözlü Sunum

1. S. Oflu, S. Erarpat, B. T. Zaman, Ö. T. Günkara, S. Bakırdere, F. Turak, Combination of Quadrupole Isotope Dilution Mass Spectrometry with Simultaneous Derivatization and Spray Assisted Droplet Formation-Liquid Phase Microextraction for the Determination of Methamphetamine in Human Urine and Serum Samples by Gas Chromatography, 4th International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry (4th ICABC 2022), 23-26 Mart 2022, Türkiye (Online).

Poster Sunum

1. S. Oflu, S. Erarpat, B. T. Zaman, K. Eroğlu, Ö. T. Günkara, S. Bakırdere, F. Turak, Eser Seviyelerde Fenuronun Eşzamanlı Türevlendirme ve Önderiştirme Sonrası Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi ile Atık Su Örneklerinde Tayini, 10. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 7-11 Eylül 2022, Muğla,Türkiye.

Projeler

1. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), Fenuron Bileşiğinin İzotopik Türevinin Sentezlenmesi ve Dörtlü İzotop Seyreltme Yöntemi Kullanılarak Atıksu Örneklerinde Yüksek Doğruluk ve Duyarlılıkla Tayini, Yürütücü: Doç. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA, Proje No: FBA-2021-4507, Proje Türü: Genel Araştırma Projesi, 12/08/2021- 12/08/2022, Araştırmacı.