



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BAZI PESTİSİTLERİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ **YÖNTEMİ İLE EŞ ZAMANLI ANALİZİ**

Weldejeworgis Hndeya GEBREHİWOT

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI PESTİSİTLERİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE EŞ ZAMANLI ANALİZİ

Weldejeworgis Hndeya GEBREHİWOT

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

ANKARA

2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı pestisitlerin sıvı kromatografisi yönetmi ile eş zamanlı analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Weldejeworgis Hndeya GEBREHİWOT

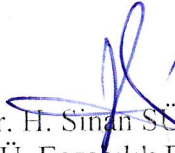
Tarih:

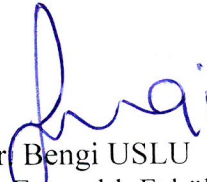
İmza:

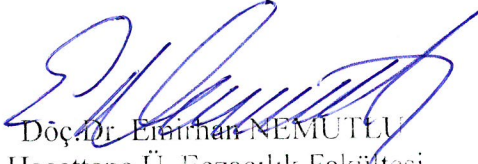
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Weldejeworgis Hndeya GEBREHIWOT tarafından hazırlanan
“*Bazı Pestisitlerin Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Eş Zamanlı Analizi..*” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

24.06.2019


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


Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Danışman


Doç. Dr. Eminhan NEMUTLU
Hacettepe Ü. Eczacılık Fakültesi
Üye

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitlerin Tanımı	1
1.2. Pestisitlerin Tarihçesi	3
1.3. Pestisitlerin fiziko-kimyasal özellikleri	4
1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması	5
1.4.1. Etkiledikleri canlı türlerine ve kullanım alanlarına göre sınıflandırma	5
1.4.2. Etki şekillerine göre pestisitlerin sınıflandırılması	7
1.4.3. Kimyasal yapılarına göre pestisitlerin sınıflandırması	7
1.4.3.1 Organofosfatlar	7
1.4.3.2. Karbomatlar	8
1.4.3.3. Organoklorinler	8
1.4.3.4 Piretrum; sentetik piretroitler	8
1.5. Pestisitlerin Çevreye Etkisi	9
1.6. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisit Etken Maddelerine Ait Bilgiler	10
1.6.1. Buprofezin	10
1.6.2. Klorotalonil	11
1.6.3. Dinobuton	12
1.7. Literatür incelemesi	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Gereç	18
2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisitler	18
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	18
2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar	19
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.5. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	20
2.1.6. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanış	20
2.1.6.1. İdrar Numunelerinin Hazırlanması	20
2.1.6.2. Toprak Numunelerinin Hazırlanması	21
2.1.6.3. Domates Numunelerinin Hazırlanması	21
2.1.6.4. Su Numunelerinin Hazırlanması	22
2.1.6.5. İlaç Numunelerinin Hazırlanması	22
2.1.6.6. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı	22
2.2. Yöntem	23
2.2.1. Kromatografi ve Kromatografinin Tarihçesi	23

2.2.2. Kromatografi tekniklerinin sınıflandırılması	24
2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	25
2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi	26
2.2.2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi	27
2.2.2.4. Normal Faz Sıvı Kromatografisi	27
2.2.3. Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	28
2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri	29
2.2.3.2. Pompalama Sistemleri	30
2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	31
2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları	31
2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar	31
2.2.3.4.2. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	32
2.2.3.5. Dedektörler	33
2.2.3.5.1. Foto Diyot Dizi Dedektör (FDD)	34
2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	35
2.2.4.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri	38
2.2.4.2. Validasyonun Genel İşlemleri	39
2.2.4.2.1. Seçicilik	40
2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık	41
2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)	42
2.2.4.2.4. Kesinlik	43
2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)	44
2.2.4.2.6. Sağlamlık	46
2.2.4.2.7. Tutarlılık	46
2.2.4.2.8. Stabilitate	46
3.BULGULAR	48
3.1.BUP, DİN ve KLO Pestisitleri İçin Geliştirilen YBSK-FDD Yöntemine Ait Analiz Bulguları	48
3.1.1.Yönteminin Optimizasyon	48
3.1.1.1.Mobil Fazda Organik Çözücü ve Tampon Çözeltinin Yüzdelerin Belirlenmesi	48
3.1.1.2.Tampon Çözelti Molaritesinin Belirlenmesi	52
3.1.1.3.Uygun Kolon (Sabit Fazın) Seçimi	55
3.1.1.4. Farklı Tampon Çözeltilerin Analizleri	57
3.1.1.5. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	58
3.1.1.6.Akış Hızı Optimizasyonu	60
3.1.1.7.Tampon Çözeltinin pH'sını Belirleme Çalışmaları	63
3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları	66
3.1.3. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	66
3.1.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar	70
3.1.4.1. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	80
4.TARTIŞMA	88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
ÖZET	94
SUMMARY	95
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	102

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım kapsamında Pestisit olarak kullanılan Klorotalonil, Dinobuton ve Buprofezin etken maddelerinin YBSK yöntemiyle analizi ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Klorotalonil, Dinobuton ve Buprofezin'in eş zamanlı analizi için en uygun hareketli faz bileşimi belirlenmiş, farklı kolonlar, kolon sıcaklıkları, akış hızı, pH ve tampon çözelti türleri denenerek yöntem için en uygun şartlar seçilmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı, seçici bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem için yöntem geçerlilik testleri ve validasyon çalışmaları da yapılmış, bu maddelerin idrar, toprak, domates, su ve ilaç örneklerinde eş zamanlı analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Yüksek lisans eğitimime başladığımdan beri her daim yanımda olan, sabrı ve ilgisini hiç eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, değerli danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU' ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan, manevi desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr.Sinan SÜZEN'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana hep yardımcı olan, her koşulda değerli zamanını bana ayıran, bir abi gibi manevi desteğini hiç eksik etmeyen Uzm. Kim. Müh. Cem ERKMEN'e ve desteklerini hiç eksik etmeyen Dr. Sevinç KURBANOĞLU'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgilerini hep hissettiğim, her kararında bana destek ve yardımcı olan, bana her zaman inanan ve güvenen eşim Abeba Araya GEBRU'ya hep yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik Faktörü
ACN	Asetonitril
BUP	Buprofezin
KLO	Klorotalonil
BIAS	Bağıl Hatası
DİN	Dinobuton
BSS	Bağıl Standart Sapma
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDD	Foto Diyot Dizi Dedektörü
k	Kapasite Faktörü
SK	Sıvı Kromatografisi
m	Eğim
MS	Kütle Spektrometri
n	Kesişim
N	Etkin Tabaka Sayısı
R	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayırma Gücü
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
t	Kuyruklanma Faktörü
LOQ	Tayin Alt Sınırı

LOD	Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı
t_R	Alıkonma zamanı
YBSK	Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi
WHO	World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü
GK-ECD	Gaz kromatografisi- Elektron yakalama dedektörü
MRL	Maksimum kalıntı limiti



ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Zararlılara karşı mücadelede kullanılan pestisitlerin kullanılma yüzdeler 6
- Şekil 1.2.** Pestisitlerin çevrede dolaşımı 10
- Şekil 2.1.** Kromatografik ayırımın şematik gösterimi 23
- Şekil 2.2.** YBSK cihazının şematik gösterimi 29
- Şekil 2.3.** YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram 36
- Şekil 3.1.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon - 10mM Amonyum asetat (60/40; h/h) (A), (70/30; h/h) (B), (75/25; h/h) (C), (80/20; h/h) (D), (85/15; h/h) (E), (90/10;h/h) (F) ve (95/5; h/h) (G) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 49
- Şekil 3.2.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 5 mM (A), 10 mM (B), 20 mM (C), 40 mM (D), Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 53
- Şekil 3.3.** Super Cosil LC 18 (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon (A), X-Bridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon (B), Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon (C), 25°C, akış hızı 1mL dk⁻¹, pH:6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz, : ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 56
- Şekil 3.4.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (A), 10 mM sodyom asetat (B) (70/30;h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 58
- Şekil 3.5.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 25°C (A), 35°C (B), 45°C (C) 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 59
- Şekil 3.6.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 1 mL dk⁻¹ (A), 1.25 mL dk⁻¹ (B), 1.5 mL dk⁻¹ (C), 2 mL dk⁻¹(D) akış hızı, pH:6.54, 254 nm dalga

boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h)	
ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar	61
Şekil 3.7. Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 1 mL dk ⁻¹ akış hızı, pH:	
6.54 (A), pH: 5.5 (B), pH: 4.5 (C), pH: 3.5 (D), 254 nm dalga boyu,	
hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile	
yapılan çalışmalara ait kromatogramlar	64
Şekil 3.8. KLO için kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 3.9. DİN için kalibrasyon eğrisi	67
Şekil 3.10. BUP için kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 3.11. Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla KLO, DİN ve BUP için 1	
(a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 20 (e), 40 (f), 50 (g), 75 (h), 100 (i), 125 (j), 150	
(k), 175 (l), 200 (m) µg mL ⁻¹	68
Şekil 3.12. Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla KLO, DİN ve BUP için 1	
(a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 20 (e) µg mL ⁻¹	69
Şekil 3.13. Bozundurma koşulları: % 0,3' lük H ₂ O ₂ (A), ve % 3' lük H ₂ O ₂ (B) ile	
oksidasyon çalışmaları Standart maddenin (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat	
(d), 12 saat (e), 24 saat (f) analizlerine ait kromatogramlar	71
Şekil 3.14. Bozundurma koşulları: 0,1 N HCl (A), 1 N HCl (B) ve 1 N HCl (C) ile	
asit hidrolizi, referans kromatogram (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat (d), 12	
saat (e), 24 saat (f) analizlerine ait kromatogramlar	72
Şekil 3.15. Bozundurma koşulları: 0,1 N NaOH (A) ve 1 N NaOH (B) baz hidrolizi,	
referans kromatogram (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat (d), 12 saat (e), 24	
saat (f) analizlerine ait kromatogramlar	73
Şekil 3.16. Bozundurma koşulları: referans kromatogram (a), 6 saat UV ışık altında	
bekletme (b), 9 saat UV ışık altında bekletme (c), analizlerine ait	
kromatogramlar	74
Şekil 3.17. Bozundurma koşulları: Referans kromatogram (a), 1 saat sıcak su	
banyosunda bekletme (b), 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (c)	
analizlerine ait kromatogramlar.	74
Şekil 3.18. Bozundurma koşulları: Referans kromatogram (a), 1 saat etüvde bekletme	
(b), 3 saat etüvde bekletme (c), 6 saat etüvde bekletme (d), analizlerine ait	

kromatogramlar. asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ 75

Şekil 3.19. Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I) 76

Şekil 3.20. Optimize edilen koşullarda idrar numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), idrar numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), idrar numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), idrar numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar 81

Şekil 3.21. Optimize edilen koşullarda domates numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), domates numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), domates numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), domates numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar 82

Şekil 3.22. Optimize edilen koşullarda toprak numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), toprak numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), toprak numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), toprak numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait Kromatogramlar 83

Şekil 3.23. Optimize edilen koşullarda çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar 84

Şekil 3.24. Optimize edilen koşullarda atık su numunesi üzerine eklenen $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), atık su numunesi üzerine eklenen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), atık su numunesi üzerine eklenen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), atık su numunesi üzerine eklenen $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait

Kromatogramlar

85

Şekil 3.25. Optimize edilen koşullarda içme suyu numunesi üzerine eklenen $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), içme suyu numunesi üzerine eklenen $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), içme suyu numunesi üzerine eklenen $83 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), içme suyu numunesi üzerine eklenen $115 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

86

Şekil 3.26. Optimize edilen koşullarda zirai ilaç numunesi ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (mavi) üzerine eklenen $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde (sarı) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar ilavesi (pembe), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi

87

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kullanıldıkları zararlılara göre pestisitler	6
Çizelge 1.2. Buprofezin' in özellikleri	11
Çizelge 1.3. Klorotalonil' in özellikleri	12
Çizelge 1.4. Dinobuton' in özellikleri	12
Çizelge.1.5. Farklı örneklerde pestisit kalıntı analizi	14
Çizelge 2.1. Kullanılan pestisitler	18
Çizelge 2.2. Çalışmalarda kullanılan kolonların özellikleri	19
Çizelge 2.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	19
Çizelge 2.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	24
Çizelge 2.5. Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması	28
Çizelge 2.6. SUT parametreleri	37
Çizelge 2.7. Validasyon parametreleri	39
Çizelge 3.1. Sistem uygunluk testlerine göre hareketli faz bileşiminin Karşılaştırılması	52
Çizelge 3.2. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti molaritesinin karşılaştırılması	54
Çizelge 3.3. Sistem uygunluk testlerine göre kolonların karşılaştırılması	57
Çizelge 3.4. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti türlerinin karşılaştırılması	58
Çizelge 3.5. Sistem uygunluk testlerine göre kolon sıcaklıklarının karşılaştırılması	60
Çizelge 3.6. Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması	62
Çizelge 3.7. Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması	65
Çizelge 3.8. Optimize edilen koşullar	66
Çizelge 3.9. SUT parametreleri	66
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri	69
Çizelge 3.11.İdrar numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	81
Çizelge 3.12.Domatos numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	82
Çizelge 3.13. Toprak numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	83
Çizelge 3.14. Çeşme suyu numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	84
Çizelge 3.15. Atık su numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	85

Çizelge 3.16. Atık su numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	86
Çizelge 3.17. Zirai ilaç numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	87
Çizelge 3.18. Farklı örneklerde tayin edilmiş olan pestisit kalıntı analizi	91



1. GİRİŞ

1.1. Pestisitlerin Tanımı

"Pestisit" kelimesi çok büyük ve çeşitli kimyasallar veya ürünleri grubunu tanımlar. "Pest" kelimesinin evrensel bir biyolojik anlamı yoktur. "Pest" terimi, ürünlere, insanlara ve hayvanlara (böcekler, sıçanlar, istenmeyen bitkiler, bakteriler ve virüsler gibi çeşitli mikroorganizmalar) zarar veren organizmaları belirtir. Ayrıca, insanlar ile gıda ve diğer temel ihtiyaçlar için başarılı bir şekilde rekabet eden canlılar olarak da ifade edilebilir. Pestisitler, zararlı böceklerin ve bitkilerin etkilerini önlemek, ortadan kaldırmak veya azaltmak için kullanılan maddeler olarak tanımlanır ve genellikle, potansiyel çevresel etkileri yerine tarımsal etkinlikleri veya maliyetlerine göre seçilirler (Uslu ve ark., 2010).

Amerika Çevre Koruma Dairesi (U.S. Environmental Protection Agency, EPA)'nin tanımına göre; tarım ürünlerine zarar vererek tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen kemiriciler, haşereleler, yabancı otlar ve mantarlar gibi zararlılara karşı kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanların (virüs, bakteri, anti-mikrobiyal madde veya dezenfektan gibi) tümüne pestisit denir (Klaassen, 2001;Atabey, 2016).

Gündüz (1994)'ün tanımına göre; pest kelimesi doğal zararlılar için kullanılırken, pestlerle mücadele etmek için kullanılan maddelere de pestisit denilmektedir. Ayrıca, tarım ürünlerinin veya hayvansal gıdaların, üretim işlemleri, hasat, depolama veya taşıma işlemleri sırasında ürünlere zarar verebilen herhangi bir zararlıyı kontrol etmek ya da bu zararlıların zararlarını önlemek amacıyla uygulanan madde veya maddelerin karışımı da pestisitler olarak adlandırılmaktadır (Dökmeci, 1988; Toptancı, 2013).

Pestisitler sorun yaratan böcekleri, hayvanları, mikroorganizmaları, yabancı otları ve diğer zararlıları öldüren ya da davranışlarını değiştiren, biyolojik olarak aktif kimyasallardır. Bitki koruma ilacı Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) tarafından, istenmeyen zararlı veya canlıları

kontrol etmek veya bu zararlıların etkisini önlemek için kullanılan madde veya maddelerin karışımı olarak tanımlamaktadır (Şişli, 1994; Toptancı, 2013).

Son birkaç yılda küresel tarımsal üretimdeki artışın büyük kısmı, yüksek girdili tarım sistemlerinin benimsenmesiyle ortaya çıkmıştır. Pestisitler, yüksek girdili çiftçiliğin en önemli bileşenlerinden biridir. Şimdi insanlar, pestisitlerin mahsullere ne kadar zarar verdiğini, mahsullerde hasara neden olduğunu ve hastalıkları hem insanlara hem de evcil hayvanlara bulaşma ihtimalini arttırdığını fark etmiştir. Pestisitler'in uygulamaları tüm dünyada mahsul üretiminin neredeyse üçte birini güvence altına almıştır. Pestisitler, giderek artan bir insan nüfusunun taleplerini güvence altına almak için gıda üretiminin gelişmesine yol açmıştır (Samsidar ve Shaarani, 2018).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü kaynaklarına göre, yaklaşık 800 milyon insan kıtlık altındadır. Her gün yaklaşık 250,000 bebek doğmakta ve bu değer, dünya nüfusunun yaklaşık 80-100 milyona yükseldiği anlamına gelir. 2000 yılında, dünya nüfusu 6 milyar iken ve 2020 yılına kadar 8,5 milyar seviyeye ulaşması beklenmektedir. Bu durumda kıtlığı azaltmak için dünya nüfusu, farklı organik ve mineral gübreler ve pestisitleri kullanarak farklı çeşitlerin tarımsal verimlerinin artırılması için çalışması gerekmektedir. Günümüzde, zararlı böcekleri kontrol altına almak ve tarımsal üretimi artırmak için kullanılan kimyasal madde sayısı, özellikle pestisitler artmaktadır. Ancak, bunun dışında, çevredeki pestisit kalıntıları nedeniyle, canlı sistemler farklı hastalıklara maruz kalmaktadır ve bu durum halk sağlığına ve genel olarak çevreye olan etkilerinin tahmin, karakterizasyonu ve değerlendirilmesi sorununa yol açmaktadır (Brancato ve ark., 2018; FAO, 2017).

Pestisitlerin ve metabolitlerinin sürekli izlenmesi çok önemlidir. Pestisitler için maksimum kalıntı limit (MRL) değerleri, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütleri tarafından belirlenmiştir. Bugün'e kadar metabolitlerinin kalıntı tanımına dahil edilmediği bir grup pestisit bulunmaktadır ve bu tür pestisitlere iyi bir örnek glifosat ve onun metabolitleridir. MRL değerlerine göre ayarlanan yiyecek veya yemlerdeki veya içindeki pestisit kalıntısı için konsantrasyonun üst yasal seviyesi anlamına gelir. 396/2005, iyi tarım uygulamaları

ve hassas tüketicileri korumak için gerekli olan en düşük tüketiciye maruz kalma oranına dayanmaktadır. Son yıllarda, bazı MRL değerleri, halk sağlığının korunmasına yönelik talebin artması için ppm'den sub- ppm'ye düşürülmüştür (Chang ve ark., 2016; López ve ark., 2019). Mahsuller pestisit ile muamele edildiğinde hasat veya depolamadan sonra mahsulün içinde veya üzerinde çok küçük miktarlar kalabilir. Genel olarak, mahsullerin seviyeleri çok düşüktür veya birçok durumda, sofistike analitik metodoloji ile bile tespit edilememektedir. Gıda maddelerinde bulunan herhangi bir pestisit kalıntısını belirlemek için, çok küçük bir pestisit miktarının dahi doğru bir şekilde ölçebilen analitik yöntemler gereklidir (Chang ve ark., 2016).

Pestisit maruziyetinin değerlendirilmesinde kullanılan ana teknikler, maruziyet tarihi, uzmanların değerlendirilmesi ve biyolojik ve çevresel izlemedir. Kalıntı tayininde kullanılan yöntemler biyolojik, spektrofotometrik, kromatografik, elektrokimyasal ve radyokimyasal olmak üzere beş gruba ayrılabilir. Radyokimyasal yöntemler son derece sınırlıdır. Yüksek seçicilik ve duyarlılık nedeniyle, YBSK ve GK yöntemleri, pestisitleri saptama için en çok kullanılan yöntemlerdir, ancak pestisit analizinde kullanılan YBSK tekniğine göre, gaz kromatografisi, yüksek sıcaklık kullandığından yaygın olarak kullanılır ve pestisitler gibi organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizi etmek için kullanılır. Pestisitlerin tarımdaki etkinlikleri iyi bilinmektedir, düşük maliyetlerinin sıkça kullanılmasına katkıda bulunduğu ve YBSK'nın farklı numunelerdeki kalıntılarının analizi için yaygın olduğu bilinmektedir (Boulanouar ve ark., 2018; López ve ark., 2019).

1.2. Pestisitlerin Tarihçesi

Pestisitlerin kullanımları çok eski tarihlere kadar dayanmaktadır. Eşek arıları, bit ve pirelere karşı insektisitlerin kullanımına dair bulgular M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bulunmuştur. Farklı zararlılarla mücadele için inorganik pestisitlerin kullanılması ise 19. Yüzyıl'a dayanmaktadır. 1940'lardan sonra ise pestisit üretimine organik kimya alanındaki gelişmeler fayda sağlamıştır. Bu sayede DDT ve bilinen

bazı insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Pestisitlerin arasında en çok kullanılanları herbisitler, insektisitler, fungusitler ve yağlardır (Akdoğan, 2008; Toptancı, 2013).

1.3. Pestisitlerin fiziko-kimyasal özellikleri

Aday bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri yeni pestisitlerin tasarımında önemli roller oynamaktadır. Pestisitler zararlılar tarafından absorbe edilmeli, hedef bölgeye taşınmalı ve daha sonra proteinlerle etkileşime girmelidir. Çevresel açıdan önemli olan yarı uçucu organik bileşiklerin çoğu, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden ötürü uzun mesafeli atmosferik taşınımına maruz kalır. Buhar basıncı, çözünürlükleri ve dolaylı olarak Henry'nin hukuk sabitleri, bu bileşiklerin taşınması sırasında kaderlerini tanımlayan en önemli parametrelerdir. Henry yasası sabiti, pestisitlerin doğal ortamda hava-su değişiminin tahmini için dolaylı bir yolunu göstermektedir (Akamatsu, 2011).

Pestisitler farklı ortamlarda farklı davranışlar gösterebilirler ve bozunmaları üç şekilde olabilir;

- Biyolojik Bozunma: Mikroorganizmalar Tarafından dağılımları
- Kimyasal Bozunma: Hidroliz ettik redoks gibi kimyasal reaksiyonlar Sonucu dağılımları
- Fotokimyasal Bozunma: UV veya Görünür Alanda dağılımları

Bazı pestisitler bozunmaya karşı dirençlidir ve çevrede uzun süre varlığını sürdürebilir.

Pestisit, ne kadar hareketli ve kalıcı bir molekül ise, sızdırma ve sızdırma potansiyeli ne kadar yüksekse, sonuç olarak yüzey, yeraltı suyu ve yeraltı suyunu kirletme potansiyeli o kadar artar. Bu tip bir molekülün, biyolojik olarak birikmesi ve yavaşça bozunması halinde, molekül çevresel olarak daha agresif hale gelir. Zira kimyasalların uygun bir şekilde kullanılmasının sadece moleküler özelliklerinin anlaşılmasına değil, aynı zamanda güvenli uygulamalarına da bağlı olduğuna dikkat edilmelidir. Bu kavramlar, bu ürünlerin kırsal alanlarda başarılı bir şekilde tanıtılması ve sürdürülebilir kullanımı için çok önemlidir (Interações ve ark., 2016).

1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler; farklı özelliklerine göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulurlar.

1.4.1. Etkiledikleri canlı türlerine ve kullanım alanlarına göre sınıflandırma

İnsektisitler: Bu gruptaki pestisitler böceklerle karşı kullanılırlar. Ovisid ve larvisidler içerenler böceklerin yumurta ve larvalarının zararlı etkilerine karşı kullanılırlar. Bu pestisitler tıp, ziraat, ev içi ve endüstri alanlarında genel olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bu pestisitlerin 20. yüzyılda tarımsal verimlilikteki artışın en önemli faktörlerden biri olduğuna inanılmaktadır.

Fungusitler: Mantar veya mantar sporlarının kontrol altına alınması veya öldürülmesi için kullanılan kimyasal maddelere verilen genel isimdir. Mantarlar mahsullerin verimini ciddi miktarda etkiledikleri için tarımda verim kaybını engellemek nedeniyle sıkça kullanılırlar. Ayrıca hayvancılık alanında mantara bağlı enfeksiyonların önlenmesi veya tedavi edilmesi amacıyla da kullanılırlar.

Herbisitler: Bu pestisitler yabancı otlarla mücadele için kullanılan zirai ilaçtır. Yabancı otların normal gelişimini önlemek veya öldürmek için kullanılan kimyasal maddelerin tümüne herbisit denir.

Akarisitler: Akarisit, adından da anlaşılacağı gibi akarları kontrol etmek için kullanılan kimyasal ilaçlara verilen genel bir isimdir. Tarım alanında daha çok kullanılmalarına rağmen evlerdeki halı veya koltuk gibi yerlerde, akarları ve yumurtalarını öldürmek için de kullanılırlar. Zirai ilaç piyasasında farklı etken maddeleri içeren ve farklı ticari isimlerle satılmakta olan akarisitler bulunmaktadır (Yadav ve Devi, 2017).

Bakterisitler: Bakterilerin öldürülmesinde kullanılan zirai ilaçlardır.

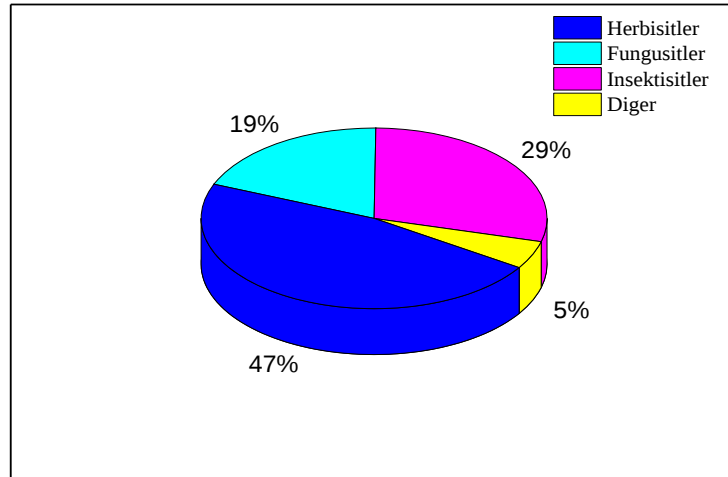
Molluskisitler: Bu pestisitler salyangoz veya sümüklü böcekler gibi yumuşakçalarla mücadele için kullanılırlar. Metaldehit aktif maddesini içerirler. Ayrıca, sıcakkanlılara karşı zehirli etkileri düşüktür.

Rodentisitler: Kemirgenler ile mücadele etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Ev, depo veya ambarlarda daha çok kullanılırlar. Bu gruptaki pestisitler talyum sülfat, sitrikinin, çinko fosfat ve pindon gibi çeşitli maddelerle karıştırıldıktan sonra yem haline getirilerek kullanılır. Ayrıca metilbromür ve karbon tetraklorür gibi bazı maddeler de gaz hallerinde rodentisit olarak kullanılmaktadır. Doğrudan kullanılan antikoagulant özellikleri bulunan rodentisitler de bulunmaktadır.

Nematisitler: Nematisit etkili pestisitlerin birçoğu fungusit ve insektisit etkiye de sahiptir. Nematisitler birer toprak fumigantlarıdır. Fitotoksik etkileri nedeniyle ancak bitkiler yokken uygulanabilirler. Metam-sodyum, dazomet, dikloropropen ve etoproföz iyi bilinen ve nematisit özellikleri olan kimyasal maddelerdir (Yadav ve Devi, 2017; Tiryaki ve ark., 2010).

Çizelge 1.1. Kullanıldıkları zararlılara göre pestisitler sınıflandırılması (Tiryaki ve ark., 2010)

İnsektisitler	Böcekler
Fungusitler	Funguslar
Herbisitler	Yabancı otlar
Akarasitler	Akarlar
Bakterisitler	Bakteriler
Molluskisitler	Yumuşakcılar
Rodentisitler	Kemirgenler
Nematisitler	Nematodlar



Şekil 1.1. Zararlılara karşı mücadelede kullanılan pestisitlerin kullanılma yüzdeleri (Sciences & Bo, 2018).

1.4.2. Etki şekillerine göre pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler etki mekanizmalarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Waksmundzka ve ark., 2010; Atabey, 2016).

- Asetilkolinesteraz (kolinesteraz) inhibitörleri
- Kitin sentezi inhibitörleri
- Ekdizon agonisti
- GABA bloklayıcı (amino bütirik asit inhibitörü)
- Jüvenil hormon analogu (böcek büyüme regülatörleri)
- Antikoagülant
- Glutamin sentetaz inhibitörü
- Steroit demetilasyon (ergosterol biyosentezi) inhibitörü
- Protoporfirinojen oksidaz inhibitörü
- RNA-polimeraz inhibitörü
- Tiyoal reaktantı
- Protein sentezi inhibitörü
- Fotosentetik elektron taşıma inhibitörü
- Mitokondriyal solunum inhibitörü

1.4.3. Kimyasal yapılarına göre pestisitlerin sınıflandırması

1.4.3.1. Organofosfatlar

Organofosfatlar organik fosforlu (OP) bileşikler için kullanılan bir terimdir. Bu pestisitlerin çoğu insektisit olarak kullanılmaktadır. Az bir kısmı ise nematosit, fungusit ve bitki düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Yapılarındaki fosfor atomuna çifte bağ ile bağlanmış oksijen varsa ‘fosfatlar’, sülfür var ise ‘tiyofosfat’ diye adlandırılırlar. Klorpirifos, diazinon ve malation en çok bilinen OP’lerdir (S.V. Kumar ve ark., 2010; Waksmundzka ve ark., 2010).

1.4.3.2. Karbomatlar

İnsektisit veya nematosit olarak kullanılan karbamat esterlerinin R ve R₁ 'lerinde alkil veya aril grupları bulunmaktadır. R ve R₁ 'lerinde aromatik veya alifatik grup taşıyan karbamat grubu pestisitler herbisit ve sürgün inhibitörü olarak kullanılır. En çok bilinen karbamatlar Aldikarb, karbaril ve karbofuran'dır (Smith, 1987; Waksmundzka ve ark., 2010).

1.4.3.3. Organoklorinler

Organoklorinler en eski sentetik insektisit grubudur. Klorlu etan türevleri, klorlu sikloheksan, klorlu siklodienler ve klorlu benzen bileşikleri organik klorlu (klorlu hidrokarbon) pestisitler grubunda yer alırlar. Kimyasal stabiliteleri ve yağda çözünürlükleri yüksektir. Uçuculukları az, biyotransformasyon ve yıkılmaları yavaştır. Bu yüzden zararlılara karşı oldukça etkili insektisitlerdir ve yarı ömürleri 3 – 5 yıl arasında değişmektedir. En çok bilinen organoklorinler DDT (Diklorodifeniltrikloretan), heptaklor, klordan ve toksafenindir. Ünlü Biyolog Rachel Carson “Silent Spring” adlı kitabında DDT'nin zararlarından bahsettikten sonra, Amerika başta olmak üzere birçok farklı ülkede DDT kullanımı yasaklanmıştır. 1985 yılında ise DDT, klordan ve heptaklor'un kullanımı Türkiye'de yasaklanmıştır (Waksmundzka ve ark., 2010 ; Atabey, 2016).

1.4.3.4. Piretrum; sentetik piretroidler

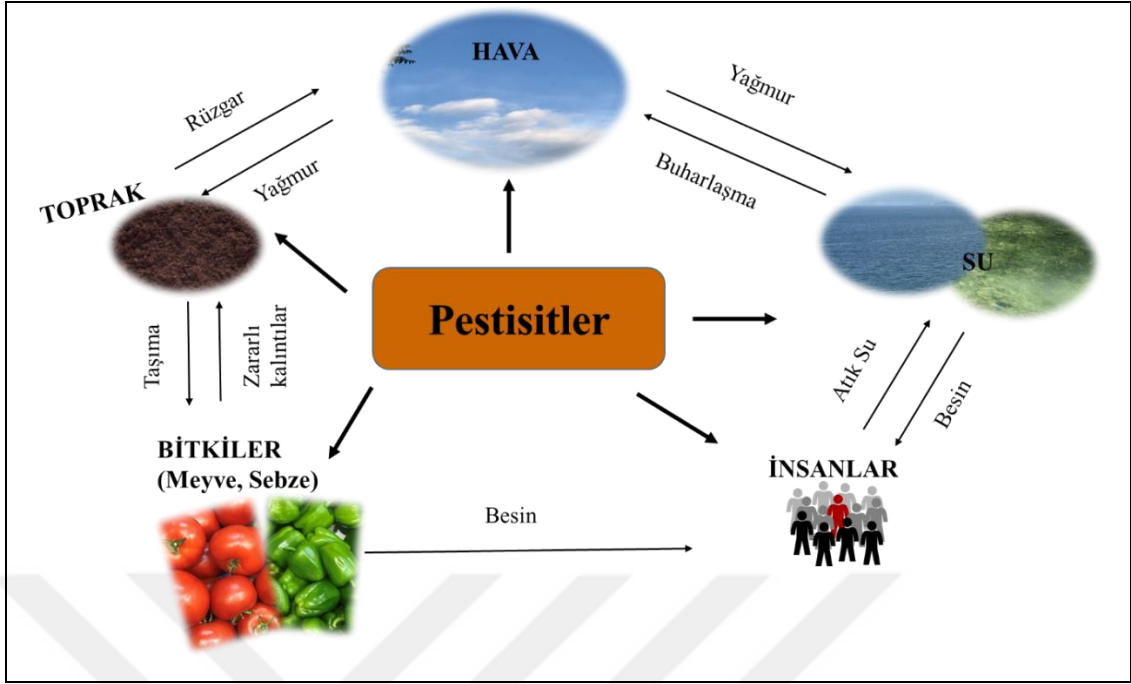
Piretrin'ler krizantem çiçeğinden elde edilen doğal insektisitlerdir. Su ve ışığın varlığında kolaylıkla parçalandıkları için dışarıda kullanımları sınırlıdır. Işığa çabuk bozunduklarından dolayı, ışığa dayanıklı sentetik türevleri olan piretroidler türetilmiştir. Sentetik piretroidler yapıca piretrinlere benzemektedirler. Piretrin yapılarına brom, klor ve siyanür grupları bağlanarak 1980 yılından itibaren ticari kullanımda olan bileşiklerdir. Piretroidlerin kullanımı memeliler için güvenli olmakla

birlikte böceklerde son derece toksiklerdir. Çevrede birikmemeleri ve çabuk parçalanmamaları nedeniyle güvenilir ve sıkça kullanılan insektisitlerdir. Ev böcekleri, tarım alanlarındaki zararlılar ve sivrisineklerle mücadelede koruyucu olarak kullanılırlar. Ayrıca insanlarda uyuz belirtilerinin tedavisinde de kullanılırlar. Piretrinler böceklerin sinir sistemlerine kolayca girer ve uçmalarını engelleyerek etki gösteren temas zehirleridir. Bazı böceklerin sahip oldukları enzimlerce hızlı detoksifiye edilebilirler. Letal dozu sağlamak ve enzimlerin etkisini geciktirmek için formülasyonlarına OP'lar, karbamatlar gibi maddeler eklenmektedir. Piretrinlerin sudaki çözünürlükleri düşüktür. Alkol, petrol eteri, kerozen ve karbon tetraklorür gibi organik çözücülerde çözünürlükleri ise yüksektir (Yadav ve Devi, 2017).

1.5. Pestisitlerin Çevreye Etkisi

Pestisit uygulamasının % 0,015- 6,0'sı hedef organizmaya ulaşmakta, % 94-99,9'luk kısım ise tarım ekosisteminde hedef olmayan organizmalara ve toprağa bulaşmakta ya da çevredeki doğal ekosistemlere sürüklenme ve akıntı gibi etkenlerle sulara karışmaktadır (Yıldız ve ark., 2005 ; Atabey, 2016).

Pestisitler uygulandıkları alanlardan meteorolojik etkenlerle sürüklenmekte ve ulaştıkları noktalarda çevre sorunlarına neden olabilmektedirler. Buharlaştıran pestisitler atmosferde kalıcı toksik madde birikimine neden olabilir. Bazı pestisitler fotokimyasal parçalanmaya uğramakta, toksik maddelere dönüşebilmektedir. Toprakta tutulan pestisitler toprağı kirliliğine yol açmakta ve toprak içinde kimyasal ve mikrobiyolojik degradasyona uğramaktadır. Yağmur, sel, kar suları gibi etkenlerle topraktan sürüklenen pestisitler, nehir, göl ve deniz sularını kirletebilmektedir. Bu nedenle pestisitler, doğal besin zincirinde yer alan bütün canlıların hayatını tehdit etme potansiyeline sahip kimyasallardır (Yazgan, 1997).



Şekil 1.2. Pestisitlerin çevrede dolaşımı (Fenik ve ark., 2015; Kirkland, 2008; Tiryaki, 2016 ; Atabey, 2016)

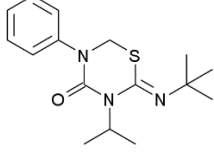
1.6. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisit Etken Maddelerine Ait Bilgiler

Tez kapsamında Klorotalonil (KLO), Dinobuton (DİN) ve Buprofezin (BUP) pestisitleri ile çalışılmıştır.

1.6.1. Buprofezin

BUP, Nihon-Nohyaku tarafından geliştirilen ve kitin sentezi inhibitörü görevi gören, tarım bitkilerinin, sebzelerin ve meyvelerin Homopteran zararlılarına karşı çok etkili bir tiyadiazin insektisittir. Etki mekanizması tam olarak bilinmese de, kitin birikimine müdahale eder ve ecdiz sırasında nymphal ölüme neden olur. Etli böcekleri, pirinç haşerelerini ve yeşil yapraklı tarım ürünlerinde sıkça kullanılır (Ali ve ark., 2019).

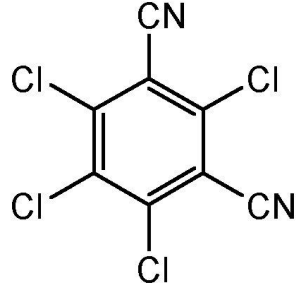
Çizelge 1.2. Buprofezin' in özellikleri

Pestisit tipi	Insektisit, Akarisit
Yapısı	
Kapalı Formülü	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS
Sistemik Adı	(Z)-2-tert-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-1,3,5-thiadiazinan-4-one
Molekül Ağırlığı	305,44 g mol ⁻¹
Erime Noktası	105,1 °C
Sudaki Çözünürlüğü	0,46 mg mL ⁻¹

1.6.2. Klorotalonil

Geniş bir spektrumlu fungusit olan KLO (2,4,5,6-tetrakloroizoftalonitril), sebze, tarla bitkileri ve süs bitkilerinin mantar hastalıklarının kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. KLO, Çin'de 28 ürün üzerinde kullanılmak üzere tescil edilmiştir ve mantar ilacı ailesinde en yaygın kullanılan pestisittir. Son yıllarda, KLO'nun dermatit, şiddetli göz ve kütikül tahrişi, mide-bağırsak problemleri, karaciğer hasarı, gelişimsel ve üreme toksisiteleri ve hatta kanserojen gibi birçok sağlık sorununa yol açtığı bildirilmiştir (Hao ve ark., 2019).

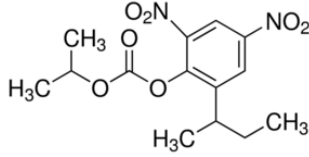
Çizelge 1.3. Klorotalonil’ in özellikleri

Pestisit tip	Fungisit
Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_8 Cl_4 N_2$
Sistemik Adı	(2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile)
Molekül Ağırlığı	265,90 g mol ⁻¹
Erime Noktası	250 °C
Sudaki Çözünürlüğü	10 mg/100 mL

1.6.3. Dinobuton

Kimyasal formülü $C_{14}H_{18}N_2O_7$ olan DİN, meyve ve sebzelerde kullanılan, dinitrofenol akarisit ve fungusittir. Kırmızı örümcek akarları yok etmek için elma, salatalık, patlıcan, şerbetçiotu, domates ve vişne gibi ürünler için kullanılmaktadır. Sentetik bir pestisittir ve etki mekanizması tam bilinmemektedir (Smith ve ark., 2008). İki izomeri mevcut olan bir kiral bir moleküldür (Kelessidis ve Stasinakis, 2012).

Çizelge 1.4. Dinobuton’ un özellikleri

Pestisit tip	Fungisit, Akarisit
Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{14}H_{18}N_2O_7$
Sistemik Adı	(2-butan-2-yl-4,6-dinitrophenyl) propan-2-yl carbonate
Molekül Ağırlığı	326,305g mol ⁻¹
Erime Noktası	61 °C
Sudaki Çözünürlüğü	0,1 mg/100 mL

1.7. Literatür incelemesi

Pestisit ürünlerinin test edilmesi önemlidir, çünkü ürünlerin spesifikasyonlarını karşıladığı yerler; etkili olmaları ve kullanımda beklenmeyen riskler oluşturmaları istenmez. Pestisitler kullanımı iyi değildir, kimyasal olmayan bir tarım politikası benimsemek daha iyidir. Farklı gıdaların tüketimi, özellikle pirinç ve diğer meyvelerin artmasıyla birlikte, pestisit kalıntılarının belirlenmesi, hasatın güvenliğini sağlamak için çok önemlidir. Bu nedenle, farklı tortulardaki, özellikle de idrar gibi biyolojik numunelerdeki bu kalıntıları belirlemek için güvenilir, sağlam ve seçici bir yöntem geliştirmek çok önemlidir (Lee ve Jang, 2010).

Bugüne kadar, meyve ve sebzelerde pestisit kalıntısının belirlenmesi için en iyi yöntem olan YBSK, farklı detektörlerle çok hassas ve kolay birleşimdir (Khan ve ark.,2012; Cappellini ve ark.,2012).

Biyolojik numunelerdeki, su numunelerindeki ve yiyeceklerdeki pestisit kalıntılarının belirlenmesinde, YBSK cihazının yaygın olarak kullanıldığı ve kullanımının son yıllarda arttığı görülmektedir. Özellikle, analiz sırasında bazı pestisitler bozulmuştur ve bu tür pestisitleri gaz kromatografisi ile analiz etmek zordur. Bu nedenle YBSK yöntemi, bu tür pestisitlerinin analizlerinde yardımcı olabilir. YBSK cihazında farklı detektörler kullanmak farklı kimyasal yapıdaki pestisitlerin analizi çalışma kapsamını genişletmektedir (Mattice, 2010).

Klorothalonil, Çin'in Xiamen pazarından elde edilen 84 sebze ve meyve örneğinde gaz kromatografisi ile analiz edilmiş ve sebze numunelerinin 2'sinde maksimum kalıntı limit'ten fazla olduğu bulunmuş ve araştırmacılar daha hassas yöntemlere ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir (Chen ve ark., 2011).

Klorotalonil (KLO), Dinobuton (DİN) ve Buprofezin (BUP) pestisitleri ile yapılmış kromatografik çalışmalar Çizelge 1.5'te sunulmuştur.

Çizelge 1.5. Farklı örneklerde pestisit kalıntı analizi

Pestisit	Numune	Hareketli faz (%)	Yöntem ve Dedektör	Analiz süresi (dk)	Kolon	LOD mg/kg	LOQ mg/kg	Akış hızı mL/dk	BSS (%)	Kaynak
Buprofezin	Pirinç	ACN: N-heksan 70:30(h/h)	SK-MS	9,1	Hypersil Gold® C18 (4.0 mm i.d. × 250 mm, 5 µm)	0,02	0,02	1	1,7	(Lee ve Jang, 2010)
Buprofezin	Göl Suyu	MeOH-H ₂ O 80:20(h/h)	SPE/YBSK-FDD	18,491-18,528	XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5-µm)	0,08	0,25	1	1,01	(Tuzimski, 2009)
Buprofezin	Avokado	ACN-FA 20:80(h/h)	SK/MS/MS	24,59	Ascentis C18	0,25	0,7	0,6	1	(López ve ark., 2019)
Klorotalonil	Musluk suyu	-	YBSK-UV,254	-	C18(2.7 µm, L × I.D. 10 cm × 2.1 mm)	0,002 µg/L	-	-	1,4-11,5	(Survey Substances ve Program, 2006)
Klorotalonil	Toprak	ACN: H ₂ O 1:1(h/h)	SK-MS	2,3	Cosmosil 5 PYE 5-µm 150×4.60 mm	0,1 µg/L	-	1	-	(Chaves ve ark., 2008b)
Buprofezin Klorotalonil	Gıda maddeleri	-	GK-MS	-	Rxi-5SilMS	-	-	-	4,92 4,46	(Shah ve ark., 2009)
Klorotalonil	Sebzeler	MeOH-H ₂ O 70:30(h/h)	YBSK-FDD, 246nm	2,6	SunFire C18 (i.d. 4.6 mm × 250 mm, 5 µm)	0,01 µg/mL	-	0,8	7,1	(Hirakawa, 2015)
Klorotalonil Dinobuton	Elma ve Lahana	ACN çözücü kullanılmış	GK-ECD	-	HP5-MS Ultra Inert30mm ×0.25mm	0,5-1,83 0,85-1,52	1,68-6,09 2,83-5,06	- 1	-	(Bakirci ve ark., 2014)

Çizelge 1. 5. (Devamı) Farklı örneklerde pestisit kalıntı analizi

Etken madde	Numune	Hareketli faz (%)	Yöntem ve Dedektör	Analiz Süresi (dk)	Kolon	LOD mg/kg	LOQ mg/kg	Akış hızı ml/dk	BSS (%)	Kaynak
Buprofezin Klorotalonil	Sebze ve Su	H ₂ O, %0,1 FA ve MeOH	GK-MS-SIM	17,161 11,108	J ve W DB5 MS	-	0,002 0,15	0,8	-	(Chem, Korea, Food ve Quechers, 2009)
Buprofezin	Salatalık ve Elma	-	GK/MS	25,533	-	-	-	-	7	(Lu ve ark., 2012)
Klorotalonil	Sera karanfil kültürü	MeOH: H ₂ O 60:40(h/h)	YBSK-UV, 254 nm	4,5	Normal faz C18	0,5 µg/L	-	-	-	(Jongen ve ark., 1991)
Klorotalonil Buprofezin Dinobuton	Kan	-	GK/MS	20,22 24,87 23,88	MS	-	0,0250 0,1000 0,2500	-	-	(Hayat ve ark., 2010)
Klorotalonil	Elma Suyu	ACN: H ₂ O	YBSK-FDD, 260 nm	16,29	C18, 5 µm Luna kolon (250 mm x 4.6 mm ID)	0,5 µg/kg	-	-	2,1	(Topuz ve ark., 2005)
Buprofezin	Pirinç	MeOH: H ₂ O 90;10(h/h)	SK-MS	-	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 x 100 mm, 1.7 µm	0,001	-	0,45	-	(Shah ve ark., 2009)
Buprofezin	Biber	MeOH: H ₂ O 90;10 (h/h)	SK-MS/MS	-	C18 kolon ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm	0,1	-	0,3	7	(Attallah, 2016)

Ülkemizde ve dünyada tarımı yapılan çoğu ürün sayısı 100'leri aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için elde edilen toplam ürünün büyük bir kısmı da kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin oldukça fazla kullanılması ve artarak kullanılmaya devam edilmesi de kuşkusuzdur. Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprakta, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Bu yüzden hedef olmayan diğer organizmalar, insanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Tez kapsamında KLO, DIN ve BUP' un eş zamanlı olarak tayini için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin idrar, domates, toprak, çeşme suyu, içme suyu, atık su ve KLO içeren zirai ilaç formuna uygulaması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisitler

Tez çalışmalarında kullanılan tüm kimyasallar, safsızlıklardan gelebilecek hataları engellemek için analitik ve kromatografik saflıklarda kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Kullanılan pestisitler

Pestisit	Firma
Klorotalonil	LGC Limited
Dinobuton	LGC Limited
Buprofezin	LGC Limited

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- YBSK sistemi: Agilent 1100 (Santa-Clara, CA, ABD)
- G1315B foto diyet dizi detektörü (FDD)
- Manyetik karıştırıcı: Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor Technic)
- Elektronik hassas terazi: Shimadzu Libror AEG –220
- Vortex
- pH metre: Model 526 (WTW, Avusturya) ve kombine elektrot sistemi (cam elektrot-referans elektrot)
- Ultrasonik su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen®, Interlab, Türkiye)
- Farklı hacimlere sahip deney tüpleri, balon jojeler ve sarf malzemeler

2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Tez çalışmalarında kullanılan sabit fazlar ve özellikleri Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmalarda kullanılan kolonların özellikleri

Kolon Adı	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Kimyasal Yapısı	Firma
Kinetex C18	150	4.6	5	Saf silika	Phenomenex (Torrance, CA)
XBridge C18	150	4.6	5	Saf silika	Waters (LiKrom, Türkiye)
Super Cosil LC-18	150	4.6	2.6	Saf silika	Sigma-Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan organik çözücüler kromatografik saflıkta ve diğer kimyasal analitik saflıktadır.

Çizelge 2.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Asetonitril	Sigma-Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Amonyum Asetat	Sigma-Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Sodyum Asetat	Sigma-Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Hidroklorik Asit	Merck Millipore Darmstadt, Almanya)
Sodyum Hidroksit	Merck Millipore (Darmstadt, Almanya)
Hidrojen Peroksit	Merck Millipore Darmstadt, Almanya)

2.1.5. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan KLO, DİN ve BUP eş zamanlı olarak aynı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hassas analitik terazi ile tartım sonucu üç maddenin de derişimi asetonitril ile çözölerek 1000 µg mL⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Her bir madde için balon jojelere aynı miktarda çözölücü ekleyip, tam olarak çözölünmeyi sağlamak için 10 dakika kadar ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hacimleri tamamlanan çözöltiler vorteksle iyice karıştırdıktan sonra kalibrasyon numuneleri için gerekli seyreltmeler yapılarak, 5 µL enjeksiyon hacmi ile sisteme verilmiştir.

2.1.6. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Biyolojik matriks, toprak, su, domates ve zirai ilaç numunelerindeki farklı maddelerin veya katkı maddelerinin, pestisitlerin analizinde girişim etkisinin olup olmadığını belirlemek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla deneylerde yapay insan idrarı, Mersin ilinin belirlenmiş bir bölgesinden alınan toprak örnekleri, Ankara ilinden toplanan içme suyu, çeşme suyu ve atık su örnekleri, Ankara ilinde bulunan marketlerden temin edilen domates örnekleri ve 500 g/L klorotalonil içeren Süperonil 50 SC süspansiyonu kullanılmıştır. Süperonil 50 SC süspansiyonu için standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi uygulanırken, diğer numuneler için kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi yöntemi uygulanmıştır.

2.1.6.1. İdrar Numunelerin Hazırlanması

Dört tane 10 mL 'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpünün her birine 3,2 mL yapay insan idrarı konulmuştur. Yapay insan idrarı üzerine, KLO, DİN ve BUP'un 1000 µg mL⁻¹'lik stok çözöltilerinden toplam hacimlerinde 25, 50, 100 ve 150 µg mL⁻¹'lik olacak şekilde KLO, DİN ve BUP ilave edildikten sonra üzerine asetonitril ilave edilerek idrar proteinleri çöktürölmüştür. İdrar numunesinin çözöltili ile iyice

kariştırılmasını ve etkileşmesini sağlamak için 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda kariştırılmıştır. Daha sonra 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak zltiiler şiringa ucu filtre ile szldkten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

2.1.6.2. Toprak Numunelerin Hazırlanması

Dört tane 10 mL ‘lik ağzı kapaklı santrifüj tüpünün her birine ince toz haline getirilmiş 2 g toprak örnekleri konulmuştur. Örneklerin zerine, KLO, DİN ve BUP’un 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik stok zltiilerinden toplam hacimlerinde 25, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik olacak şekilde KLO, DİN ve BUP ilave edildikten sonra üzerine asetonitril ile hacimleri tamamlanmıştır. Örnekler 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda kariştırıldıktan sonra 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. İlk santrifüj işlemi bittikten sonra st kısımda kalan berrak zlti tekrar 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak zltiiler şiringa ucu filtre ile szldkten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

2.1.6.3. Domates Numunelerin Hazırlanması

Dört tane 10 mL ‘lik ağzı kapaklı santrifüj tüpünün her birine kabukları ile birlikte rendelenip su kıvamına getirilen domates numunesinden 3,2 mL domates suyu konulmuştur. Domates suyu zerine, KLO, DİN ve BUP’un 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik stok zltiilerinden toplam hacimlerinde 25, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik olacak şekilde KLO, DİN ve BUP ilave edildikten sonra üzerine asetonitril ilave edilerek hacimleri tamamlanmıştır. Domates suyunun zlti ile iyice kariştırılmasını ve etkileşmesini sağlamak için 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda kariştırılmıştır. Daha sonra 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak zltiiler şiringa ucu filtre ile szldkten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

2.1.6.4. Su Numunelerin Hazırlanması

Dört tane 10 mL 'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpünün her birine su numunesinden 3,2 mL konulmuştur. Su üzerine, KLO, DİN ve BUP'un 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik stok çözeltilerinden toplam hacimlerinde 25, 50, 100 ve 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik olacak şekilde KLO, DİN ve BUP ilave edildikten sonra üzerine asetonitril ilave edilerek hacimleri tamamlanmıştır. Suyun çözelti ile iyice karıştırılmasını ve etkileşmesini sağlamak için 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Bu işlemler içme suyu, atık su ve çeşme suyu için ayrı ayrı yapılmıştır. Atık su ve çeşme suyu numuneleri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Son aşamada berrak çözeltiler şırınga ucu filtre ile süzildükten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

2.1.6.5. Zirai İlaç Numunelerin Hazırlanması

Litresinde 500 g klorotalonil içeren Süperonil 50 SC® süspansiyonundan 10 mL alınıp 50 mL'ye asetonitril ile balon joje içerisinde tamamlanmış ve tam olarak çözünmeyi sağlamak için ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiştir. Çözelti 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra berrak çözeltiden 100 μL alınarak 10 mL'de stok ilaç çözeltisi hazırlanmıştır. 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik ilaç çözeltisi üzerine % 25, % 50, % 100 ve % 150 oranlarında saf KLO ilavesi yapılmıştır. Çözeltiler şırınga ucu filtre ile süzildükten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan süspansiyon formuna eklenen saf madde miktarlarının ne kadarının tayin edilebildiği yani ne kadarının geri kazanılabildiği hesaplanmıştır.

2.1.6.6. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

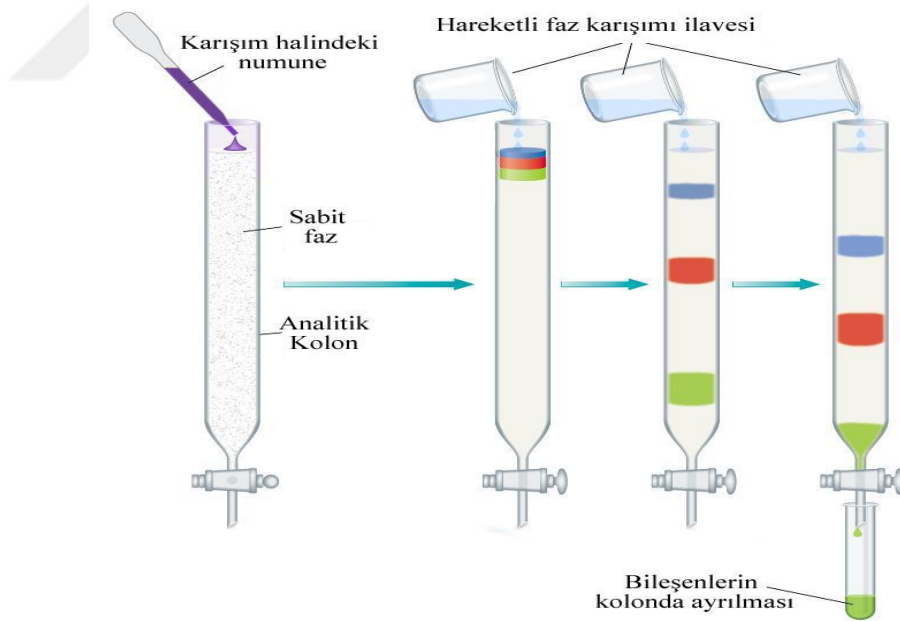
Analizler için öncelikle tampon çözelti olarak artan derişimlerde (5 mM - 40 mM) amonyum asetat çözeltileri hazırlanmıştır. Kromatografik saflıkta asetonitril ve tampon çözelti, farklı oranlarda (75:25; h/h, 80:20; h/h) gradiyent olarak sisteme verilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kromatografi ve Kromatografinin Tarihçesi

Kromatografi terimi bir karışımda bulunan maddelerin, biri hareketli diğeri sabit faz olmak üzere birbiri ile karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, saflaştırılması, teşhisi ve tayini işlemlerinin genel adıdır (Erkmen ,2017; Giri, 2015).

Kromatografi tekniği ilk kez Rus botanikçi bilim adamı Mikhail Tswett tarafından geliştirilmiştir. Mikhail Tsweet bu tekniği bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmak için kullanmıştır ve kolonda renkli bantlar oluştuğunu gözlemiştir. Bu renkli bantların oluşmasından dolayı renk anlamına gelen ‘chroma’ ve yazma anlamına gelen ‘graphein’ kelimeleri ile geliştirdiği teknik kromatografi adını almıştır (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009; Erkmen, 2017).



Şekil 2.1. Kromatografik ayrımın şematik gösterimi (Erkmen, 2017)

Kromatografik tekniklerde analiz edilecek madde veya maddeler, sıvı, gaz veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınmaktadır. Hareketli faz, katı bir yüzeyden veya kolonda sabitleştirilmiş ve hareketli faz ile karışmayan

bir sabit faz içerisinde geçirilmektedir. Bileşenlerin hareketli veya sabit fazda farklı oranlarda dağılması veya çözünmesi bu fazların özelliklerinin seçilmesinde temel alınır. Ayrım sırasında numune içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olmaktadır. Bu etkileşimlere örnek olarak çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi etkileşimler verilebilmektedir (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştaş, 2009; Erkmen, 2017).

2.2.2. Kromatografi tekniklerinin sınıflandırılması

Bugün onlarca farklı kromatografik tekniğin yanı sıra hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik tekniklerin sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırma ile kromatografik teknikleri sınıflandırmak yeterli olmayacaktır. Çeşitli kromatografi kitaplarında veya çalışmalarda kromatografik teknikler farklı şekillerde sınıflandırılabilir ve bu sınıflandırmalarda farklı kriterler temel alınmaktadır (Demirci ve ark., 2009).

Bu kriterlerden bazıları aşağıdaki gibidir:

- Kromatografik ortamın fiziksel şekli
- Örneğin kromatografik ortama verilme biçimi
- Kromatografik ayırma mekanizması
- İki fazın polarlık durumları
- İki fazın fiziksel durumu

Çizelge 2.4. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (Erkmen, 2017)

Ortamın Fiziksel Durumuna Göre	Kolon Kromatografisi
	Düzlem Kromatografi
Örneğin Kromatografik Ortama Veriliş Şekline Göre	Öncül (Frontal)
	Yer Değiştirme (Displacement)
	Sürüklenme ile Yürütme (Elusyon)
Ayrım Mekanizmasına Göre	Dağılma (Partisyon) Kromatografi
	Dışa Soğurma (Adsorpsiyon) Kromatografi
	İyon Değiştirme Kromatografi
	İyon-Çifti Kromatografi
	Molekül Seçme (Jel Filtrasyon) Kromatografi
	İlgi (Affinite) Kromatografi
İki Fazın Polarlık Durumuna Göre	Normal Faz Kromatografi
	Ters Faz Kromatografi
	Hidrofilik Etkileşim Kromatografi
Fazların Fiziksel Şekline Göre	Gaz Kromatografi
	*Gaz-Sıvı Kromatografi
	*Gaz-Katı Kromatografi
	Sıvı Kromatografi
	*Sıvı-Sıvı Kromatografi
	*Sıvı-Katı Kromatografi
	*İyon Değiştirme Kromatografi
	*Molekül Seçme Kromatografi
	Süperkritik Akışkan Kromatografi

2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu kromatografi çeşidi hareketli fazın sıvı veya gaz, sabit fazın katı olduğu bir kromatografi çeşididir. Numune bileşenlerinin sabit faz yüzeyine tutunma özelliğine dayanır. Adsorpsiyon sırasında çözücü içerisindeki madde veya maddeler katı yüzeye adsorbe ya da desorbe olabilmektedir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızlarının farkı toplam adsorpsiyon hızı olarak tanımlanmaktadır. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları birbirine eşit olduğunda sistem denge halindedir ve sistem dengede iken madde kolon boyunca sabit hızla ilerlemektedir. Bir A çözüneninin sabit faz ile hareketli faz arasındaki kütle aktarımı aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$A_{Hareketli\ Faz} = A_{Sabit\ Faz} \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

Çözünenin adsorpsiyon katsayısı veya dağılma katsayısı (K); maddenin sabit fazdaki molar derişiminin (C_1), maddenin hareketli fazdaki derişimine (C_2) oranı ile tanımlanmaktadır.

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

K değeri çok büyük ise, karışım içindeki madde sabit faz tarafından daha iyi tutunmaktadır ve K değeri daha düşük maddelere göre kolon boyunca daha yavaş ilerlemektedir. K değeri küçük ise madde hareketli faza daha ilgilidir ve bu yüzden madde kolon boyunca daha hızlı ilerlemektedir (Skoog ve ark., 2013; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009; Erkmen, 2017).

2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi ise hareketli fazın sıvı, sabit fazın katı yüzey üzerindeki kolon dolgu maddesinin üzerine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasının olduğu bir kromatografi çeşididir. Ayrımın temeli maddelerin birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında dağılması ilkesine dayanır. Karışımında bulunan maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi gerçekleşmektedir. Dağılma kromatografisinde, maddelerin sabit faz içerisindeki çözünürlükleri fazla iken hareketli faz içerisindeki çözünürlükleri ise az olmalıdır. Aksi takdirde maddelerin ayrımı tam olarak gerçekleşmez ve hareketli faza olan ilgilerinden dolayı sabit fazdan dışarı atılırlar. Ayrıca hem sabit faz hemde hareketli faz farklı polariteye sahip oldukları için örnek moleküllerinin çözünürlükleri de farklı olabilmektedirler (Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009; Fanali ve ark., 2013; Erkmen, 2017).

2.2.2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Ters faz sıvı kromatografisi hareketli fazın polaritesinin sabit fazın polaritesine göre daha fazla polar olduğu kromatografi türüdür. Ters faz sıvı kromatografisinde kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel grupları taşıyan sabit fazlar (ODS-18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan) sıkça kullanılmaktadır. Bu kolonların yanı sıra fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirli olan (C_8 , C_2 gibi), fenil ve siyano (CN) bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır.

Ters faz sıvı kromatografisinde hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltiler son derece önemlidir. Tampon çözeltiler hazırlanırken kullanılan su oldukça saf olmalıdır. Hareketli fazın bir diğer önemli bileşeni ise, suyla karışabilen organik çözücülerdir. Hareketli fazlarda kullanılan organik çözücülerden bazıları su, metanol veya asetronitril gibi çözücülerdir.

Ters faz sıvı kromatografisi çoğunlukla apolar maddelerin ayrımı için tercih edilmektedir. Uzun alkil zincirine sahip olan sabit fazlar (C_{18}) daha apolar maddelerin ayrılmasında kullanılırken, kısa alkil zincirli olan sabit fazlar (C_8 , C_2) ise polar maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Buna göre polar olan maddeler uzun alkil zincirine sahip sabit fazlarda daha az tutunuyorken, apolar maddeler de kısa alkil zincirlerine sahip sabit fazlarda daha az tutunmaktadırlar (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988; Fanali ve ark., 2013; Gümüştas, 2009; Erkmen, 2017).

2.2.2.4. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisi sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu kromatografi türüdür. Hareketli faz bileşeni olarak genellikle hekzan, metilen klorür, dietil eter ve kloroform gibi apolar çözücüler kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde en çok tercih edilen sabit fazlar ise; silika ve alüminadır. Ters

ve normal faz sıvı kromatografilerinin farklılıkları Tablo 2-5'te özetlenmiştir (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988 ve Skoog ve ark., 1998).

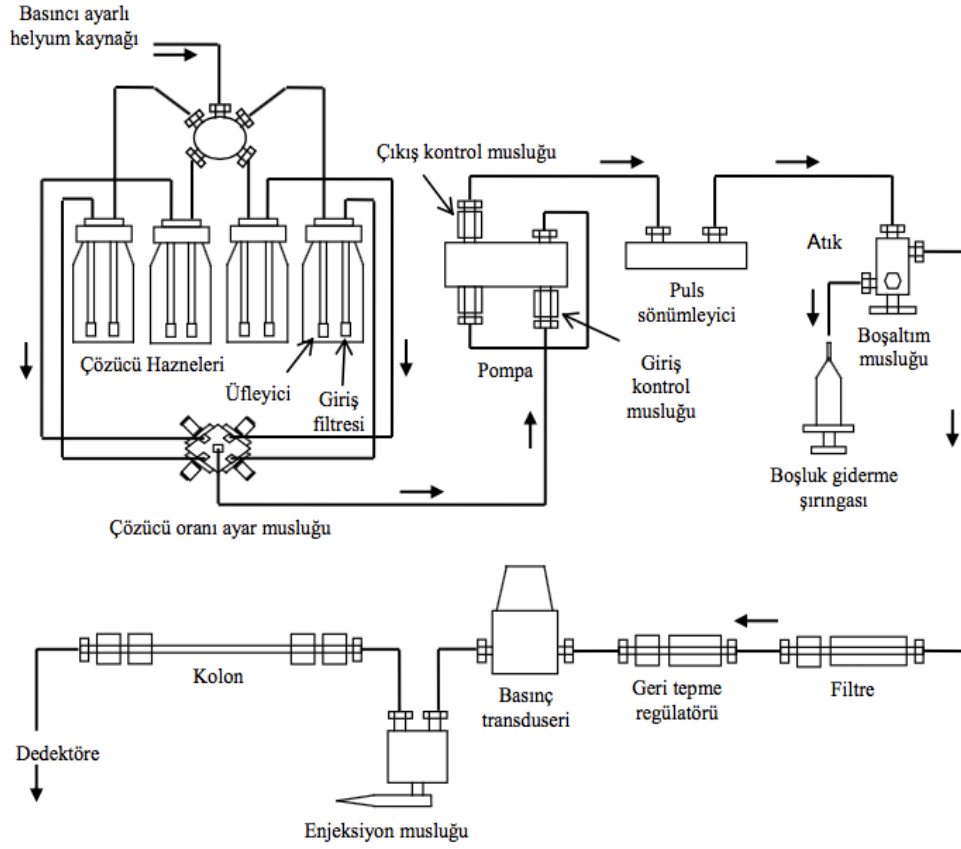
Çizelge 2.5. Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması

	Normal Faz	Ters Faz
Sabit Fazın Polaritesi	Yüksek	Düşük
Hareketli Fazın polaritesi	Düşükten Ortaya	Ortadan Yüksekçe
Alıkonma Sırası	En az polar önce	En polar önce
Hareketli Faz Polarite Artışının Etkisi	Elüsyon zamanını azaltır	Elüsyon zamanını artırır

İlaçlar etken maddeleri genellikle apolar yapıdadırlar. Bu yüzden ilaç analizlerinde ters faz sıvı kromatografisi yöntemi normal faz sıvı kromatografisi yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca kromatografik ayırmada etkili olan solvofobik olaylar, hareketli faz bileşeni olarak kullanılan organik çözücülerin ucuz olması, analizlerde sulu tampon çözeltilerin oranlarının yüksek tutulabilmesi gibi sebeplerden dolayı da ters faz sıvı kromatografisi daha çok tercih edilmektedir (Gümüştaş., 2009; Erkmen, 2017).

2.2.3. Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Modern sıvı kromatografisi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve 2 ile 10 µm arasında tanecik boyutlarına sahip dolgu maddeleri bulunan kolonlar ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek olmaktadır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak gelişen YBSK için gerekli donanımlar, diğer kromatografi sistemleri ile karşılaştırıldığında, daha ince işçilik gerektirdiği daha pahalıdır. Şekil 2.2. tipik bir yüksek başarımli sıvı kromatografisinin önemli parçalarını şematik olarak göstermektedir (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.2. YBSK cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk, CT)

2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir YBSK cihazında, her biri 200-1000 mL çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazneler bulunmaktadır. Genellikle bu haznelerde, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak kolon veya sistemlerde bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihaz bulunmaktadır. Gaz giderme düzeneği, vakum pompası sistemi, damıtma sistemi ve çözücüyü ısıtıp karıştıran bir parçadan oluşabileceği gibi, Şekil 2.2.'deki gibi düşük çözünürlükteki inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla, çözünmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir. Bu sistemlerde, çözücü içerisinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompa ve enjeksiyon sistemlerine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de bulunurlar.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırımlar izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Bir diğer elüsyon yöntemi de gradiyent elüsyondur. Gradiyent elüsyonda polariteleri birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılmaktadır. Genellikle, ayırm verimliliği gradiyent elüsyon ile büyük ölçüde artırılır. Gradiyent elüsyonda, elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde, zamana bağlı olarak çözücülerin oranları değiştirilebilmektedir. Günümüzdeki modern YBSK sistemleri çözücülerin hacimsel oranlarını zamanla doğrusal veya üstel olarak değiştirebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma ortamında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getirebilen sistemlerle donatılmıştır (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.2. Pompalama Sistemleri

Bir YBSK pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içermektedir:

- 400 atm'e kadar basınç üretimi,
- Puls içermeyen basınç çıkışı,
- 0,1-10 mL dakika⁻¹ aralığında akış hızları,
- % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
- Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık).

YBSK sistemlerinde her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa kullanılmaktadır.

Bunlar;

- Pistonlu pompalar,
- Şırınga veya sürgülü pompalar
- Pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Çoğu zaman, sıvı kromatografisinde ölçümlerin kesinliğinin belirleyici faktörü, numunenin kolon dolgu maddesine sevkini tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklemesi yapılan kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkilemektedir. Bu yüzden, numune enjeksiyonun hacmi, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 500 μL 'ye kadar oldukça küçük olmalıdır. Dahası, sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

Sıvı kromatografide numune enjeksiyonu için en yaygın kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 μL 'den 500 μL 'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma halkaları, 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0.5-5 μL arasında olan halkaları bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları

Sıvı kromatografi sistemlerinde düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılmış veya nadiren kalın cidarlı cam borulardan yapılan kolonlar kullanılmaktadır.

2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar

YBSK'de kullanılan kolonların büyük çoğunluğu boyu 10-30 cm arasında değişmektedir. Kolonlarının iç çapları genellikle 4-10 mm; yaygın olarak kullanılan kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise 5-10 μm arasındadır. Günümüzde belki de en çok, 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 μm tanecik

büyükluğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Bu tip kolonlar 40000-60000 teorik plaka metre⁻¹ içerirler.

Son yıllarda, üreticiler daha küçük boyutlarda, yüksek başarımlı kolonlar üretmektedirler. Bu gibi kolonların iç çapı 1-4,6 mm ve 3-5 µm tanecik büyüklüğündeki dolgu maddesi ile doldurulmuş olabilir. Çoğu zaman boyları 3-7,5 cm kadar kısadır. Bu gibi kolonlar 100000 teorik plaka metre⁻¹ içerirler. Ayrıca hız ve minimum çözücü sarfıyatı avantajları vardır. Son özellik oldukça önemlidir, çünkü sıvı kromatografi için gerekli olan yüksek saflıktaki çözücüler, temin edilmesi ve daha sonra atılması oldukça pahalıya mal olan çözücülerdir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4.2. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar,

- Film dolgular
- Gözenekli dolgulardır.

Film dolgular, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinde oluşurlar. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, sabit bir faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulabilir. Günümüzde, taneler, zarlı dolgular daha çok koruyucu kolonlarda kullanılmakta, analitik kolonlarda kullanılmamaktadır.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli partiküller, çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Belli boyutlardaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek için, her türlü gayret sarfedilmektedir. Partiküller, silis,

alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değıştirci reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın olarak kullanılan bir dolgu maddesidir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.5. Dedektörler

Dedektörler, elektromanyetik dalga formundaki enerji akısını ölçülebilir niceliklere çeviren ve kayıt edilmesini sağlayan cihazlardır. Sıvı kromatografi için ideal bir dedektör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- Yeterli derecede duyarlılık
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik
- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı
- Akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı
- Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı
- Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimde olmalıdır.

Sıvı kromatografi sistemlerinde kullanılan dedektörler temel olarak iki tiptir (Skoog ve ark., 1998).

- Yığın özelliğı dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi analit tarafından değıştirilen yığın özelliklere cevap veren dedektörlerdir.
- Analit özelliğı dedektörleri, analitin UV absorbanısı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

Analit özelliğı yani maddeye yönelik dedektörler hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir (Skoog ve ark., 1998):

- Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared)
- Elektrokimyasal dedektörler
- Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
- Radyoaktivite dedektörleri
- Kütle spektrometreleri

Yıgın özelliği yani çözeltiye yönelik dedektörler; örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Skoog ve ark., 1998):

- Refraktif indeks dedektörleri
- Dielektrik sabiti dedektörleri
- İletkenlik dedektörleri
- Yoğunluk dedektörleri

Tez kapsamındaki çalışmalarda Foto diyot dizi dedektör kullanıldığından bu dedektör için bilgiler verilmiştir.

2.2.3.5.1. Foto Diyot Dizi Dedektör (FDD)

Foto diyot dizi dedektörlerde polikromatik ışın kullanılmaktadır. Işın kaynağı olarak tungsten veya döteryum lambaları kullanılmaktadır. Işık kaynağından çıkan polikromatik ışınlar akış hücresine geldikten sonra optik ağıın üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşmektedir.

FDD 200 ile 700 nm arası dalga boyu aralığını 0.1 s aralıklarla tespit edebilme özelliğine sahiptir. Bu yüzden analizlerde FDD ile birden fazla dalga boyunda okuma yapılabilmektedir. FDD ile cevap piklerinin saf olup olmadığına ya da pik girişiminin olup olmadığına da bakılabilmektedir (Gümüştas, 2009).

FDD'nin avantajları aşağıda sıralanmıştır.

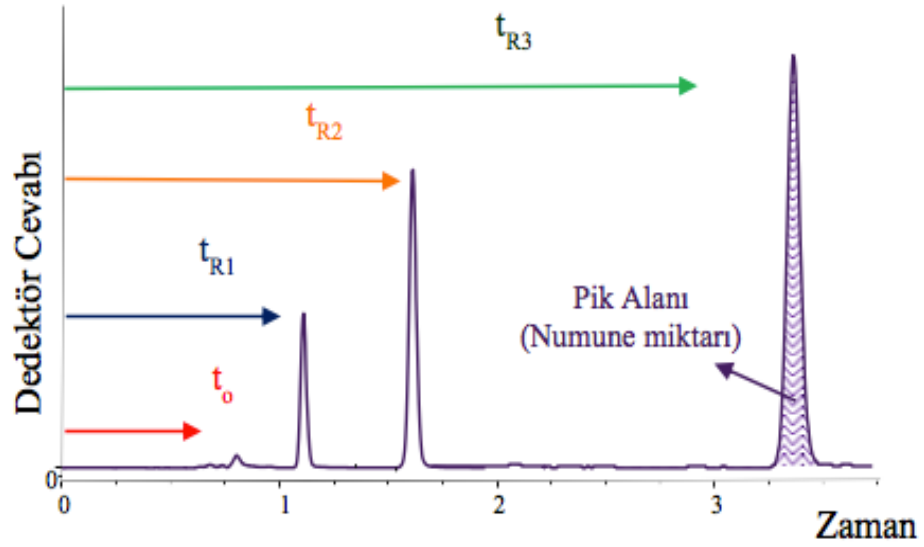
- Seçilen bütün dalga boylarında okumalar aynı anda yapılabilir.
- Maksimum absorbansın olduğu dalga boyu tek bir enjeksiyonla bulunabilir.
- Kromatografik olarak ayrılamayan piklerin nicel analizi yapılabilir (Gümüştas., 2009; Erkmen, 2017).

2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

YBSK sisteminin analiz sonuçlarında gözle izlenebilen ilk parametreler; alıkonma zamanı, pik alanı, pikin şekli gibi parametrelerdir. Bir kromatogramda ilk izlenen parametre pik şeklindedir. İdeal pik şekli keskin, iki tarafının eşit ve dar olanıdır (Şekil 2.3). Numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra, dedektöre gelen cevap sinyali bir pik olarak görülür. Bu sinyalin çıkış zamanı aynı zamanda alıkonma zamanı (t_R) olarak da adlandırılır ve nitel analizlerin belirleyici faktörüdür. Numune içinde bulunan her bir analitin farklı alıkonma zamanları vardır. Hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır (Fanali ve ark., 2013; Kromidas, 2005; Erkmen, 2017). Ters faz sıvı kromatografik yöntemlerde ölü zamanı belirlemek için urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek olan bileşikler kullanılmaktadır.

Sistem uygunluk testleri kromatografik ve diğer ayırma yöntemlerinde, yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirlemek için yapılmaktadır ve bu testlerin gerçekleştirilmesiyle kromatografik bir sistemin analize ne ölçüde uygun olduğu kanıtlanmış olur. Bu testler Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation (ICH)) Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması önerilen testlerdir. Sistemdeki akış hızı, pH, okuma yapılacak dalga boyu, hareketli faz bileşiminden kaynaklı en ufak bir değişiklik için, sistem uygunluk testlerinin yeni sistem için tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir (Gümüştas., 2016; Chan ve ark., 2004; Grdinic ve Vukovic, 2004; Hajicostas, 2003; Hibbert, 2007; Huber, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Prichard ve Barvick, 2007;

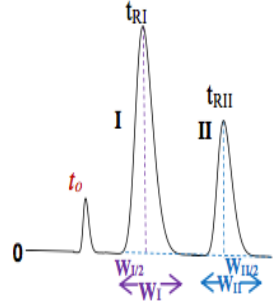
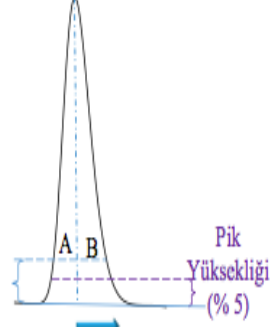
Swartz ve Krull, 1997; Torbeck, 2007; US FDA, 1983; US FDA, 2000; USP 37, 2014 ve Werner ve ark., 2006, European Pharmacopoeia, 2014).



Şekil 2.3. YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram (Gümüştas., 2009)

Bir kromatogramın yorumlanması ve SUT parametrelerinin (Çizelge 2.6) limit değerlerinin içinde olup olmadığının belirlenmesinde temel olarak alıkonma zamanı ve pik genişliği esas alınır. Çizelge 2.6’de Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri, bu parametrelerin nasıl hesaplanacağı ve limit değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. SUT parametreleri

SUT Parametresi	Sembolü	Formülü	Limit	Açıklama
Kapasite Faktörü	k	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$1 \leq k \leq 10$	
Seçicilik	α	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$	$\alpha > 1$	
Ayrım Gücü	R_S	$R_S = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{10.5} + W_{20.5}}$	$R_S > 1.5$	
Kuyruklanma Faktörü	T	$T = \frac{A+B}{A}$	$2 \leq$	
Pik Asimetresi	A_S	$A_S = \frac{B}{A}$	$0.95 \leq A_S \leq 2$	
Teorik Tabaka Sayısı	N	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	$N > 2000$	
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği	% BSS	$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$	$\% BSS < 1.5$	

Çizelge 2.6'e bakıldığında, k değeri büyük ise, bileşen sabit fazda iyi tutulmaktadır ve kolon boyunca yavaş ilerlemektedir. k değeri çok küçük ise, analit çözücü pikinden ayıramamaktadır, çok büyük olması ise analiz süresinin uzun olduğunu göstermektedir. Seçicilik (α), sabit faz ve hareketli fazın özelliklerine göre değişiklik göstermektedir ve daima 1'den büyük olmalıdır.

SUT'un en önemli parametresi teorik tabaka sayısıdır. Çünkü bu değer analiz sonucunun verimi ile direkt ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine, akış hızı, sıcaklık, pH ve kolonun ömrü gibi deneysel koşullara bağlıdır.

Kromatografik işlemlerde kolon ve çözücünün ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) olarak ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, etkin tabaka sayısı ve seçicilikten yararlanılmaktadır. Peş peşe gelen iki pik için R_S değeri 1,5 ve üstünde iken ayırım tam olarak gerçekleşmiş demektir.

Kuyruklanma faktörü ve pik asimetrisi parametreleri incelenen analit pikinin eğriliğini, sağ veya sol tarafa dayalı olup olmadığını ve keskinliğini belirleyebilmek için kullanılan parametrelerdir. Uzun süre kullanılmış kolonlarda kuyruklanma daha sık görülmekte ve doğru sonuçlar vermemektedir. Pik asimetrisi, pik taban yüksekliğinin % 10'u, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarından ölçülerek hesaplanmaktadır.

Bir kromatografik yöntemde analizi yapılan madde pikinin alanının ve pik yüksekliğinin, belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğinin ifadesidir. Bu parametre analizi yapılan maddenin en az 5-6 defa sisteme peş peşe enjeksiyonunun verilmesinden sonra elde edilen pik alanları ve pik yüksekliklerinin bağıl standart sapması (% BSS) olarak hesaplanır.

2.2.4.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri

Araştırma geliştirme faaliyetlerinin yürütüldüğü ve kalite kontrol işlemlerinin uygulandığı her alanda, kullanılan tüm analiz, yöntem ve uygulamaların, doğru, tekrarlanabilir ve belirlenen parametreler içerisinde ölçülebilir olması etkinlik ve güvenilirlik açısından son derece önemlidir. Yöntem geçerliliği (validasyon) ise bu özelliklerin uluslararası standartlarda olduğunu göstermektedir (Gümüştas, 2016; Crowter, 2001; Ermer, 2005; Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Lee, 2004; US FDA, 1983; US FDA, 2000 ve USP 37, 2014).

Geliştirilen yöntemlerin kullanılabilir olması için iyi karakterize edilmesi ve güvenilir sonuçların elde edilebildiği tamamen geçerli olan analitik yöntemlerin geliştirilmesi şarttır.

Aşağıdaki çizelgede farklı klavuzlara göre yapılması gereken validasyon parametreleri verilmiştir.

Çizelge 2.7. Validasyon parametreleri

Gerekli Validasyon Parametresi		ICH	USP
Seçicilik		✓	✓
Doğrusallık		✓	✓
Aralık		✓	✓
TS		✓	Sadece sınır testlerinde
TAS		✓	Sadece kantitatif çalışmalarda
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	✓	✓
	Gün için tekrar edilebilirlik	✓	-
	Günler arası tekrar	✓	-
	edilebilirlik	✓	-
Doğruluk		✓	✓
Sağlamlık		Tavsiye edilir	✓
Tutarlılık		Tavsiye edilir	✓
Çözelti Stabilitesi		✓	Tavsiye edilir
Duyarlılık		Tavsiye edilir	✓

2.2.4.2. Validasyonun Genel İşlemleri

Validasyon, herhangi bir analitik yöntemin güvenilirliğini ortaya koymak için de kullanılmaktadır. Ayrıca bir laboratuvarın analitik verilerinin ne kadar güvenilir olduğunu anlamak için o laboratuvarında kullanılan yöntemlerin validasyonları da şarttır (Özkan, 2012). Validasyonun geçerliliği için aşağıda belirtilen işlemlerin ve tanımlamaların yapılması gereklidir (Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; Kromidas, 2005; USP 37, 2014; US FDA, 1983; US FDA, 2000; Özkan, 2012 ve Özkan ve ark., 2015; Gümüştaş, 2016).

- Cihaz/Ekipman Kalite Kontrolü: Bu kontrole bütün cihazların donanımsal ve yazılımsal kontrolleri yapılır,
- Rutin analizde kullanılacak bir analizin veya yöntem parametrelerinde herhangi bir değişiklik yapılan metodun validasyonu,
- Ayırma yöntemlerinin validasyonu için gerekli olan ve çalışma sırasında, günler arasında ve numunelerin analizleri sırasında uygulanan Sistem Uygunluk Testleri (SUT) ve ilgili parametrelerinin saptanması.

ICH (International Council on Harmonization: Uluslararası uyum konseyi) ve Farmakopeler tarafından stabilite, işlem analizleri, tanıma, saflık, ilaç etken maddesinin etkinliğini, salım testleri ve kabul testleri gibi basamaklar için detaylı bilgiler verebilen yeni analitik yöntemlere gerekli validasyon parametreleri ve bu parametrelerin sahip olması gereken değerler önerilmiş ve kabul edilmiştir. Validasyon, tek başına bir yöntemin uygulanması için düşünülmemelidir. Bir analitik yöntem kullanımı süresince her zaman ve her yerde geçerliliğini korumalıdır. Bir analiz yöntemi, etkinlik parametreleri ile karakterize edilir. Bu etkinlik değerleri çeşitli kılavuzlar ve farmakopelerde belirtilen değerleri sağlamalıdır (Chan ve ark., 2004; Crowter, 2001; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Lee, 2004; USP 37, 2014; Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Snyder ve ark., 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001; Lunte ve Radzik, 1996; Adamovics, 1997; Braggio ve ark., 1996; Shabir, 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004; Ermer, 2001; Mc Dowell, 1999; Ermer ve Miller, 2005; De Bievre ve Gunzler, 2005 ve Vessman, 1996; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.1. Seçicilik

Seçicilik, analizi yapılan numunede var olan ve analizi yapılan maddeyle girişim yapabilecek ilgili bileşenlerin (safsızlık, bozunma ürünleri veya ortamdan gelebilecek) yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilmesidir. Seçicilik, kromatografik sistemlerin validasyonunun en önemli parametresidir. Çünkü seçiciliğin olmadığı bir yöntemde başka hiçbir parametrenin öneminden

bahsedilemez. Seçiciliğin yeterli düzeyde olmaması durumunda, yöntemin doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği hakkında yanlış bilgiler elde edilir.

Seçiciliğin belirlenmesi için birkaç farklı yol vardır:

➤ Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler (benzer maddeler, dozaj formu içindeki yardımcı maddeler gibi) aynı anda kolona enjekte edilir ve geliştirilen yöntemle analiz edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ($R_s \geq 2,0$ olmalıdır).

➤ Geliştirilen kromatografik yöntemin şartlarında ufak değişiklikler yapılır, (çözelti bileşimi, tampon çözelti pH'si, sıcaklık gibi) Bu değişikliklerin pik performansına olan etkileri takip edilir.

➤ Kullanılan FDD dedektörü ile yazılım vasıtasıyla pik saflıkları kontrol edilir. Mevcut sinyalin altında bir sinyal daha olup olmadığından emin olunabilir (Barwick ve Ellison, 2005; Bliener, 2006; Branch, 2005; Casro ve ark., 2005; Chan, 2004; Chan ve ark., 2004; Christian, 2004; Crowter, 2001; Ermer ve Ploss, 2005; Görög, 2007; Grdinic ve Vukovic, 2004; Gumustas ve Ozkan 2011; Haider, 2002; Hartman ve ark., 1998; Hibbert, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Konieczka, 2007; Lee, 2004; Majcen, 2003; Prichard ve Barvick, 2007; Riley ve Rosanske, 1996; Shabir, 2003; Snyder ve ark., 1997; Switaj-Zawadka ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2002 ve Van Locco ve ark., 2002; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık analit derişiminin bir fonksiyonudur ve sinyallerin grafiksel olarak yorumlanması ile belirlenir. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon (R^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Bu parametreler analit derişiminin ölçülen sinyallere karşı regresyon analizleri kullanılarak matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısının 0,999 ve üzerinde olması durumunda sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirlemek için stok çözeltiden en az 5 farklı derişim hazırlanır ve analiz sonuçları çözelti derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Grafiğe geçirilen noktalar bulunan eğilim çizgisi üzerine denk gelmeli veya çok yakınından geçmelidir. Böylelikle r veya R^2 değerleri de 1'e yaklaşmış olur. Doğrusallık sonuçları raporlanırken eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'leri veya standart hataları da hesaplanarak verilmelidir.

Aralık ise doğruluğu ve duyarlılığı yeterli kabul edilen bir yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığı olarak adlandırılmaktadır. Her nicel yöntemde çalışma aralığı mutlaka belirlenmelidir. Genellikle çalışmalarda en iyi performansı veren çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin % 50'si ile % 150'si arasındadır (Ozkan, 2012; Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan ve ark., 2015; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)

Bir numune içinde analizi yapılacak bileşenin (analit) teşhis edilebilen, ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayini yapılamayan en düşük derişimi TS olarak ifade edilir. TAS ise doğru bir şekilde tayin edilebilen cevabı veren en küçük analit derişimini ifade eder. Bu değerler birkaç yolla bulunabilir veya hesaplanabilir. Bunlar, görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve cevabın standart sapması ve eğim kullanılarak hesaplanması yöntemleridir.

Görsel yöntem ile hazırlanabilecek en düşük derişimdeki çözelti hazırlanır ve sisteme enjekte edilir bu işlem bileşenin sinyalinin belirlediği fakat alan okumasının yapılamadığı en düşük seviyenin saptanmasına kadar devam eder.

İkinci yöntem için yapılan deneylerden elde edilen kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için analitin bilinen düşük derişimdeki çözeltilerinden elde edilen cevaplar, şahit (kör) çözelti cevapları ile karşılaştırılır.

Sinyalin gürültüye oranının 3 olduğu derişim TS ve 10 olduğu derişim TAS olarak kabul edilir.

Eşitlik 2.3. ve eşitlik 2.4’de s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu eşitlikler aynı zamanda eğri fonksiyonuna bağlı olarak TS, TAS ve duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir (Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

$$TS = \frac{3,3 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

$$TAS = \frac{10 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

2.2.4.2.4. Kesinlik

Analiz için geliştirilen yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Kesinlik sonuçları % BSS olarak verilmelidir.

Kesinlik üç aşamada incelenir:

- Enjeksiyonlar arası tekrarlanabilirlik (tekrar edilebilirlik),
- Orta kesinlik,
- Tekrar elde edilebilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa sürelerde aynı numune veya çözeltiler kullanılarak aynı şartlar altında elde edilen kesinlik parametresidir. Ayrıca enjeksiyonun tekrarlanabilirliği olarak da adlandırılır. Elde edilecek % BSS değeri ≤ 1.0 olmalıdır. Bu değer eser element analizlerinde, biyolojik numunelerde ve safsızlık tayinlerinde % 5’e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirtmektedir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya gün içi kesinlik olarak da tanımlanabilir. Analit çözeltisi aynı günde ve/veya farklı analizciler tarafından hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden en az 3'er defa ölçüm yapılır. Orta kesinlik sonuçları %BSS kullanılarak ifade edilir ve $\% BSS \leq 2$ olmalıdır. Eğer biyolojik numunelerle çalışılıyorsa bu kesinlik derecesini veren % BSS değerleri % 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Tekrar elde edilebilirlik, yöntemlerin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir. Tekrar elde edilebilirlik kriteri $\% BSS \leq 2$ olmalıdır. Ancak safsızlık veya eser madde analizlerinde bu oran % 10-15'e kadar kabul edilebilir seviyededir (Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, validasyon çalışmalarının en zor ve en önemli parçasıdır. Analiz sonucu elde edilen değer gerçek (referans) değere ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Doğruluk sonuçları ortalama % geri kazanım cinsinden ifade edilir. Ortama ilave edilen saf maddenin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğinin göstergesidir. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişimde yapılır; bunlar genellikle hedef değerin % 25, % 50 ve % 100'üne eşdeğer olacak derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim değeri için en az 5 tekrarlı analiz yapılmalıdır ve bunun sonucunda geri kazanım sonuçları % 100'üne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünülür.

Doğruluk bir takım yaklaşımlarla saptanıp, gösterilebilir. Bunlar:

- Kesin doğrusallık ve seçicilik,
- Elde edilen sonuçların, geçerli ve bağımsız başka bir yöntem ile kıyaslanması,
- Analizi yapılacak gerçek numuneye uygulanması,

- İlaç numunesine veya matris ortamına etken maddeyi standart ekleme ile ilave edip, geri kazanımının bulunmasıdır.

Kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi: Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman tercih edilir. Analitin boş ortama farklı derişimlerde eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bu analizlere örnek olarak ilaç etken madde analizleri için, etken madde içermeyen fakat yardımcı maddelerin olduğu ortam kullanılabilir. Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her derişim değerinde en az 3'er ölçüm yapılır. Bu işlemlerin sonuçları % geri kazanım olarak ifade edilir ve % BSS ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber raporlanır. Referans standart bir yöntem kullanarak sonuçların kıyaslanması: Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Her iki yönleme ait analiz sonuçları istatistiksel olarak kıyaslanır. Bu işlem yapılırken Student t ve F testleri kullanılır. t testi ile iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki farklar, F testi ile de standart sapmalar arasındaki farklar karşılaştırmalı olarak rapor edilir. Bulunan değerler, teorik değerler ile karşılaştırılır, karşılaştırma sonucunda hesaplanarak elde edilen değerler çizelgede yer alan teorik değerlerden küçük veya bu değere yakın ise geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğu kanısına varılır. Sonuçların ortalamaları, aşağıdaki eşitliklerde görülen % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Boş bir matriks bulunmayan durumlarda bu yöntem sıklıkla tercih edilir. Analizi yapılacak maddenin bilinen ve farklı miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Genellikle, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH ile beraber raporlanır (Gümüştas, 2016).

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.5.})$$

$$\% BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.6.})$$

2.2.4.2.6. Sağlamlık

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden uygulanabilmesinin göstergesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, dalga boyu, akış hızı ve sıcaklık gibi etkenlerdir (Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.7. Tutarlılık

Tutarlılık, kullanılan yöntemin gerçek pratik koşullar altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır ve tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik gibi değerlerle de yakından alakalıdır (Heyden ve ark, 1996). Bunun için çalışma, aynı laboratuvarında bulunan farklı analizciler, farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmelidir. Bunun yanında kullanılan reaktif ve çözücülerin markalarının ve üretim serilerinin değiştirilmesi gibi normal analiz koşullarının değiştirilmesi, aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir. Özellikle yöntemin farklı bir laboratuvarında gerçekleştirildiği durumlarda bu parametre son derece önemlidir ve elde edilen sonuçlar % BSS değeri ile ifade edilir (Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.8. Stabilité

Bu parametre genellikle çalışılan analitlerin kararlılığı ile alakalıdır. Analitin farklı koşullar altında ne kadar süre kararlı kalabildiğini bize gösterir. Stabilité çalışmaları sonucunda yöntemin seçiciliği de tekrar denenmiş olur. Özellikle

meydana gelebilecek bozunma ürünlerinin etken madde yanında tayin edilebildiğinin bir göstergesidir. 4 farklı şekilde stabilite çalışmaları yapılabilmektedir:

- Kısa süreli stabilite
- Uzun süreli stabilite
- Dondurma-çözme stabilitesi
- Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmalarında farklı derişim seviyelerinden alınan örnekler oda sıcaklığında çözülür ve 4-24 saat aralığında bu ortamda kalması sağlanır. Bu işlem sonrasında sonuçlar taze hazırlanmış çözelti ile karşılaştırılır.

Uzun süreli stabilite çalışmalarında kullanılan etken maddenin ne kadar süre kararlı kaldığı ölçülür. 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerinde ölçümler alınır ve taze çözelti sonuçları ile karşılaştırılır.

Dondurma-çözme stabilitesi üç döngü üzerinden gerçekleştirilir. Üç farklı derişimdeki çözeltiler istenilen sıcaklıkta 24 saat süre ile dondurulur. Daha sonra kendiliğinden çözülmesi için beklenir ve bu işlem 2 defa daha tekrarlandıktan sonra analiz yapılarak sonuçlar karşılaştırılır.

Hızlandırılmış bozunma çalışmaları kullanılarak etken maddenin hızlı bir biçimde bozulması sağlanır ve bu sayede safsızlıkların veya bozunma sonucu oluşan ürünlerin analize etkisi incelenir (Gümüştaş, 2016).

3.BULGULAR

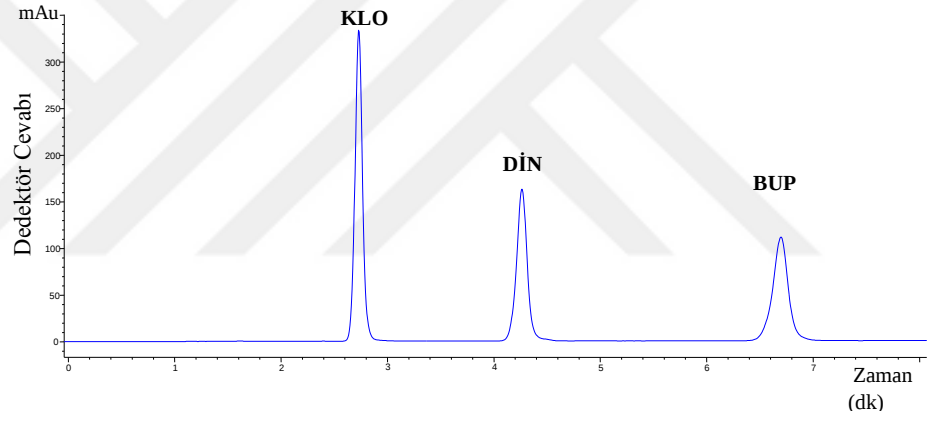
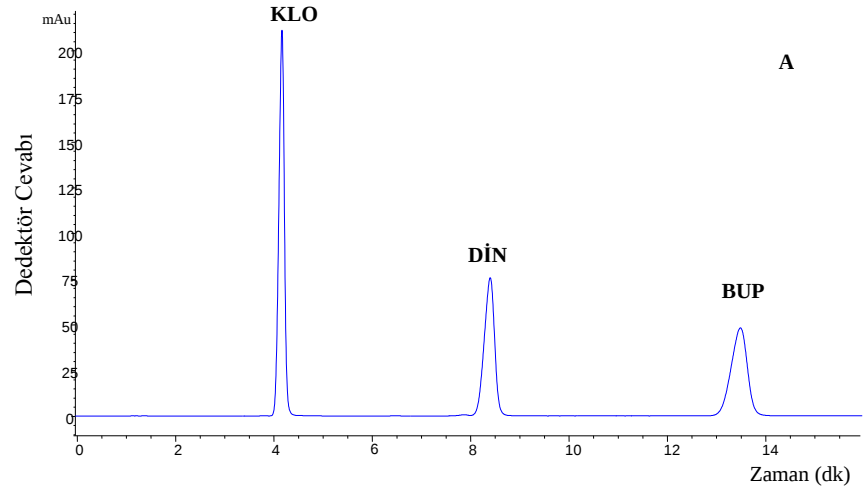
3.1. KLO, DİN ve BUP Pestisitleri İçin Geliştirilen YBSK-FDD Yöntemine Ait Analiz Bulguları

3.1.1.Yönteminin Optimizasyonu

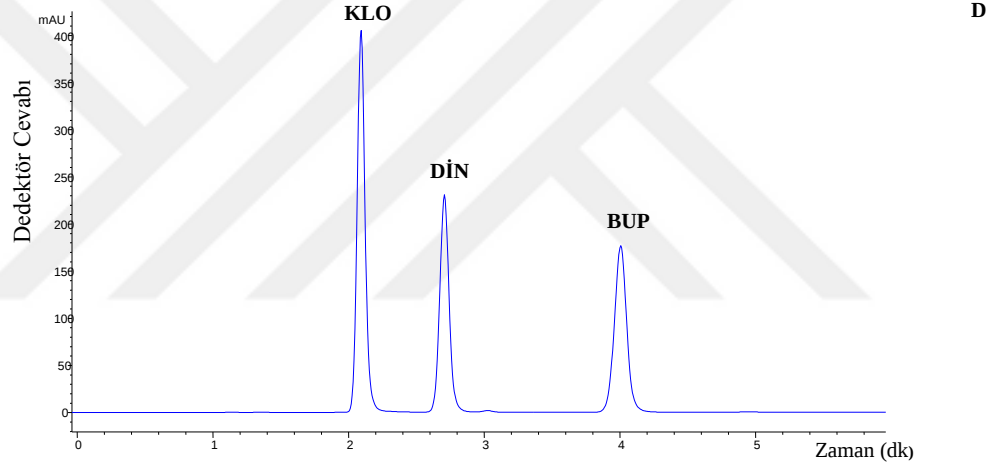
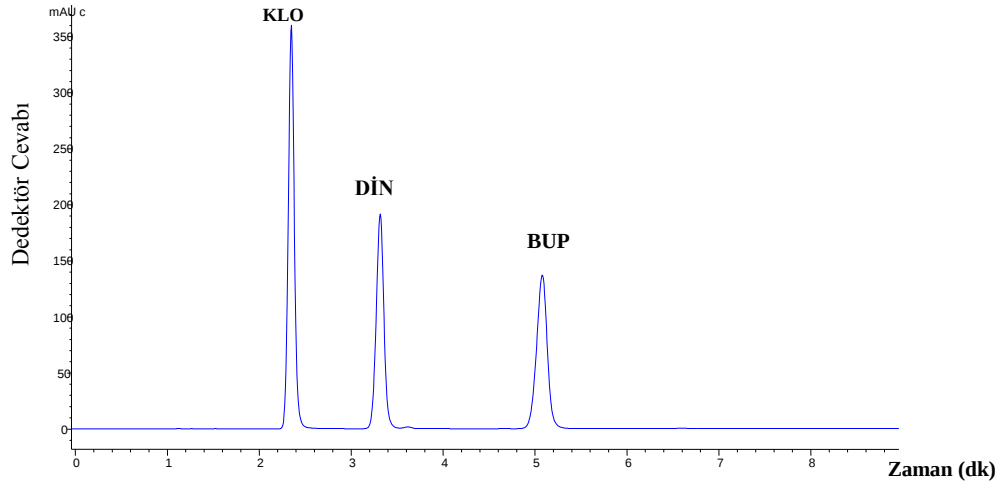
Üç tane pestisit (KLO, DİN ve BUP) eş zamanlı olarak YBSK-FDD yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine hareketli faz bileşimi denemeleriyle başlanmıştır. Daha sonra hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltinin molarite değişiminin analiz sonucuna etkisini inceleme çalışmaları yapılmıştır. Farklı sabit fazlar denenerek sabit fazın partikül boyutunun etkisi incelenmiştir. Bununla birlikte, pH, akış hızı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi çalışmaları da yapılmıştır. SUT parametrelerini hesaplamak ve ölü zamanı (t_0) belirlemek için potasyum bromür (KBr) kullanılmıştır.

3.1.1.1. Hareketli Fazda Organik Çözücü ve Tampon Çözeltinin Yüzdelerinin Belirlenmesi

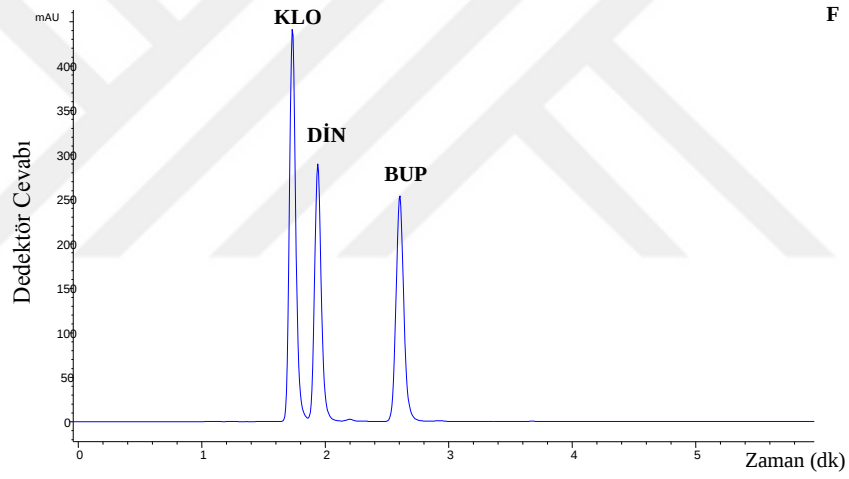
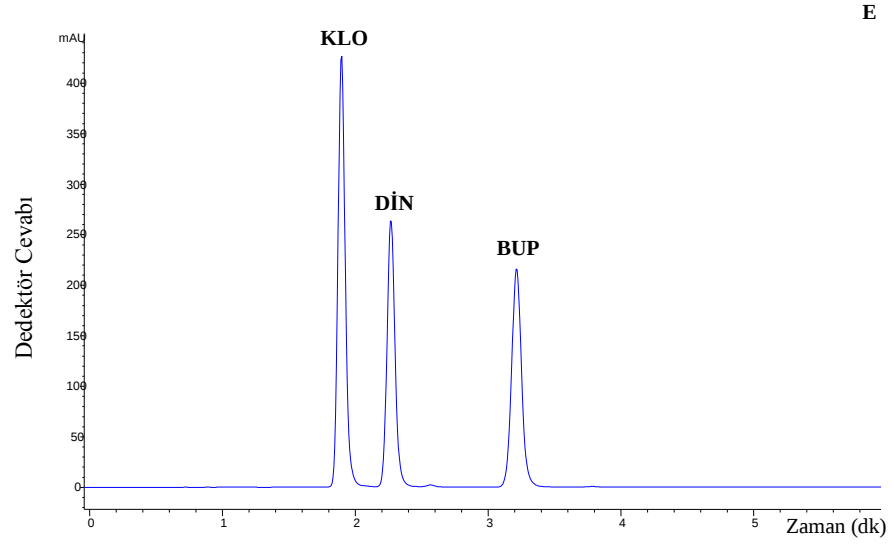
YBSK yönteminde, SUT parametrelerine dayanan iyi bir ayırım için organik çözücü ve su yüzdesi son derece kritik bir parametredir. Uygun ACN oranını bulmak için hareketli fazın organik çözücü içeriği % 60, % 70, % 75, % 80, % 85, % 90 ve % 95 oranlarında değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonda 25 °C'de 1 mL dk⁻¹ akış hızı ve 10 μ L enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Tampon çözelti olarak 10 mM amonyum asetat kullanılmıştır.



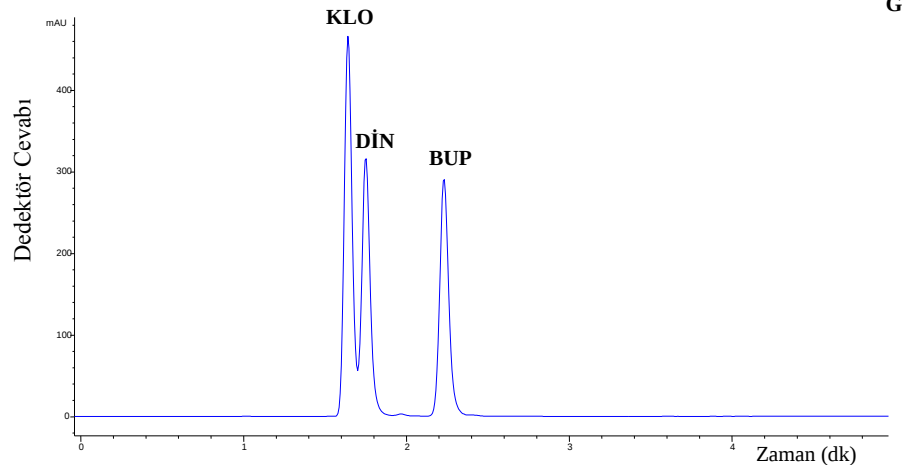
Şekil 3.1. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 10 mM Amonyum asetat (60/40; h/h) (A), (70/30; h/h) (B), (75/25; h/h) (C), (80/20; h/h) (D), (85/15; h/h) (E), (90/10; h/h) (F) ve (95/5; h/h) (G) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.1. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 10 mM Amonyum asetat (60/40; h/h) (A), (70/30; h/h) (B), (75/25; h/h) (C), (80/20; h/h) (D), (85/15; h/h) (E), (90/10;h/h) (F) ve (95/5; h/h) (G) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.1. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 10 mM Amonyum asetat (60/40; h/h) (A), (70/30; h/h) (B), (75/25; h/h) (C), (80/20; h/h) (D), (85/15; h/h) (E), (90/10;h/h) (F) ve (95/5; h/h) (G) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.1. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 10 mM Amonyum asetat (60/40; h/h) (A), (70/30; h/h) (B), (75/25; h/h) (C), (80/20; h/h) (D), (85/15; h/h) (E), (90/10;h/h) (F) ve (95/5; h/h) (G) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

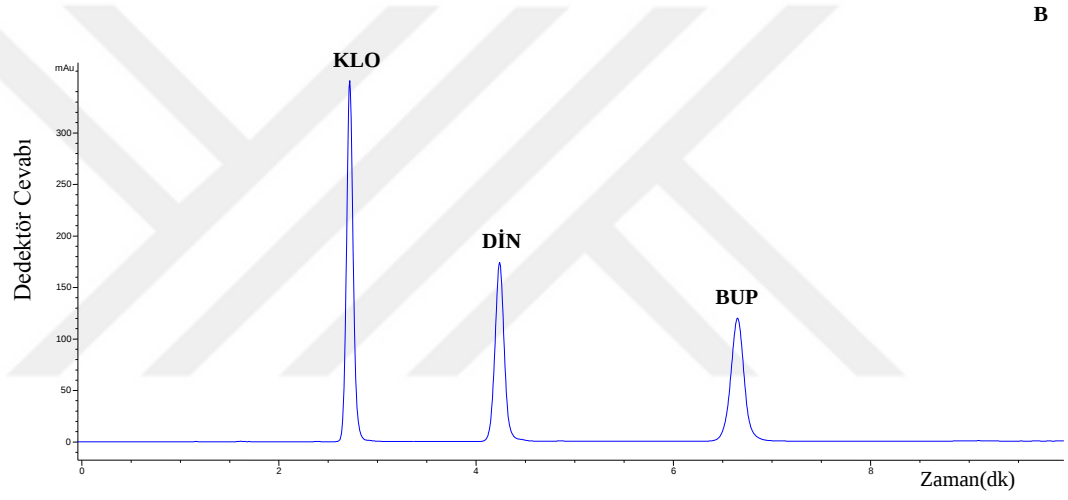
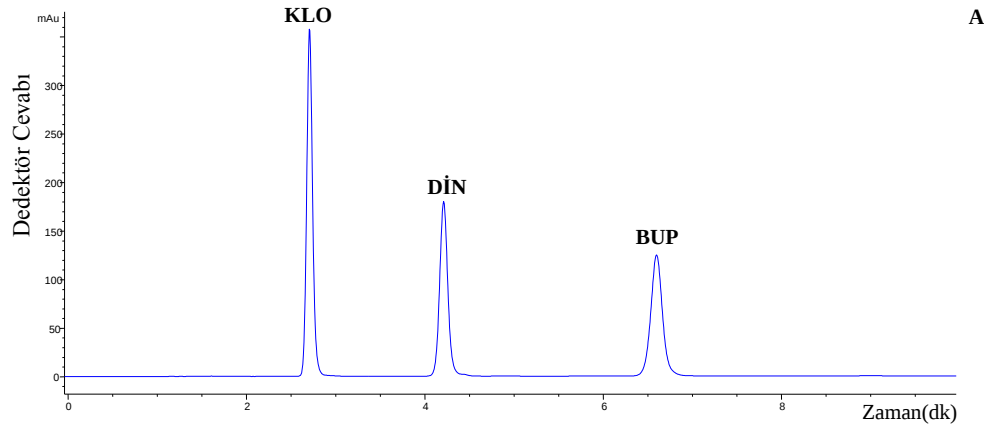
Çizelge 3.1. Sistem uygunluk testlerine göre hareketli faz bileşiminin karşılaştırılması

Hareketli Fazda ACN Yüzdesi	KLO				DİN				BUP			
	t _r (dk)	N	R _S	α	t _r (dk)	N	R _S *	α	t _r (dk)	N	R _S **	α
% 60	4,163	6571	-	-	8,397	7352	14,157	2,448	13,484	7637	10,088	1,71
% 70	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,053	6,697	10862	11,21	1,815
% 75	2,348	6417	-	-	3,316	7866	7,238	1,903	5,078	9272	9,763	1,864
% 80	2,091	6223	-	-	2,706	7588	5,329	1,714	4,006	9553	2,381	1,215
% 85	1,895	5945	-	-	2,268	6993	3,595	1,594	3,214	9186	7,788	1,947
% 90	1,734	5557	-	-	1,94	6223	2,141	1,474	2,604	8456	6,264	2,04
% 95	1,641	5363	-	-	1,75	5506	1,187	1,248	2,23	7729	1,998	1,391

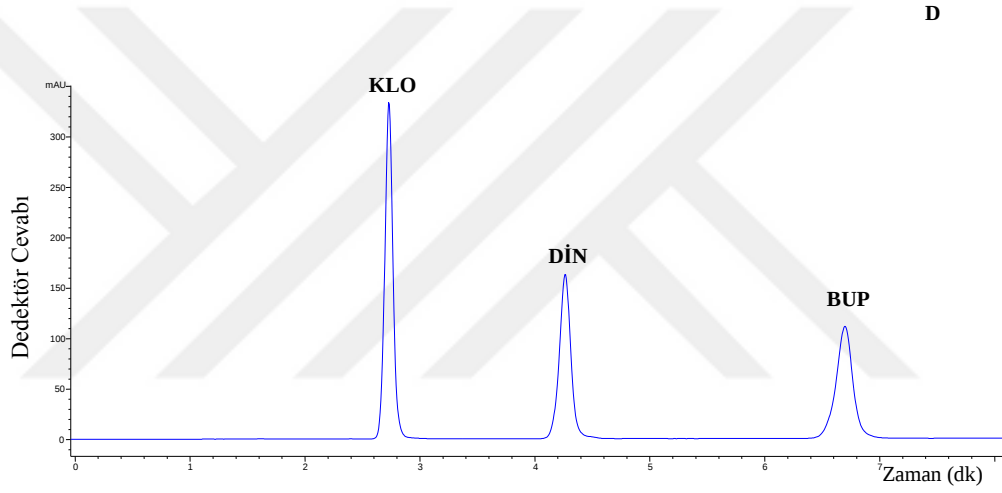
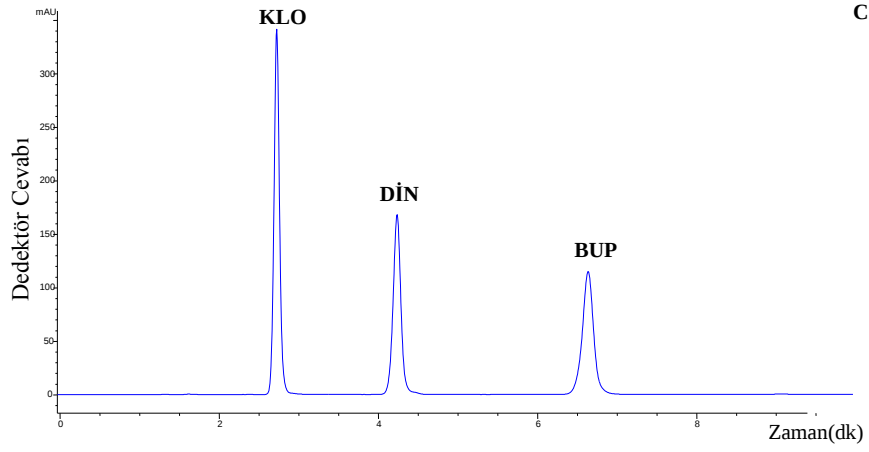
R_S*=KLO-DİN , R_S**=DİN-BUP

3.1.1.2. Tampon Çözelti Molaritesinin Belirlenmesi

Çalışılan pestisitlerin analizleri üzerinde tampon çözeltisinin molaritesinin etkisini incelemek için, mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı, kolon ve akış hızı parametreleri sabit tutulmuş ve amonyum asetat tamponu çözeltisi derişimleri artırarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 5 mM (A), 10 mM (B), 20 mM (C), 40 mM (D), Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.2. (Devamı) Kinetex C₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon – 5 mM (A), 10 mM (B), 20 mM (C), 40 mM (D), Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

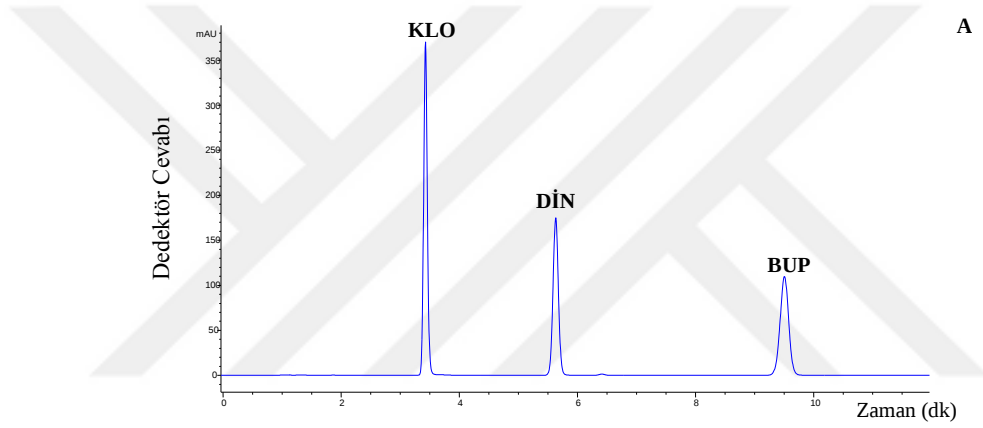
Çizelge 3.2. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti molaritesinin karşılaştırılması

Tampon Çözelti Molaritesi	KLO				DİN				BUP			
	t _r (dk)	N	R _S	α	t _r (dk)	N	R _S *	α	t _r (dk)	N	R _S **	α
5 mM	2,701	8174	-	-	4,211	10740	10,640	2,129	6,599	12655	11,210	1,814
10 mM	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
20 mM	2,718	7880	-	-	4,238	10295	10,480	2,023	6,651	12212	11,816	1,803
40 mM	2,721	7555	-	-	4,234	9727	10,170	8,076	6,363	11603	11,468	2,391

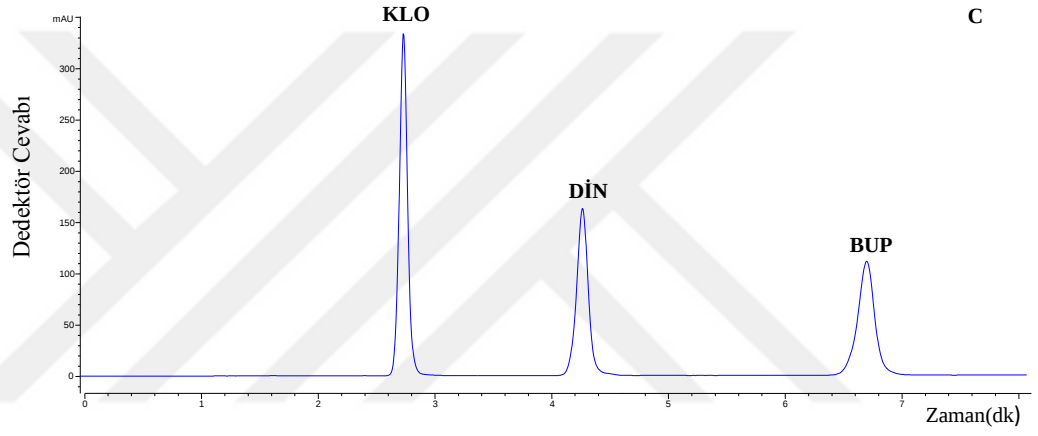
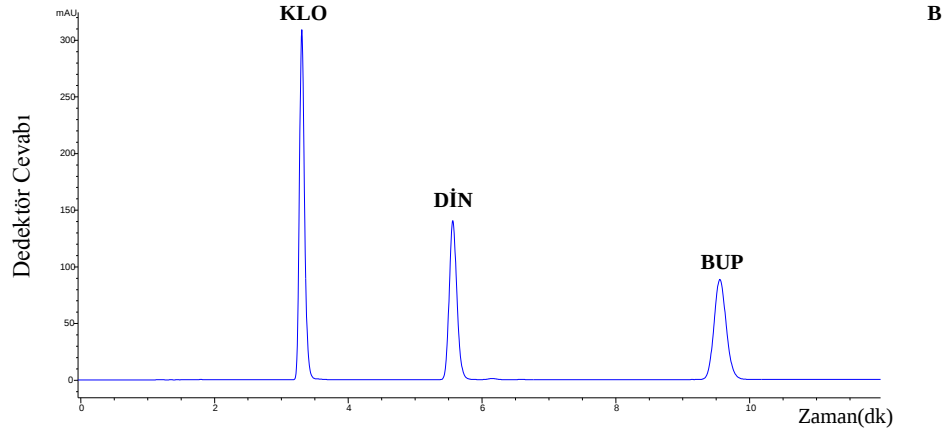
R_S*=KLO-DİN , R_S**=DİN-BUP

3.1.1.3. Uygun kolon (Sabit Fazın) Seçimi

Optimizasyon çalışmalarının bu aşamasında farklı marka ve partikül büyüklüğüne sahip ters faz kolonlarının etkisi incelenmiştir. Hareketli faz bileşimi, tampon çözelti molaritesi, akış hızı, pH ve kolon sıcaklığı sabit tutularak denemeler yapılmıştır.



Şekil 3.3. Super Cosil LC 18 (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) kolon (A), X-Bridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon (B), Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon (C), 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz, : ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.3. (Devamı) Super Cosil LC 18 (150 mm x 4,6 mm x 2,6 µm) kolon (A), X-Bridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon (B), Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon (C), 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz, : ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

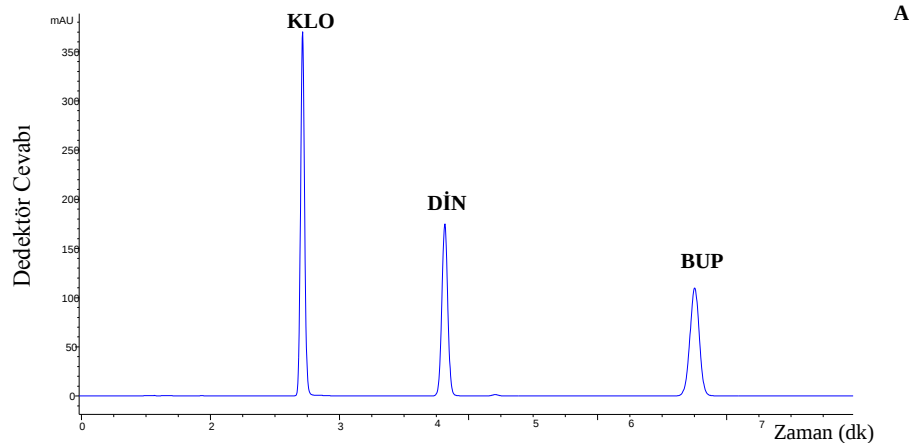
Çizelge 3.3. Sistem uygunluk testlerine göre kolonların karşılaştırılması

Sabit Faz	KLO				DİN				BUP			
	t_r (dk)	N	R_s	α	t_r (dk)	N	R_s^*	α	t_r (dk)	N	R_s^{**}	α
Kinetex C18	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
Super cosil LC 18	3,427	6155	-	-	5,632	5632	15,607	2,166	9,506	10183	10,796	1,904
X Bridge C18	3,304	6252	-	-	5,562	10740	13,020	2,056	9,555	11970	11,638	1,951

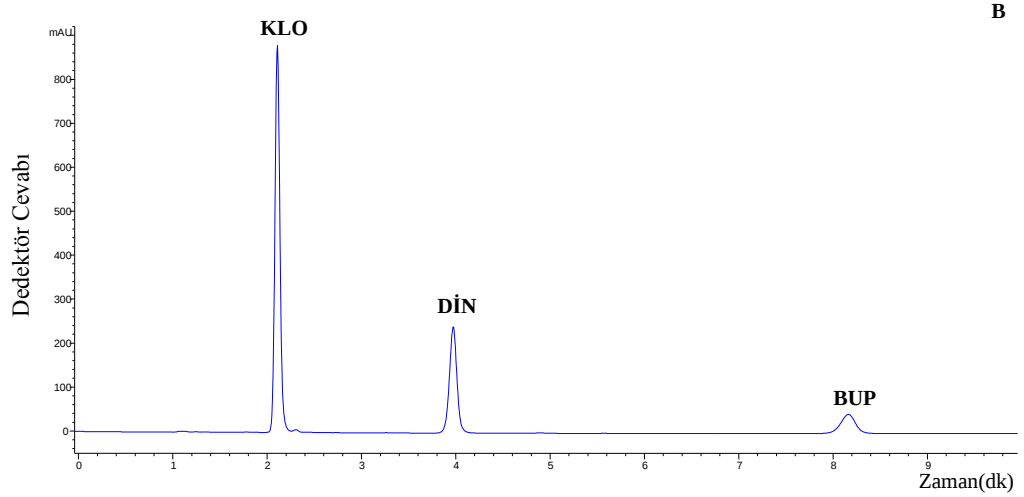
$R_s^*=KLO-DİN$, $R_s^{**}=DİN-BUP$

3.1.1.4. Farklı Tampon Çözeltilerin Analizleri

Daha önceki çalışmalarda tampon çözelti olarak amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Optimum koşulların belirlenmesinde tampon çözelti türünün analiz sonuçlarına etkisini incelemek için tüm deneysel parametreler sabit tutularak amonyum asetat ve sodyum asetat tampon çözeltileri ile analizler yapılmıştır.



Şekil 3.4. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (A), 10 mM sodyum asetat (B) (70/30;h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.4. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (A), 10 mM sodyum asetat (B) (70/30;h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

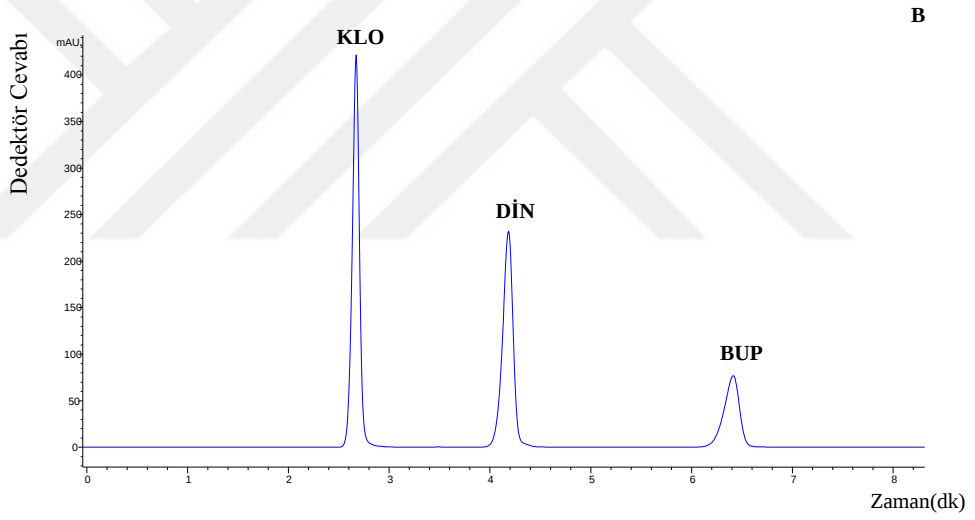
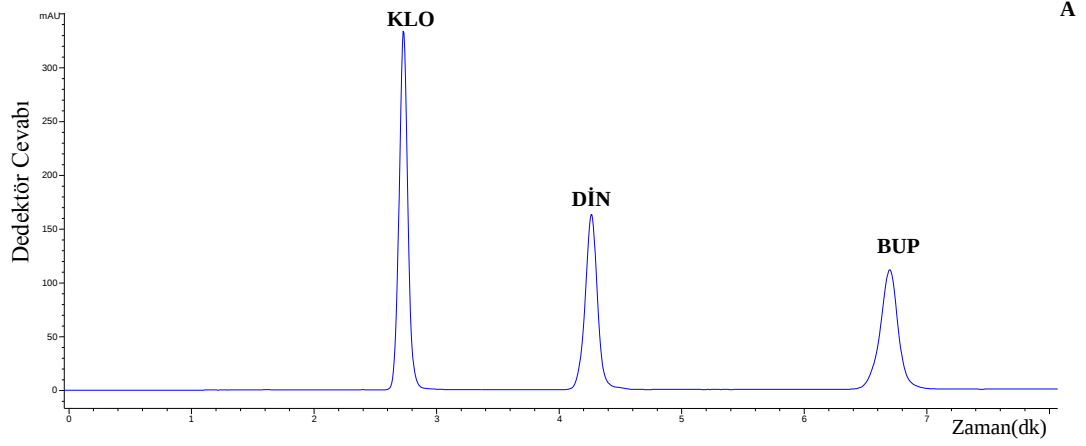
Çizelge 3.4. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti türlerinin karşılaştırılması

Tampon Çözelti	KLO				DİN				BUP			
	t _r (dk)	N	R _s	α	t _r (dk)	N	R _s *	α	t _r (dk)	N	R _s **	α
Amonyum asetat	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
Sodyum asetat	2,108	6773	-	-	3,888	8798	6,892	1,156	8,163	10291	9,747	2.341

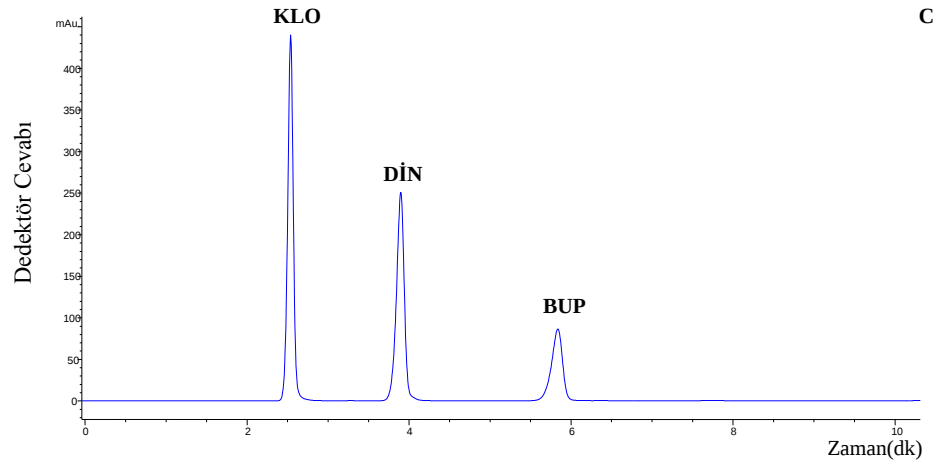
R_s*=KLO-DİN , R_s**=DİN-BUP

3.1.1.5. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum kolon sıcaklığın belirlenmesi için kolon sıcaklığı 25°C, 35°C ve 45°C yapılarak analiz sonuçları karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.5. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 25°C (A), 35°C (B), 45°C (C) 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.5. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 25°C (A), 35°C (B), 45°C (C) 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

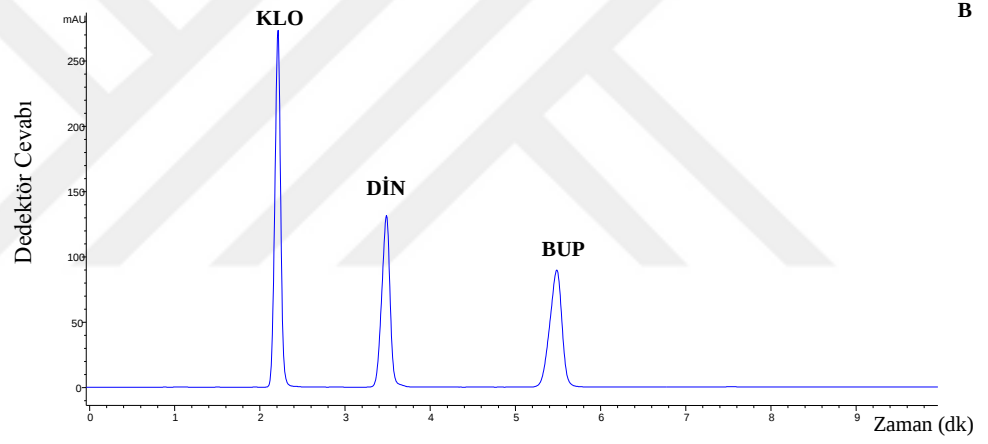
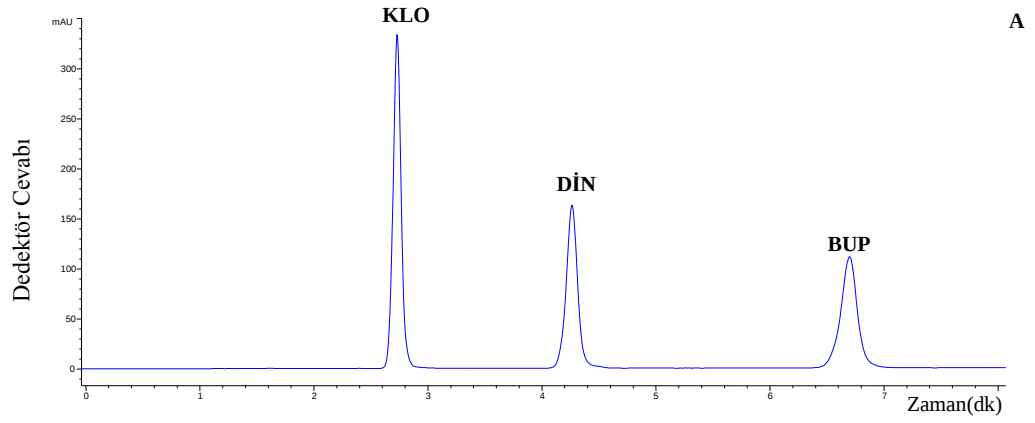
Çizelge 3.5. Sistem uygunluk testlerine göre kolon sıcaklıklarının karşılaştırılması

Sıcaklık	KLO				DİN				BUP			
	t _r (dk)	N	R _s	α	t _r (dk)	N	R _s *	α	t _r (dk)	N	R _s **	α
25 °C	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
35 °C	2.672	6838	-	-	4.184	7970	5.204	1.446	6.412	8657	9.551	4.146
45 °C	2.538	6782	-	-	3.879	8261	5.431	1.439	5.836	9164	9.307	3.685

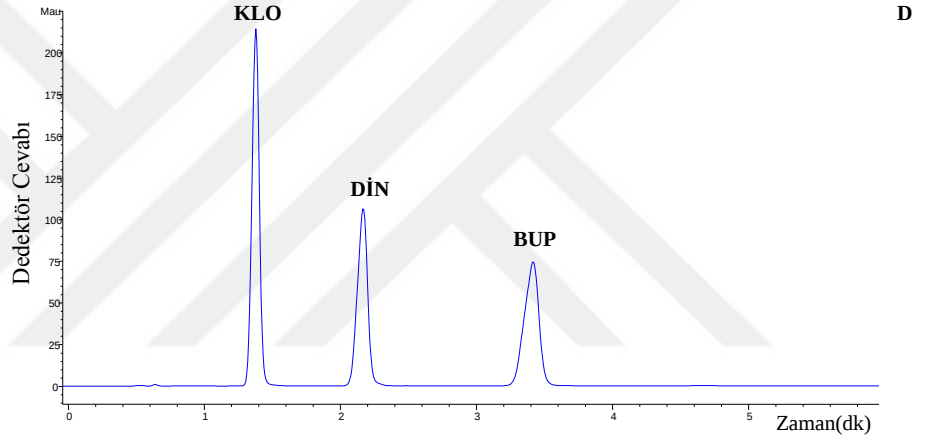
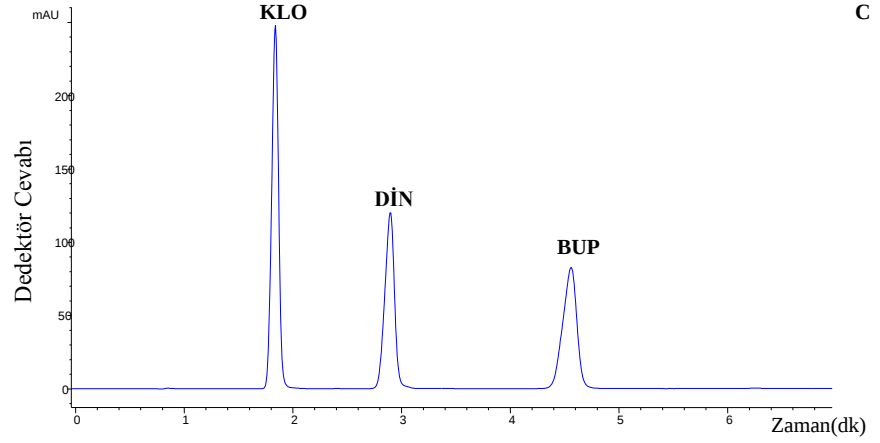
R_s*=KLO-DİN , R_s**=DİN-BUP

3.1.1.6. Akış Hızı Optimizasyonu

Sabit faz seçim çalışmaları sonucunda, Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon ile 1 mL dk⁻¹ akış hızında diğer kolonlardan daha düşük bir basınç değeri gözlenmiştir. Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonda akış hızı denemeleri yapılarak sistem uygunluk test parametreleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 1 mL dk⁻¹ (A), 1.25 mL dk⁻¹ (B), 1.5 mL dk⁻¹ (C), 2 mL dk⁻¹ (D) akış hızı, pH:6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.6. (Devamı) Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 1 mL dk⁻¹ (A), 1.25 mL dk⁻¹ (B), 1.5 mL dk⁻¹ (C), 2 mL dk⁻¹ (D) akış hızı, pH:6.54, 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon-10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

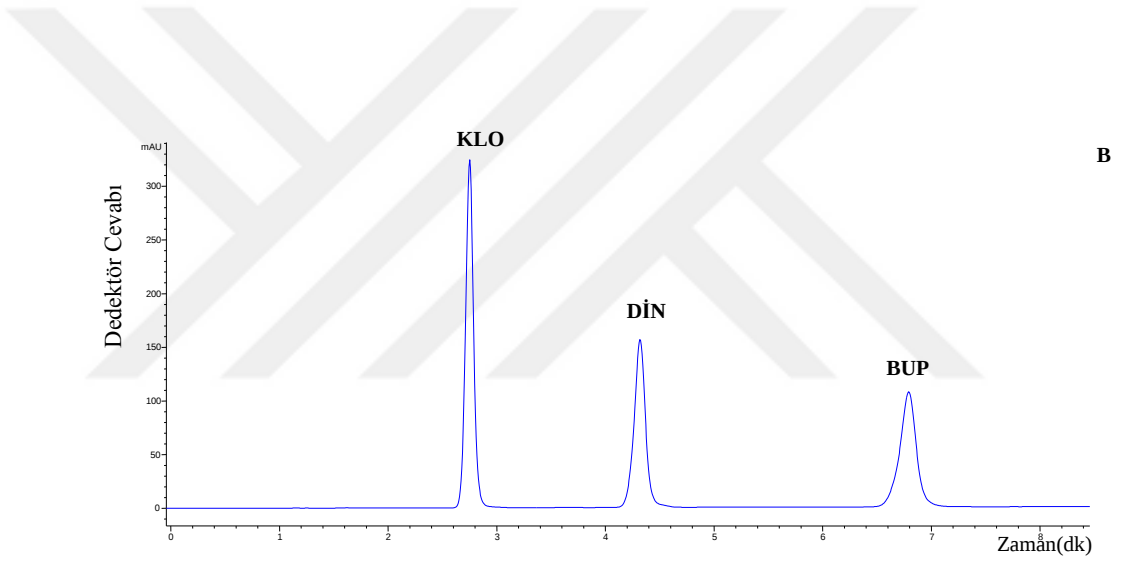
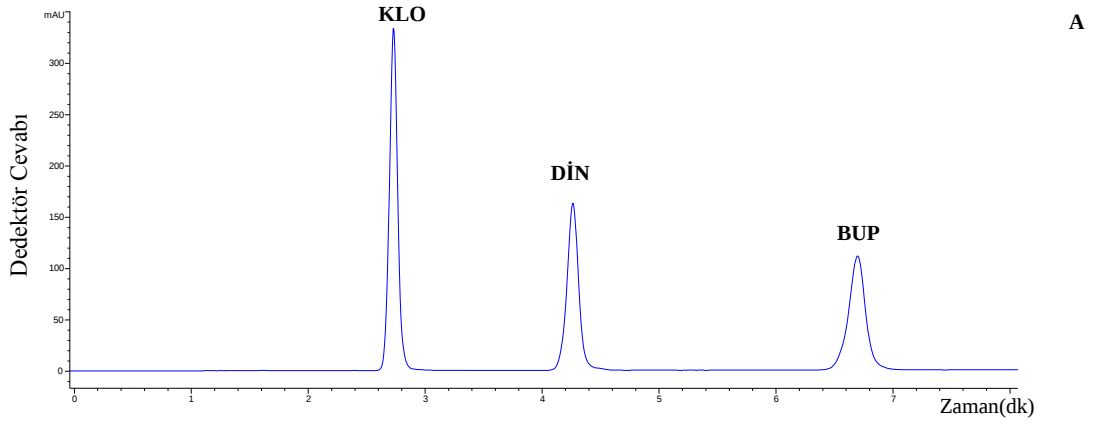
Çizelge 3.6. Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması

Akış hızı	KLO				DİN				BUP			
	t_r (dk)	N	R_s	α	t_r (dk)	N	R_s^*	α	t_r (dk)	N	R_s^{**}	α
1 mL dk ⁻¹	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
1,25 mL dk ⁻¹	2,212	4960	-	-	3,486	6110	8,364	2,408	5,486	6912	9,030	1,804
1,5 mL dk ⁻¹	1,838	3898	-	-	2,896	4986	7,529	2,031	4,559	5738	8,188	1,789
2 mL dk ⁻¹	1,378	2912	-	-	2,167	3802	6,493	2,027	3,416	4455	7,222	1,801

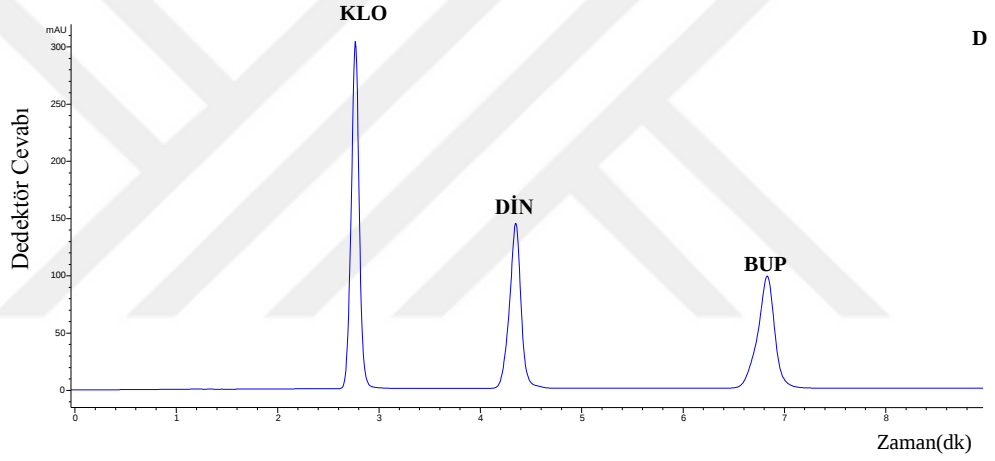
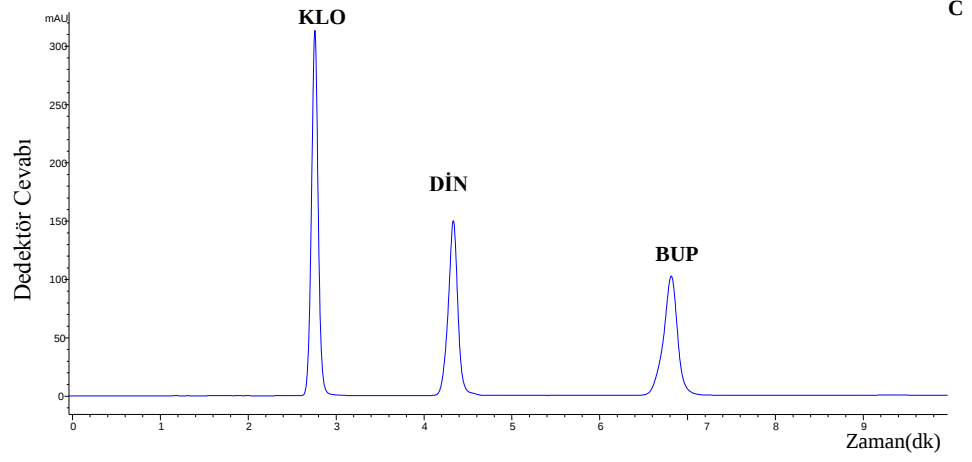
$R_s^*=KLO-DİN$, $R_s^{**}=DİN-BUP$

3.1.1.7. Tampon Çözeltilerin pH'sını Belirleme Çalışmaları

Tampon çözelti, kolon, akış hızı ve sıcaklık çalışmalarından sonra tampon çözeltinin pH'sının analiz üzerindeki etkisini görmek için tampon çözeltinin pH'sı asetik asit ile 5.5, 4.5 ve 3.5'e ayarlanmış ve incelenmiştir.



Şekil 3.7. Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54 (A), pH: 5.5 (B), pH: 4.5 (C), pH: 3.5 (D), 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.7. (Devamı) Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6.54 (A), pH: 5.5 (B), pH: 4.5 (C), pH: 3.5 (D), 254 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 10 mM Amonyum asetat (70/30; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.7. Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması

pH	KLO				DİN				BUP			
	t_r (dk)	N	R_s	α	t_r (dk)	N	R_s^*	α	t_r (dk)	N	R_s^{**}	α
6,54	2,729	7266	-	-	4,264	9319	10,053	2,056	6,697	10892	11,004	1,815
5,50	2,750	6921	-	-	4,319	8805	9,901	2,064	6,791	10558	11,030	1,812
4,50	2,759	6581	-	-	4,334	8271	9,629	2,068	6,814	9883	10,705	1,813
3,50	2,766	6139	-	-	4,349	7700	9,308	2,072	6,831	9306	10,290	1,811

$R_s^*=KLO-DİN$, $R_s^{**}=DİN-BUP$

Optimizasyon çalışmaları sonucu optimize edilen koşullar Çizelge 3.8’ de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Optimize edilen koşullar

Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon	Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)
Hareketli faz bileşimi	ACN: Tampon- 10mM Amonyum asetat (75/25; h/h)
pH	6,54
Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	25
Akış hızı (mL dk $^{-1}$)	1
Enjeksiyon hacmi (μ L)	10
Dalga boyu (nm)	254

3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

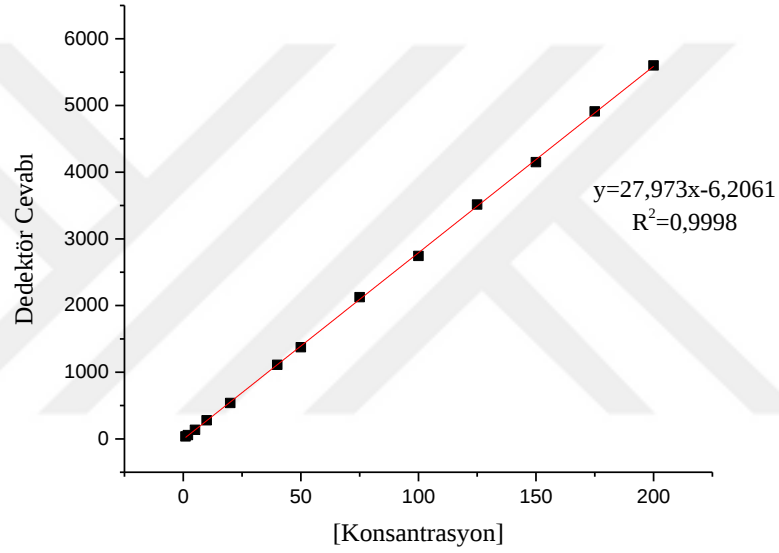
Geliştirilen YBSK yöntemi için optimize edilen koşullarda SUT parametreleri hesaplanmış ve çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. SUT parametreleri

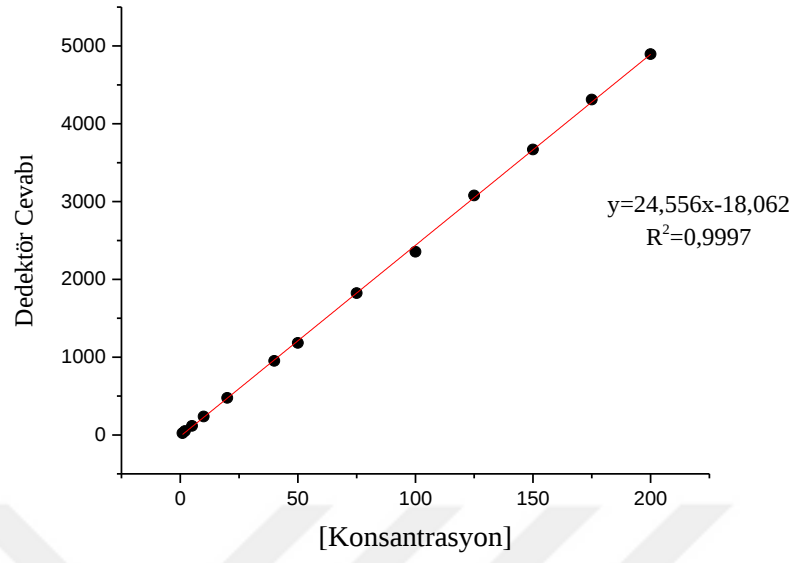
Parametre	KLO	DİN	BUP
Alıkonma zamanı (t_R)	2,348	3,316	5,078
Kapasite faktörü (k)	0,87	0,96	1,04
Ayırım Gücü (R_s)	-	7,238	9,763
Kolon etkinliği (N; tabaka/metre)	6417	7866	9272
Seçicilik (α)	-	1,903	1,864
Kuyruklanma faktörü (t)	0,946	1,014	1,091

3.1.3. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

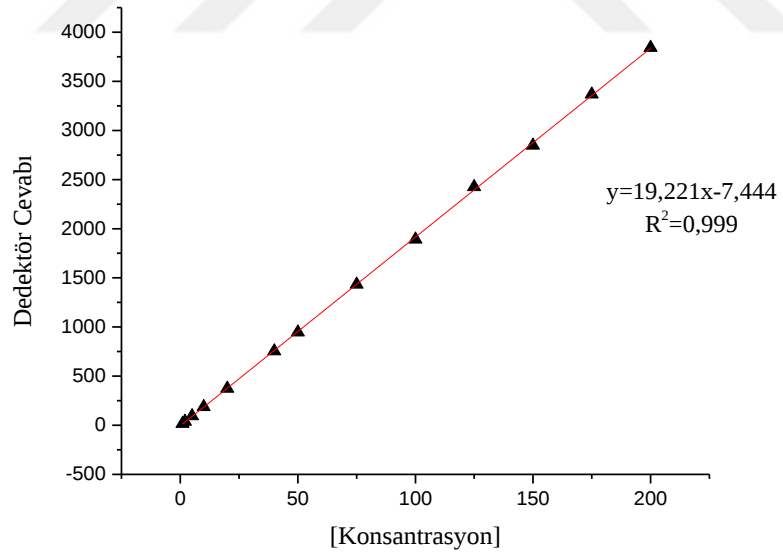
Tez çalışmasının bu aşamasında her bir pestisit artan konsantrasyonlarda (1, 2, 5, 10, 20, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) hazırlanarak 5 tekrarlı olarak sisteme enjekte edilmiştir. Konsantrasyona karşılık tekrarlı sonuçlardan elde edilen ortalama pik alanları grafiğe geçirilerek her bir madde için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve validasyon parametreleri hesaplanmıştır.



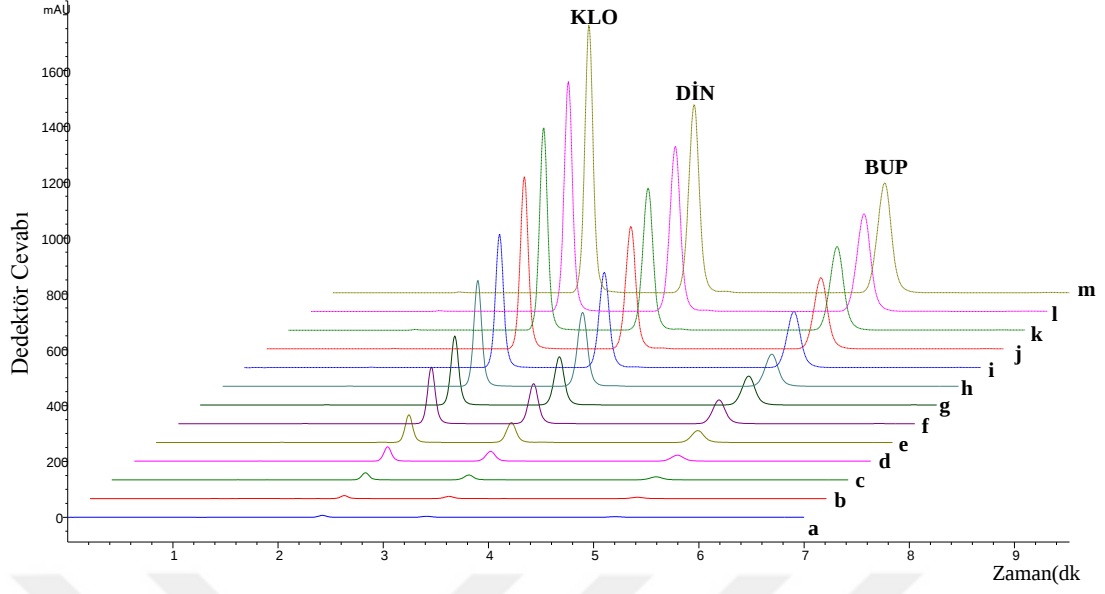
Şekil 3.8. KLO için kalibrasyon eğrisi



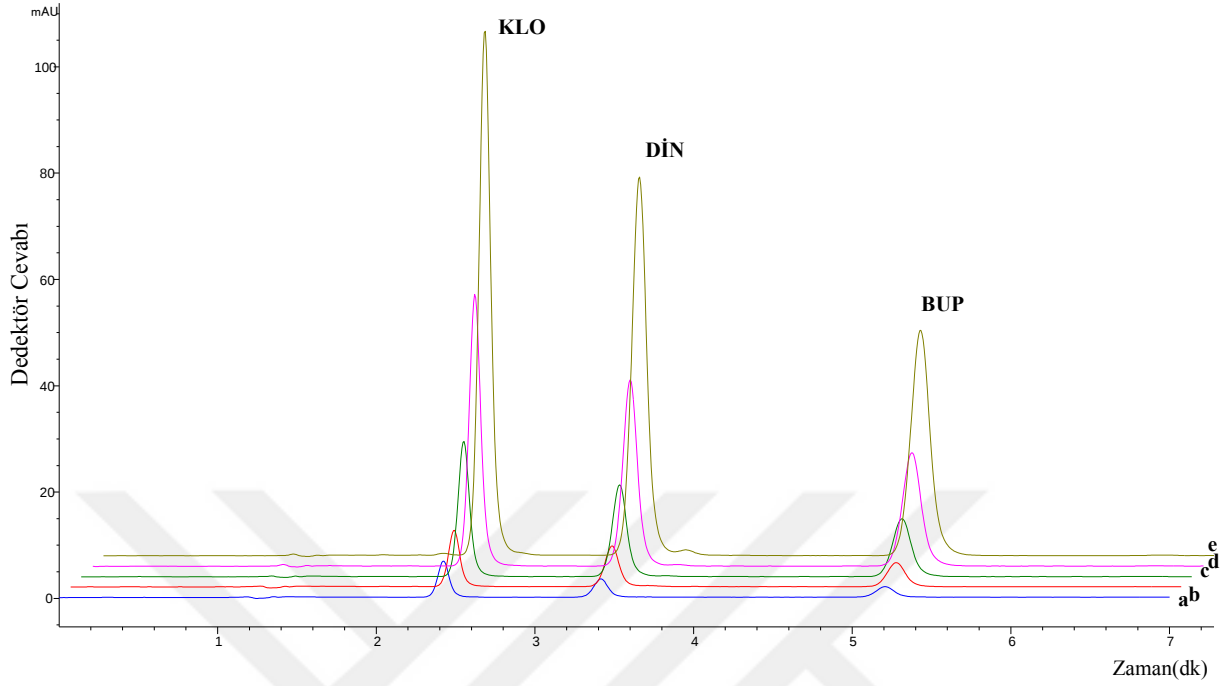
Şekil 3.9. DİN için kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.10. BUP için kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.11. Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla KLO, DİN ve BUP için 1 (a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 20 (e), 40 (f), 50 (g), 75 (h), 100 (i), 125 (j), 150 (k), 175 (l), 200 (m) $\mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.12. Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla KLO, DİN ve BUP için 1 (a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 20 (e) $\mu\text{g mL}^{-1}$

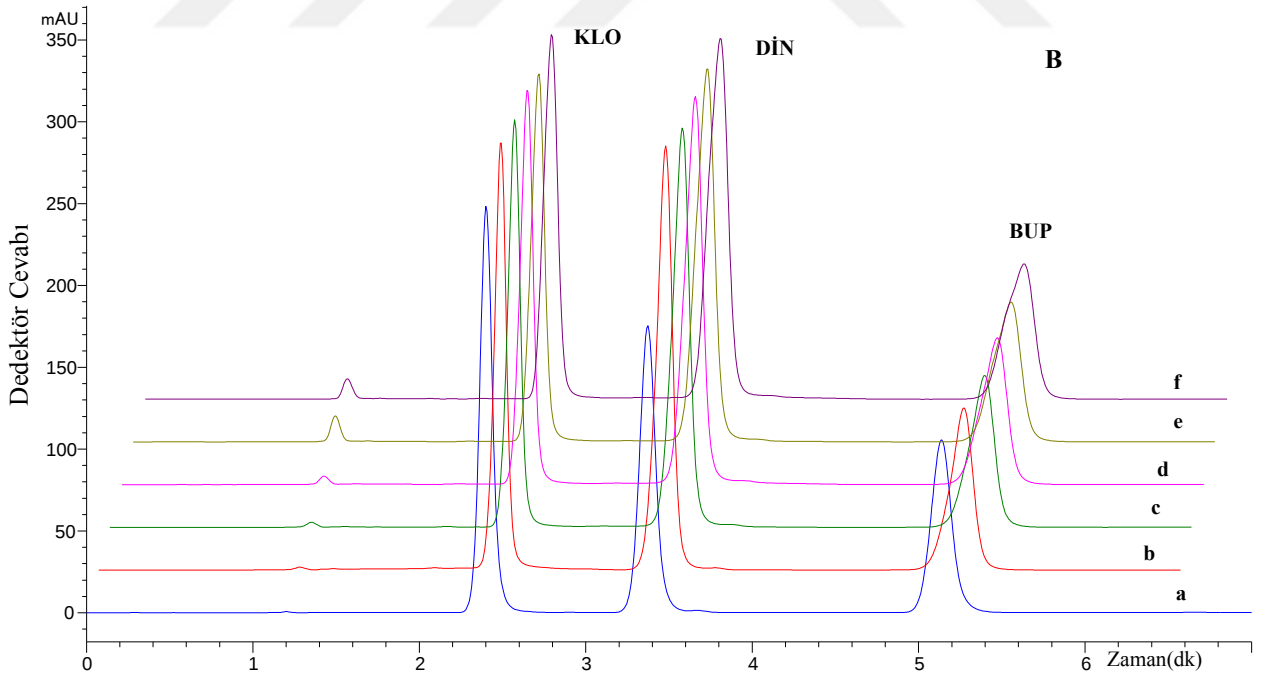
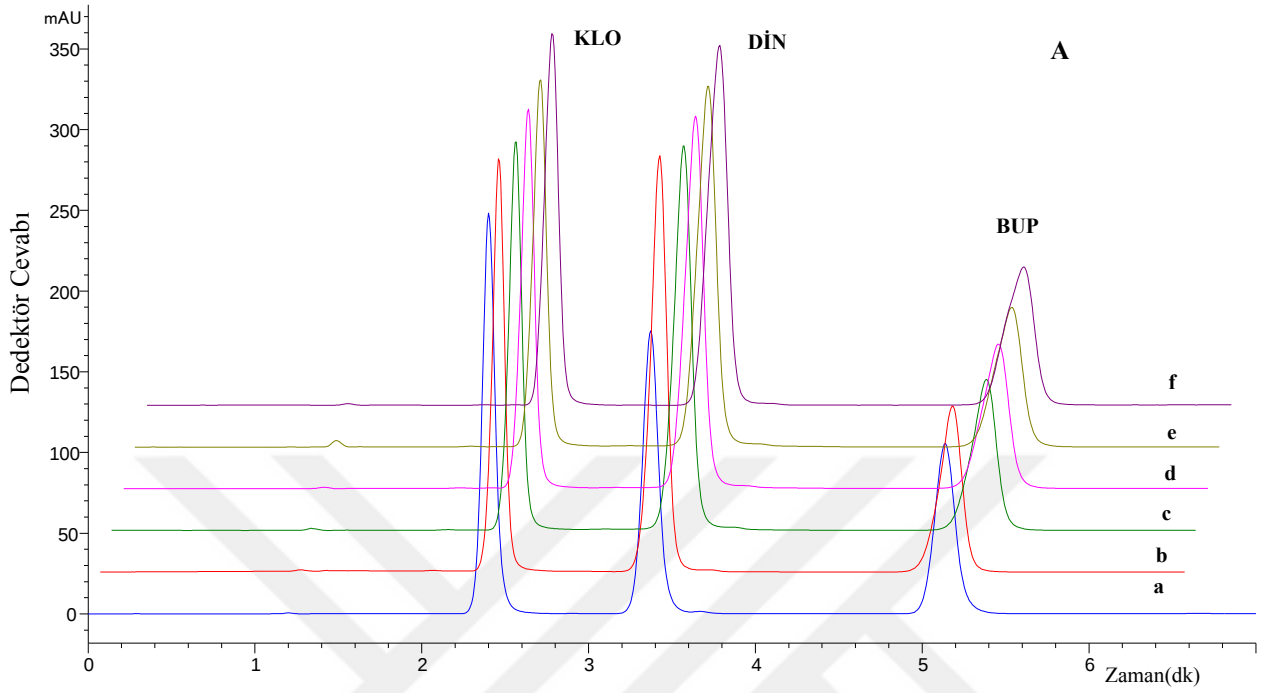
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri

Validasyon Parametresi	KLO	DİN	BUP
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1-200	1-200	1-200
Eğim	27,973	24,556	19,221
Kesişim	-6,20621	-18,062	-7,4444
Korelasyon katsayısı	0.9998	0.9997	0.9999
Eğimin standart hatası	0,104	0,126	0,063
Kesişimin standart hatası	10,339	12,543	6,265
**Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,027	0,042	0,051
***Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,080	0,126	0,153
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,394	0,697	0,808
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS)*	1,161	0,977	0,985

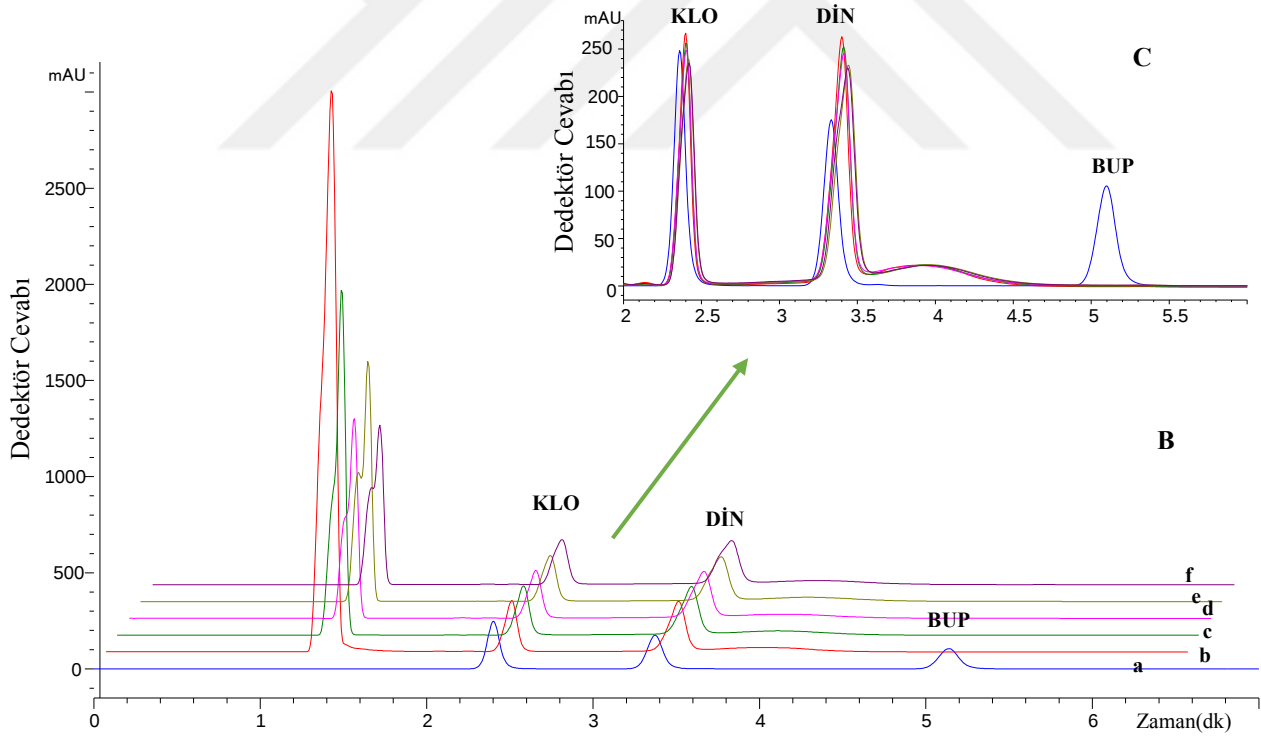
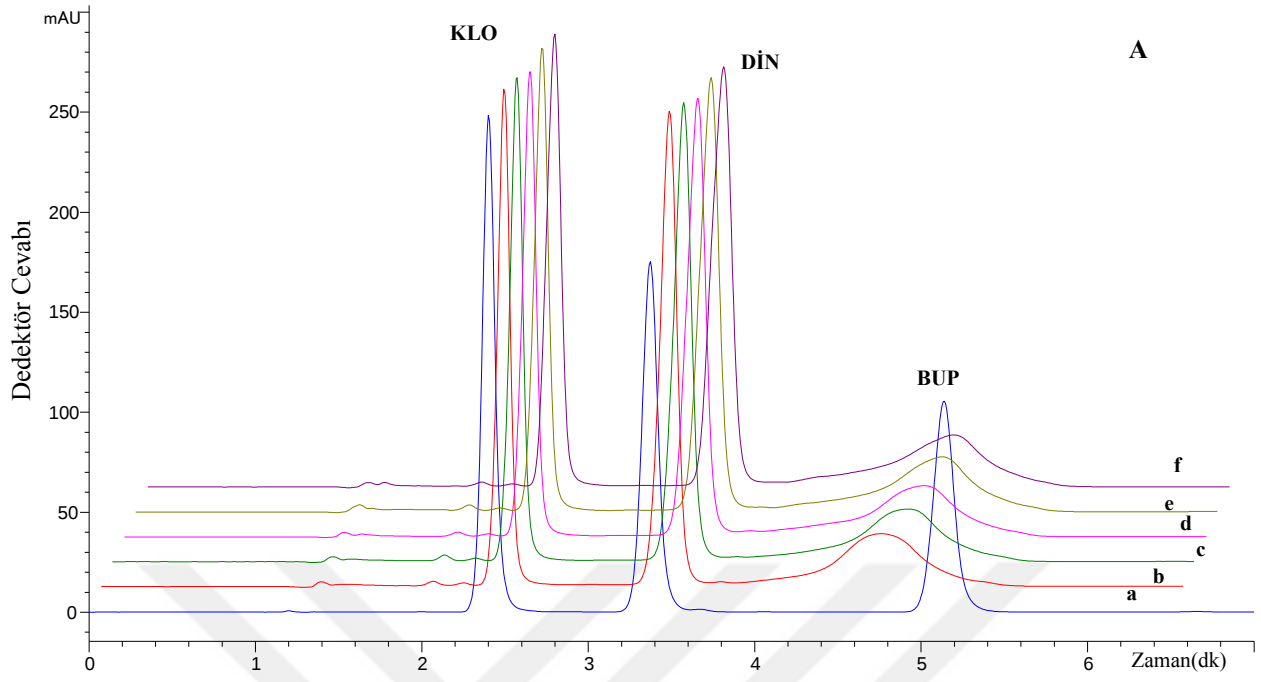
*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır, ** $TS = \frac{3,3 \times s}{m}$, *** $TAS = \frac{10 \times s}{m}$

3.1.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar

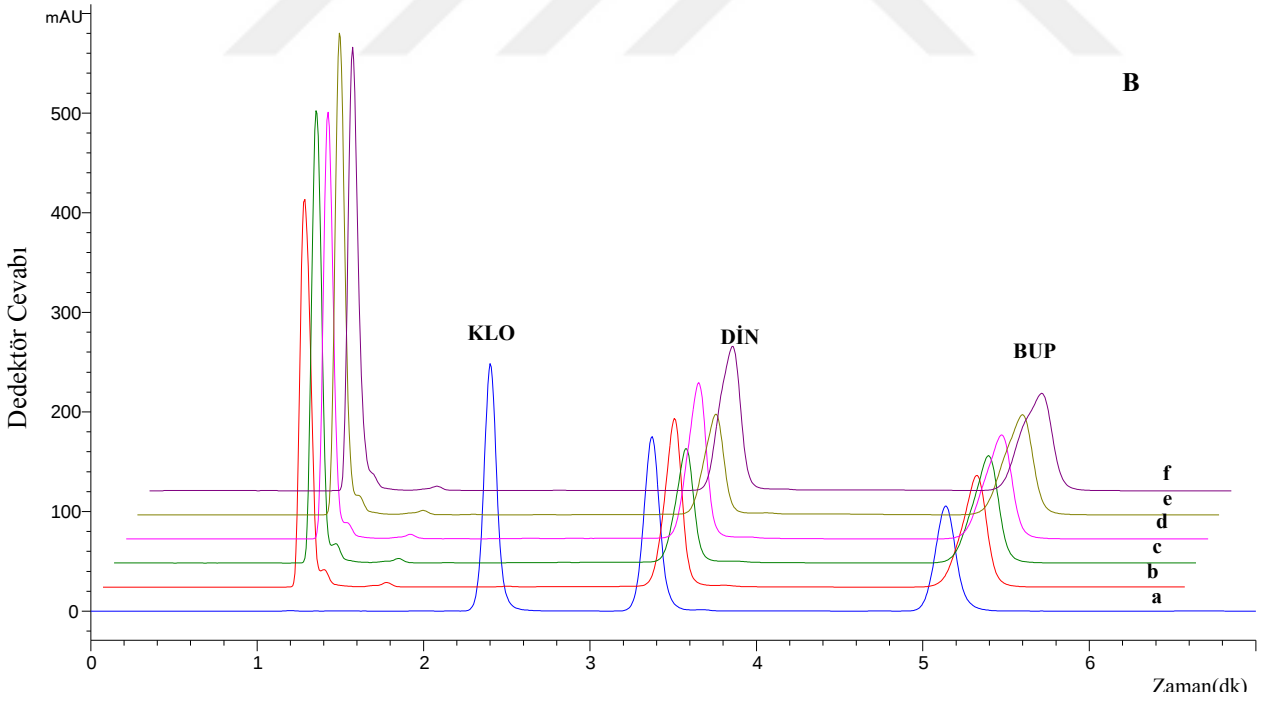
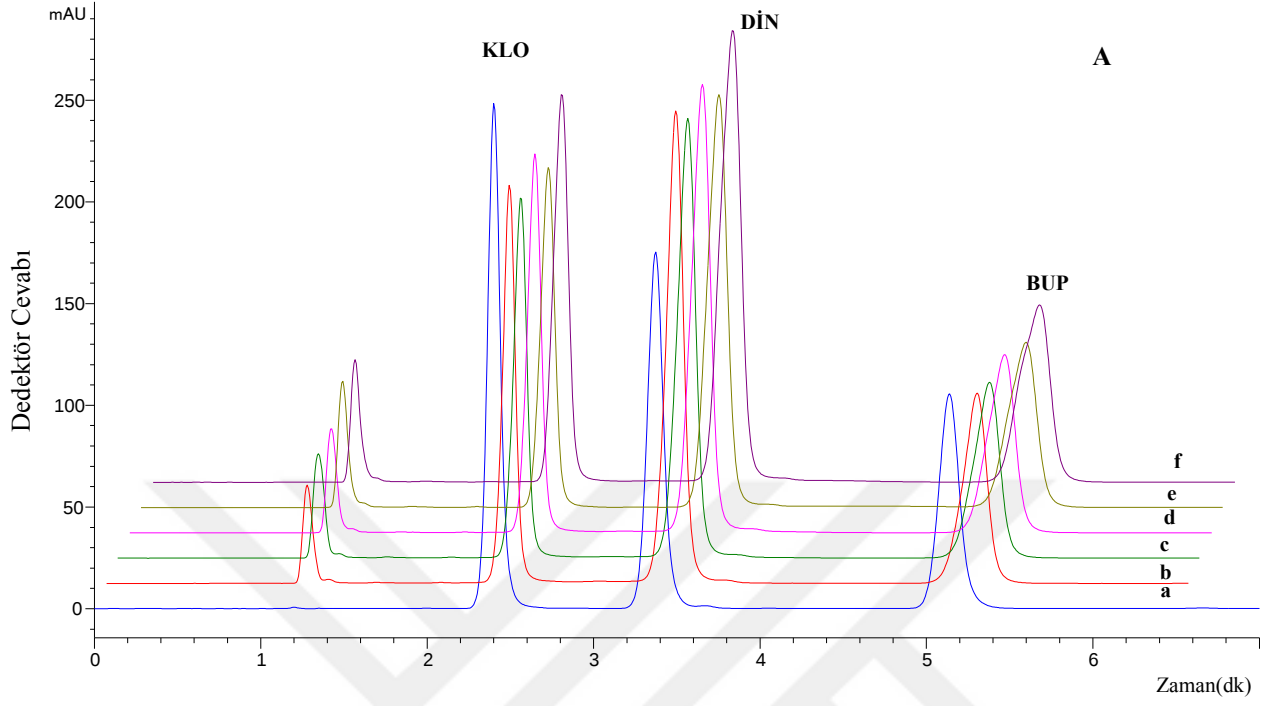
Kalibrasyon çalışmalarından sonra pestisitlerin hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Bozundurma çalışmaları pestisitler belirli koşullara tabi tutularak yapılmıştır. Bu koşullar 0,1 N ve 1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 N ve 1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3 ve % 3'lük H₂O₂ ile oksidasyon, toz maddenin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi, toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesidir. Sonuçlar bozundurulmamış 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışım çözeltisi ile karşılaştırılmış ve yüzde bozunma olarak hesaplanmıştır. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları sonucunda saf maddelerin bozunduğu görülmüştür.



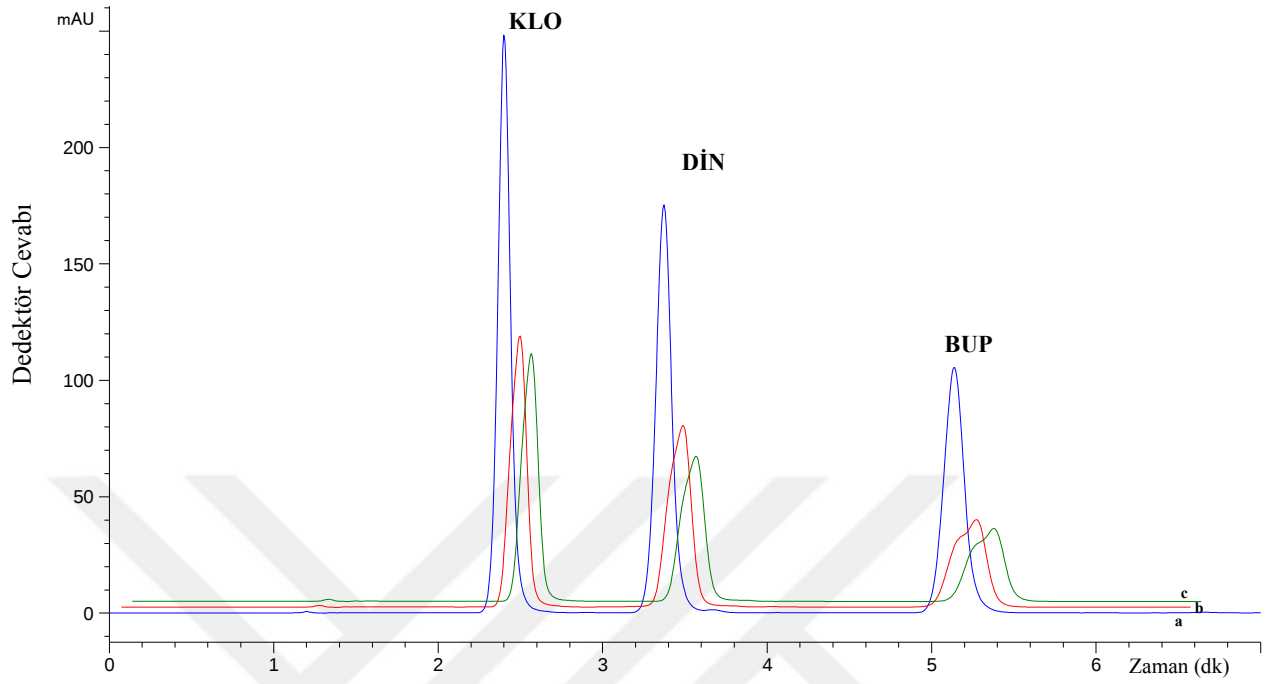
Şekil 3.13. Bozundurma koşulları: % 0,3' lük H_2O_2 (A), ve % 3' lük H_2O_2 (B) ile oksidasyon çalışmaları Standart maddenin (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat (d), 12 saat (e), 24 saat (f) analizlerine ait kromatogramlar



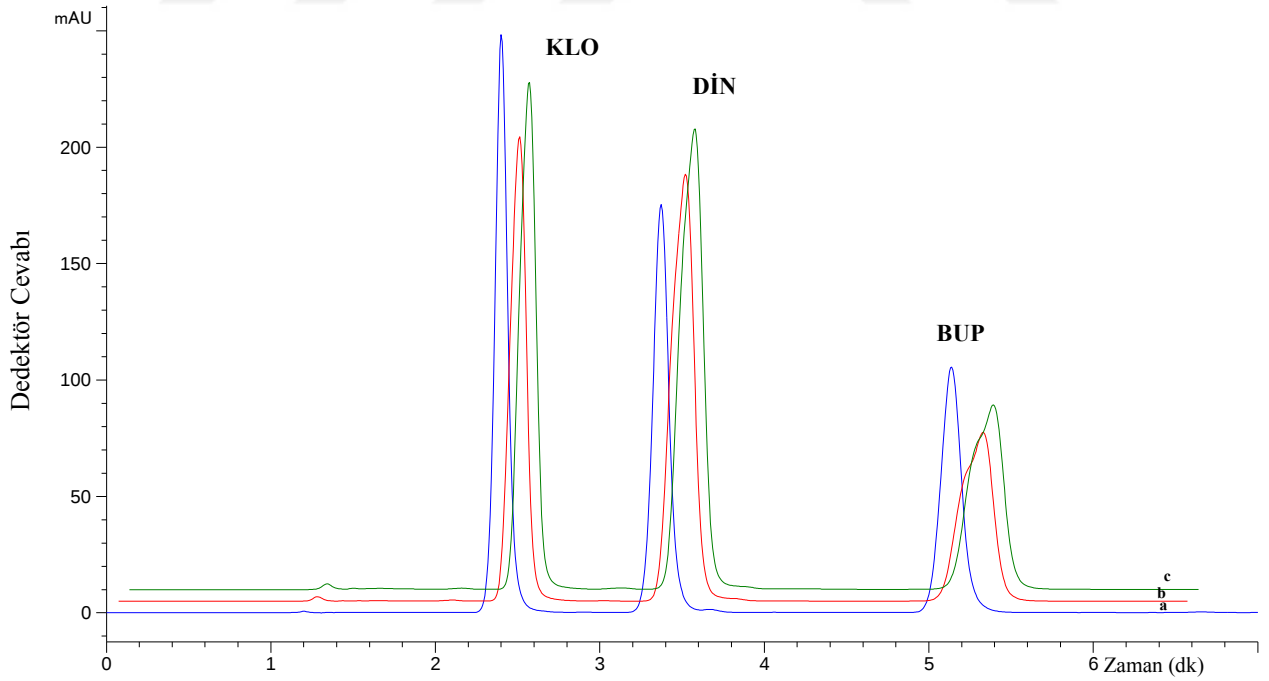
Şekil 3.14. Bozundurma koşulları: 0,1 N HCl (A), 1 N HCl (B) ve 1 N HCl (C) ile asit hidrolizi, referans kromatogram (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat (d), 12 saat (e), 24 saat (f) analizlerine ait kromatogramlar



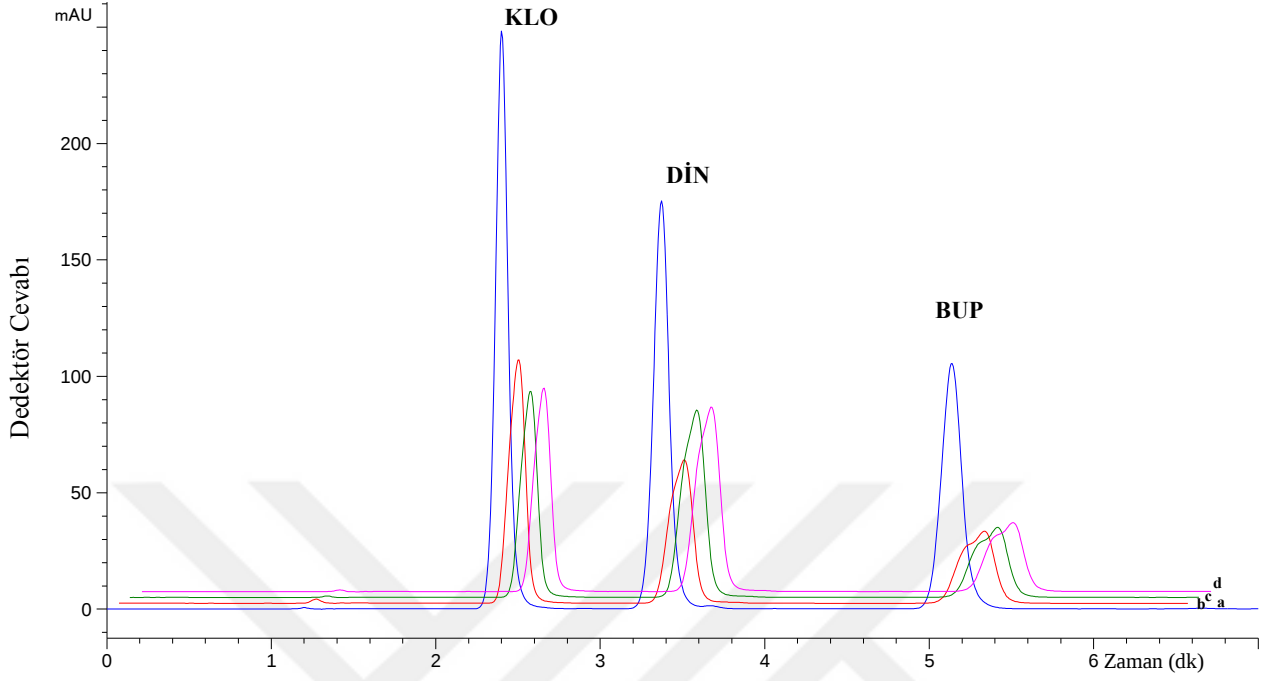
Şekil 3.15. Bozundurma koşulları: 0,1 N NaOH (A) ve 1 N NaOH (B) baz hidrolizi, referans kromatogram (a), 3 saat (b), 6 saat (c), 9 saat (d), 12 saat (e), 24 saat (f) analizlerine ait kromatogramlar



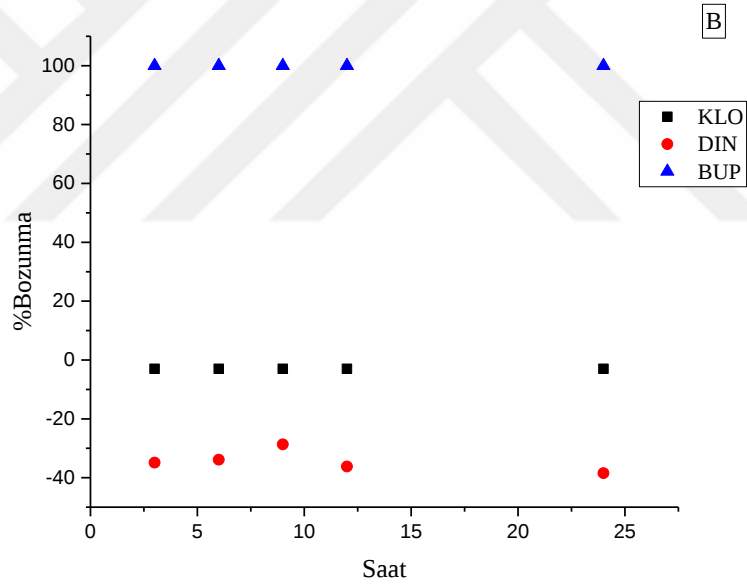
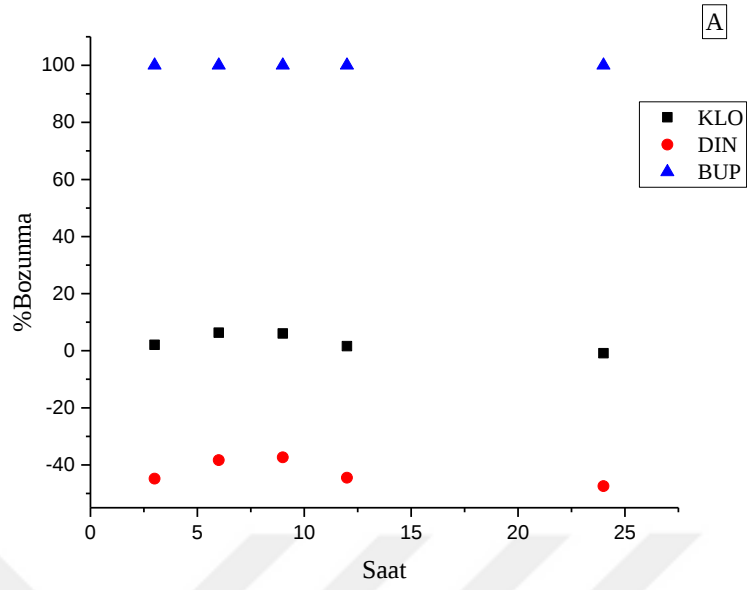
Şekil 3.16. Bozundurma koşulları: referans kromatogram (a), 6 saat UV ışık altında bekletme (b), 9 saat UV ışık altında bekletme (c), analizlerine ait kromatogramlar



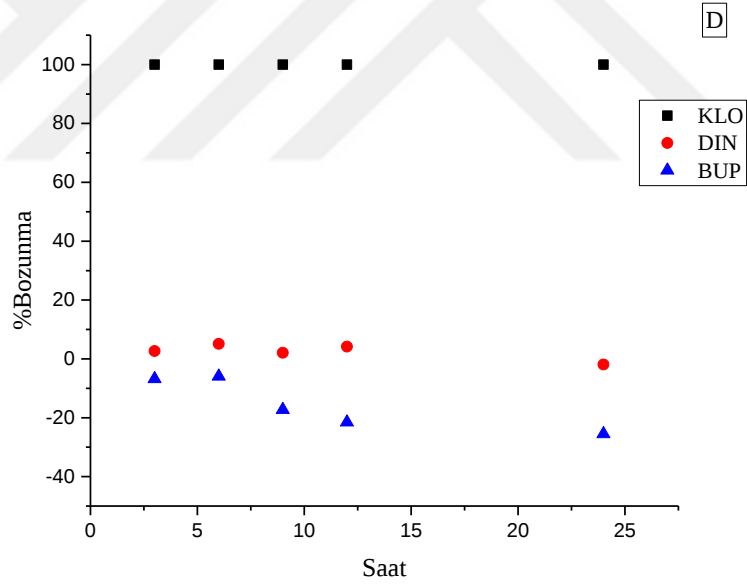
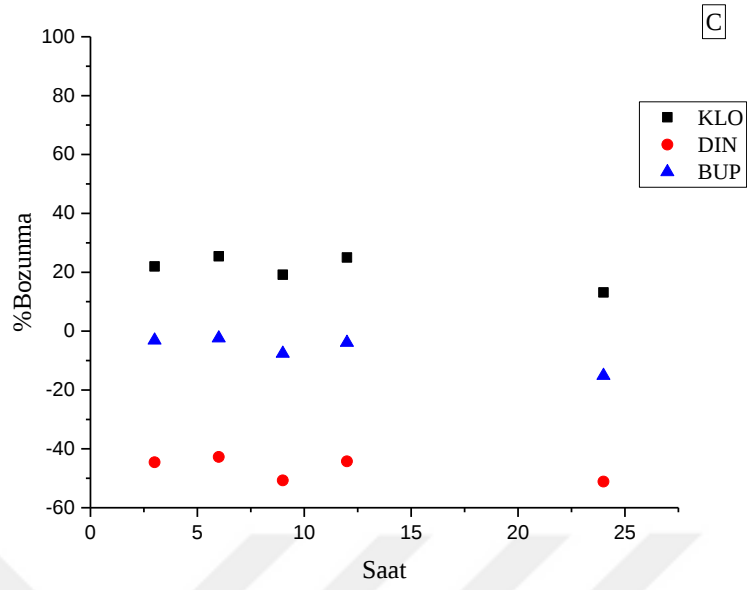
Şekil 3.17. Bozundurma koşulları: Referans kromatogram (a), 1 saat sıcak su banyosunda bekletme (b), 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (c) analizlerine ait kromatogramlar.



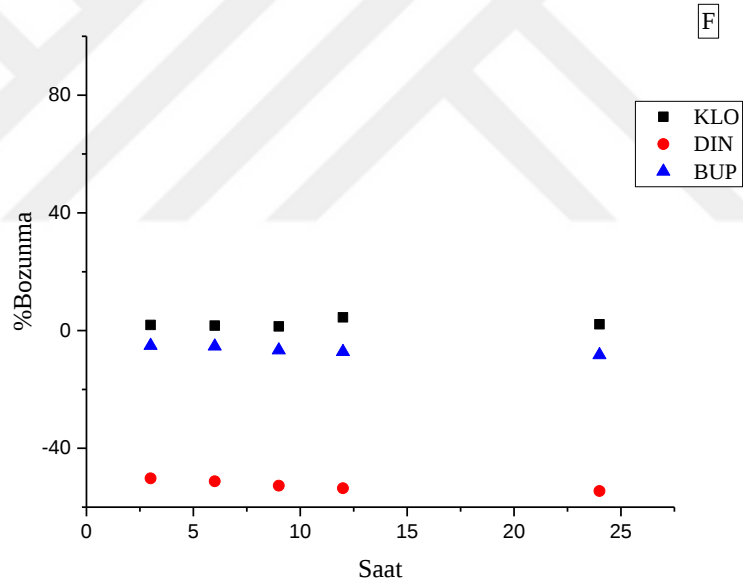
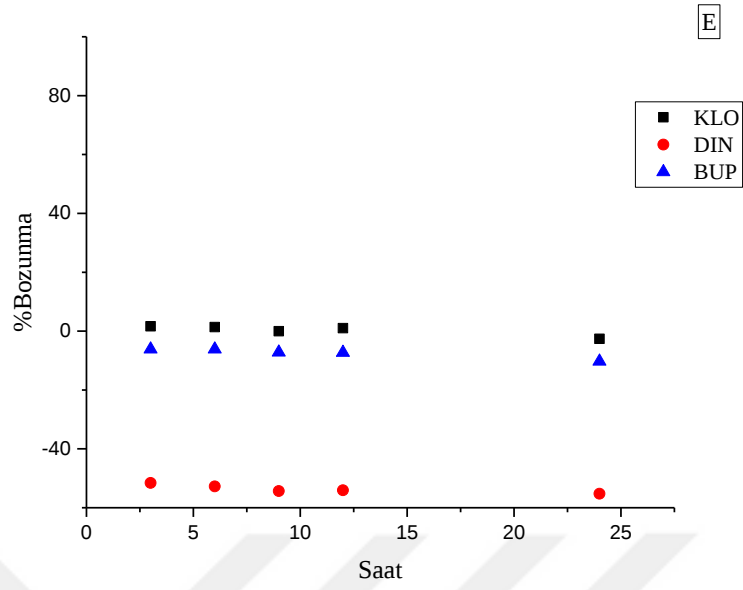
Şekil 3.18. Bozundurma koşulları: Referans kromatogram (a), 1 saat etüvde bekletme (b), 3 saat etüvde bekletme (c), 6 saat etüvde bekletme (d), analizlerine ait kromatogramlar.



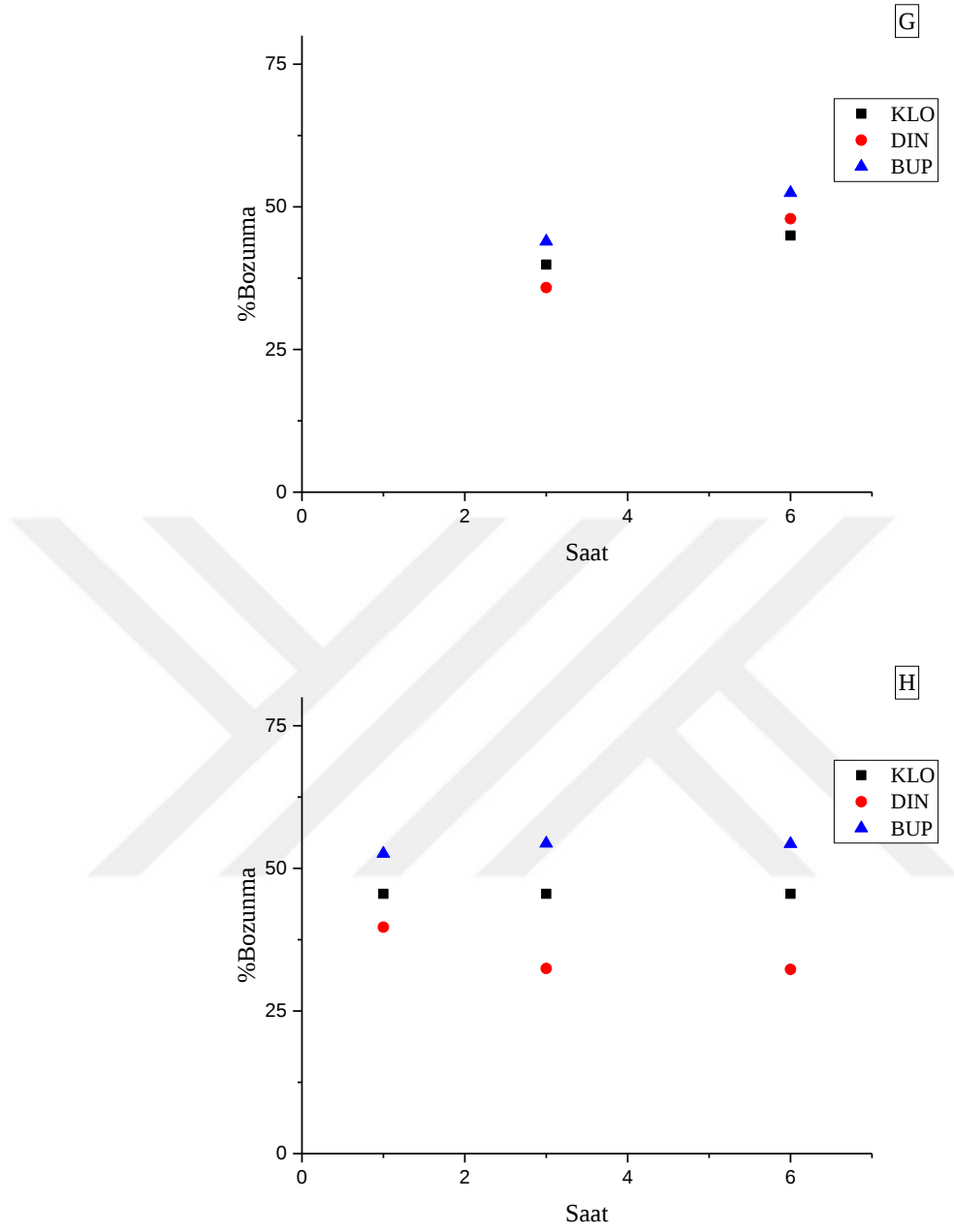
Şekil 3.19. Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I)



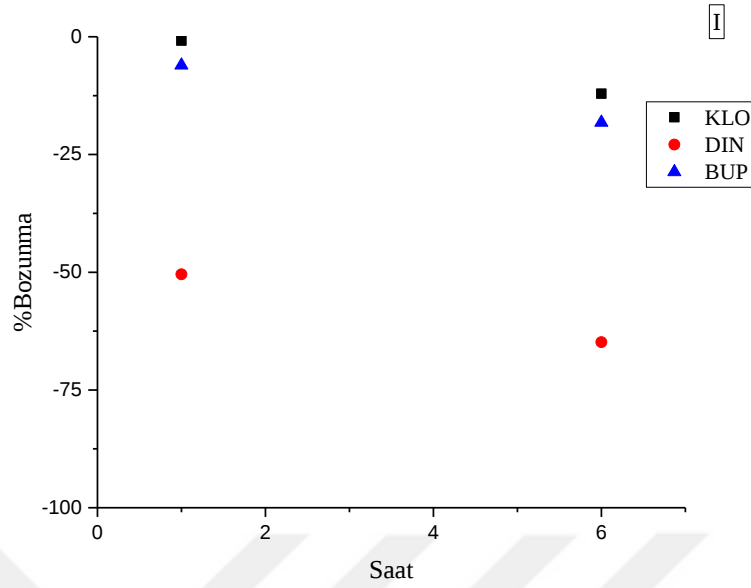
Şekil 3.19. (Devamı) Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I)



Şekil 3.19. (Devamı) Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I)



Şekil 3.19. (Devamı) Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I)

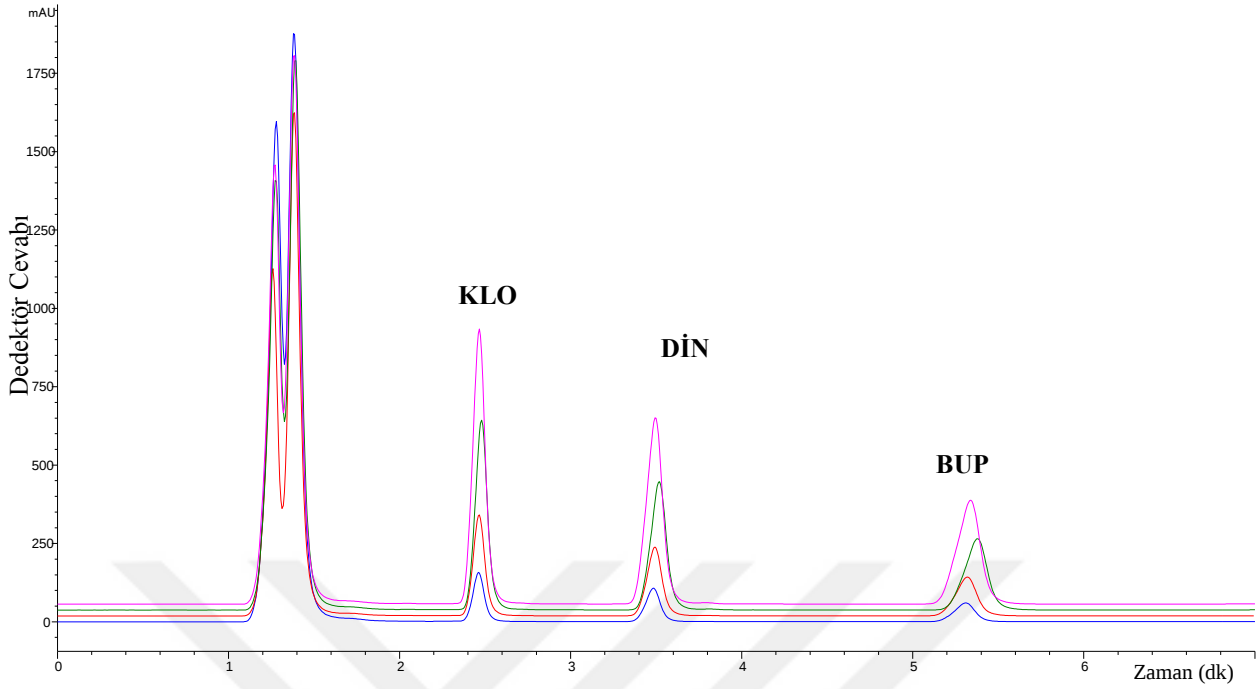


Şekil 3.19. (Devamı) Bozunma çalışmalarına ait yüzde bozunma grafikleri 0,1 N HCl (A) ve 1 N HCl (B) ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH (C) ve 1 N NaOH (D) ile baz hidrolizi, % 0,3 H₂O₂ (E) ve % 3'lük H₂O₂ (F) ile oksidasyon, toz maddelerin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi (G), toz maddenin 60 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi (H) ve 50 µg mL⁻¹ KLO, DİN, ve BUP karışımının 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesi (I)

3.1.4.1. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Yöntem optimizasyonu ve validasyonu yapıldıktan sonra yöntemin doğruluğunu göstermek için idrar, içme suyu, atık su, çeşme suyu, domates, toprak ve zirai ilaç numuneleri ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar standart maddelerin kalibrasyon denklemlerinde yerlerine yerleştirilerek % geri kazanım cinsinden hesaplanmıştır.

İdrar numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.20 ve Çizelge 3.11'de verilmiştir.



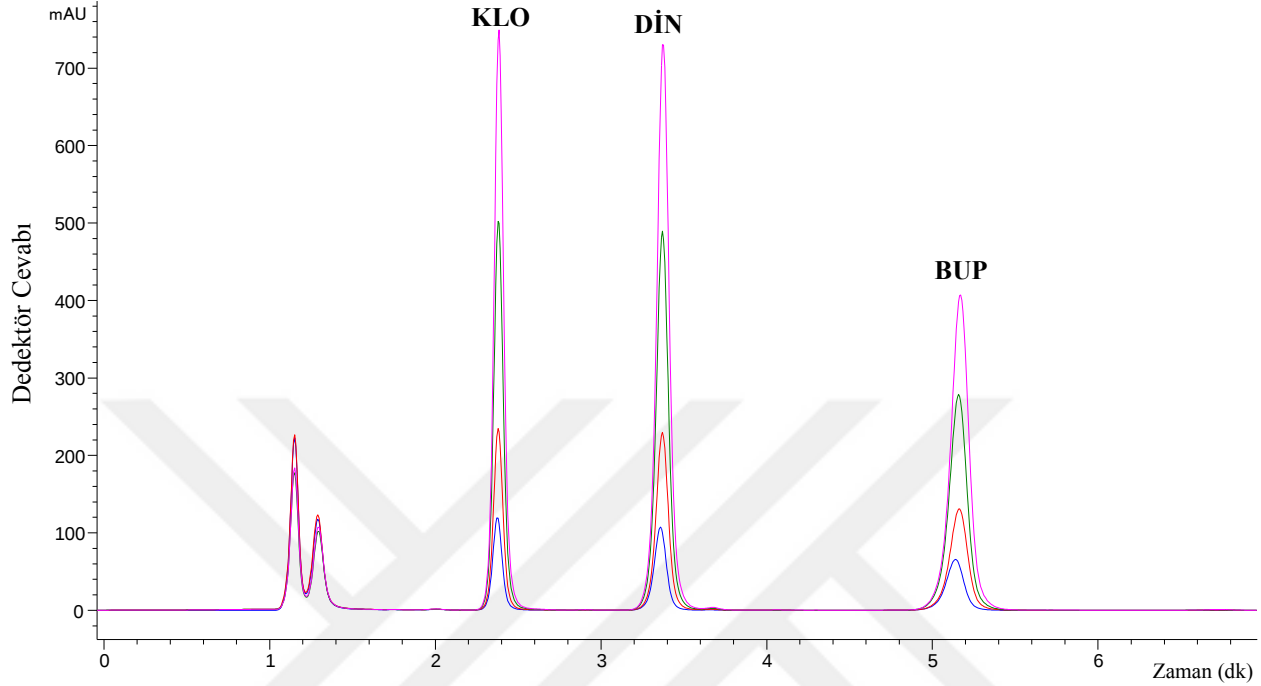
Şekil 3.20. Optimize edilen koşullarda idrar numunesi üzerine eklenen $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), idrar numunesi üzerine eklenen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), idrar numunesi üzerine eklenen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), idrar numunesi üzerine eklenen $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.11. İdrar numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) *			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
$25 \mu\text{g mL}^{-1}$	24,85	23,98	24,63	0,88	0,98	1,96	0,59	4,06	1,45	99,41	95,935	98,54
$50 \mu\text{g mL}^{-1}$	51,78	51,85	50,01	1,50	1,41	1,29	-3,56	-3,70	-0,04	103,56	103,70	100,03
$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	106,8	104,39	104,76	0,40	1,17	1,07	-6,80	-4,39	-4,76	106,80	104,39	104,76
$150 \mu\text{g mL}^{-1}$	156,0	155,8	155,2	0,78	0,26	1,03	-4,05	-3,90	-3,50	104,06	103,90	103,51

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

Domates numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.21 ve Çizelge 3.12’de verilmiştir.



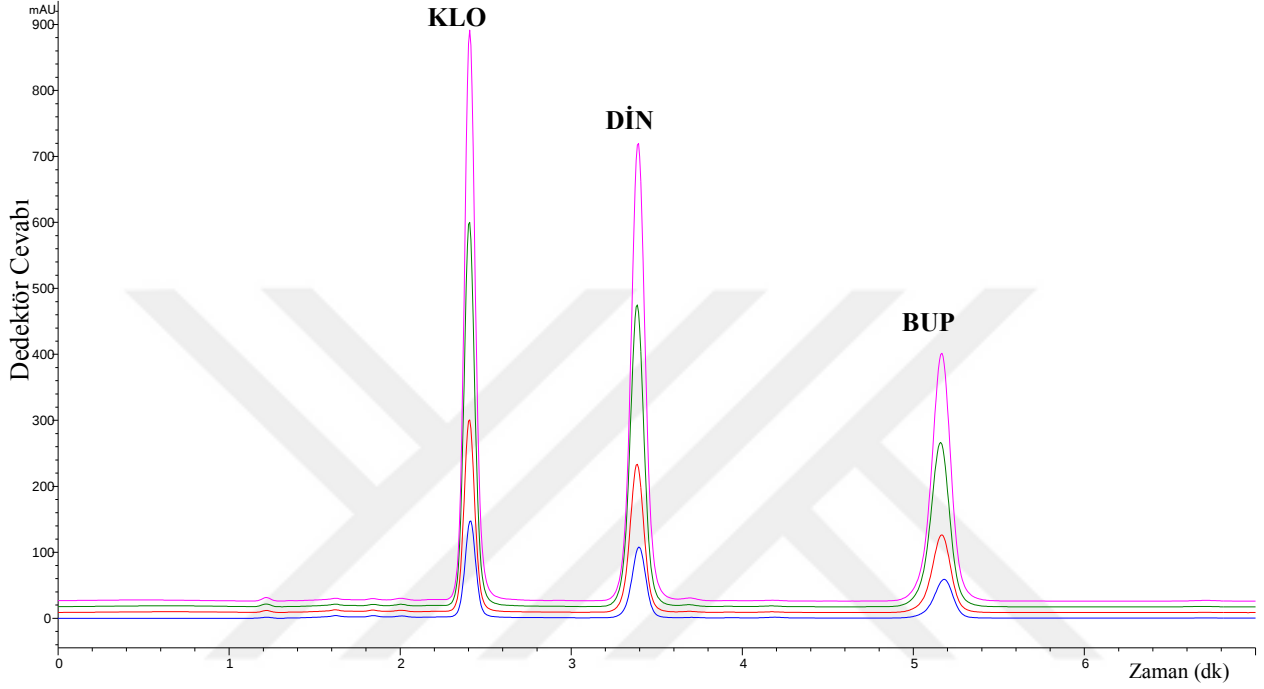
Şekil 3.21. Optimize edilen koşullarda domates numunesi üzerine eklenen 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), domates numunesi üzerine eklenen 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), domates numunesi üzerine eklenen 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), domates numunesi üzerine eklenen 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.12. Domates numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) [*]			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	23,61	23,41	24,19	0,47	0,64	1,80	5,29	6,36	3,22	94,47	93,63	96,77
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	49,60	49,46	52,33	0,43	1,41	0,41	0,79	1,07	-4,66	99,20	98,92	104,67
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100,09	105,80	103,38	0,10	0,03	0,76	-0,09	-5,84	-3,38	100,09	105,84	103,38
150 $\mu\text{g mL}^{-1}$	142,90	158,30	153,61	0,12	0,12	0,15	4,73	-5,54	-2,41	95,27	105,54	102,41

^{*}5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

Toprak numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.22 ve Çizelge 3.13'te verilmiştir.



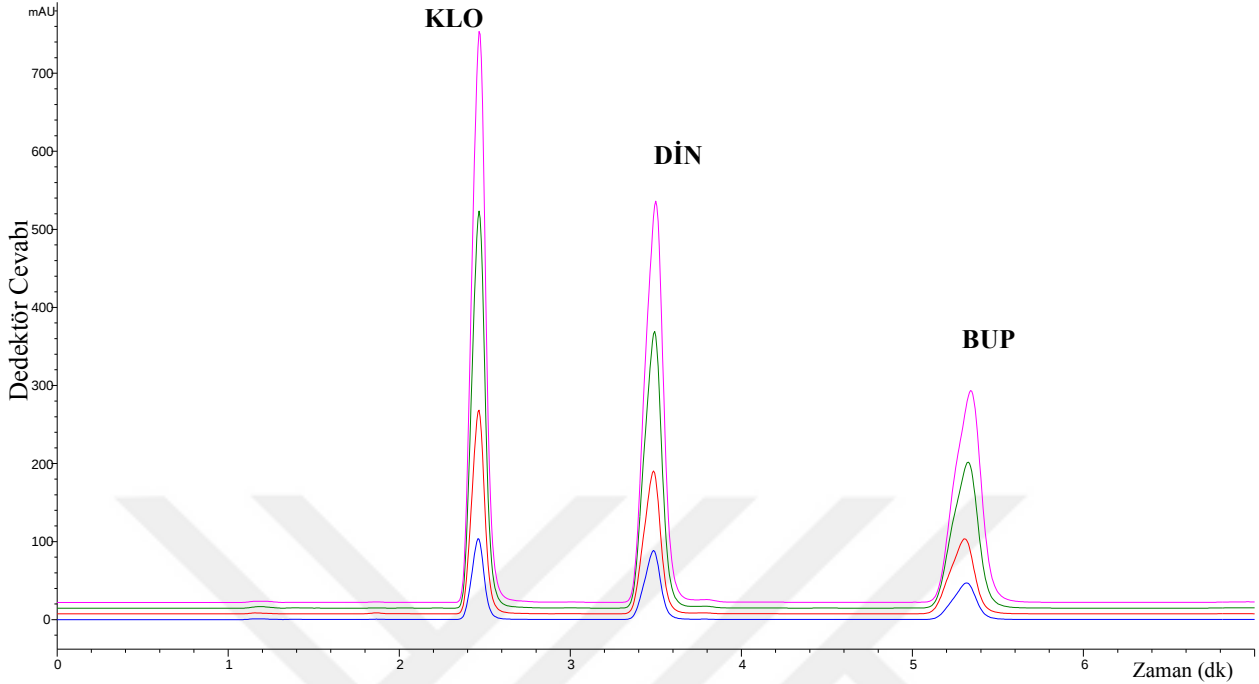
Şekil 3.22. Optimize edilen koşullarda toprak numunesi üzerine eklenen $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), toprak numunesi üzerine eklenen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), toprak numunesi üzerine eklenen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), toprak numunesi üzerine eklenen $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.13. Toprak numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) [*]			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
$25 \mu\text{g mL}^{-1}$	25,21	25,90	25,67	0,20	0,32	0,12	-0,85	-3,63	-2,70	100,85	103,63	102,70
$50 \mu\text{g mL}^{-1}$	49,46	52,93	50,94	0,49	0,44	0,08	1,07	-5,87	-1,88	98,92	105,87	101,88
$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	98,19	104,80	103,23	0,04	0,97	0,94	1,80	-4,80	-3,23	98,18	104,80	103,23
$150 \mu\text{g mL}^{-1}$	147,65	158,34	148,24	0,51	0,55	0,28	1,56	-5,56	1,67	98,43	105,56	98,83

^{*}5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

Çeşme suyu ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.23 ve Çizelge 3.14’te verilmiştir.



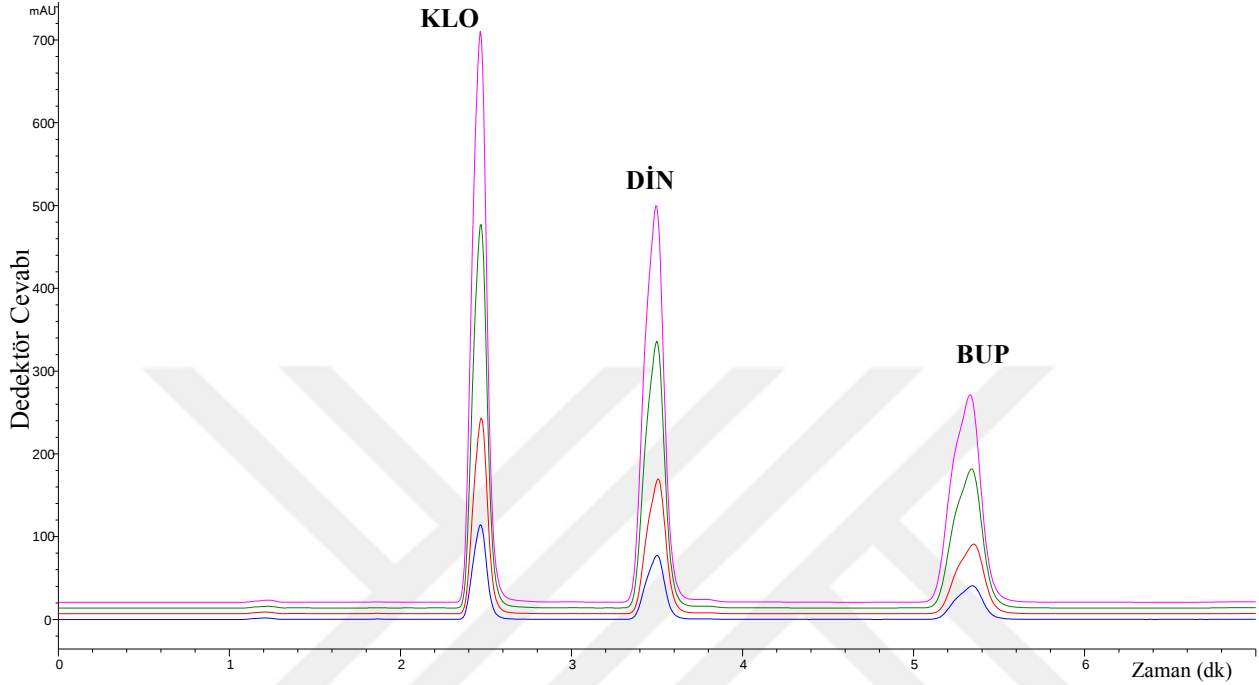
Şekil 3.23. Optimize edilen koşullarda çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), çeşme suyu numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.14. Çeşme suyu numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) *			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
25 µg mL ⁻¹	21,700	24,014	24,094	12,55	1,447	0,511	13,198	3,945	3,625	86,802	96,055	96,375
50 µg mL ⁻¹	50,568	49,959	50,776	0,122	1,065	0,1825	-1,137	0,0813	-1,552	101,14	99,92	101,55
100 µg mL ⁻¹	101,025	94,689	102,574	0,273	0,950	0,112	-1,025	5,31	-2,574	101,025	94,688	102,57
150 µg mL ⁻¹	150,633	142,086	155,171	0,0342	0,071	0,195	-0,422	5,276	-3,447	100,422	94,724	103,447

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

Atık su numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.24 ve Çizelge 3.15'te verilmiştir.



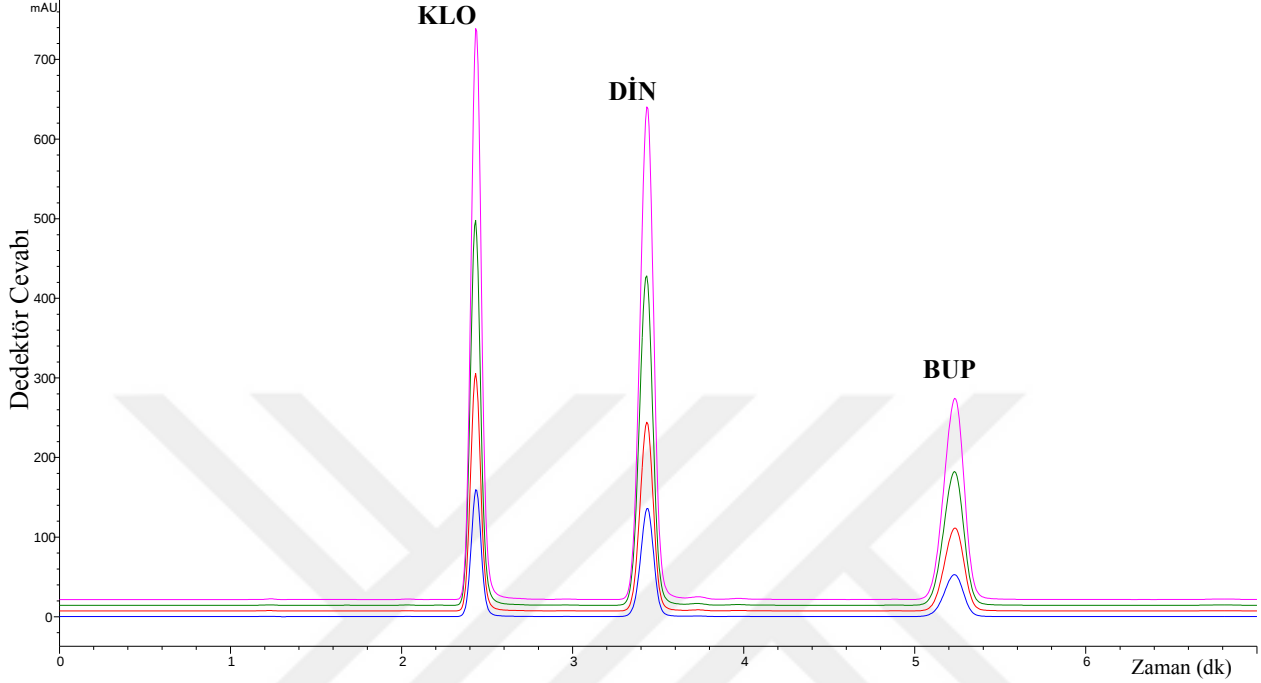
Şekil 3.24. Optimize edilen koşullarda atık su numunesi üzerine eklenen 25 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (mavi), atık su numunesi üzerine eklenen 50 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (kırmızı), atık su numunesi üzerine eklenen 100 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (yeşil), atık su numunesi üzerine eklenen 150 µg mL⁻¹ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.15. Atık su numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) *			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
25 µg mL ⁻¹	23,810	24,677	23,851	0,0771	0,1076	0,0943	4,762	1,293	4,595	95,238	98,707	95,405
50 µg mL ⁻¹	50,249	49,236	50,260	0,361	0,308	0,323	-0,498	1,528	-0,520	100,498	98,472	100,520
100 µg mL ⁻¹	99,751	93,751	102,183	1,110	0,397	0,111	0,249	-6,250	-2,183	99,751	93,751	102,183
150 µg mL ⁻¹	150,328	144,310	154,759	0,130	1,117	0,087	-0,218	3,793	-3,173	100,218	96,207	103,173

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

İçme suyu numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.25 ve Çizelge 3.16’da verilmiştir.



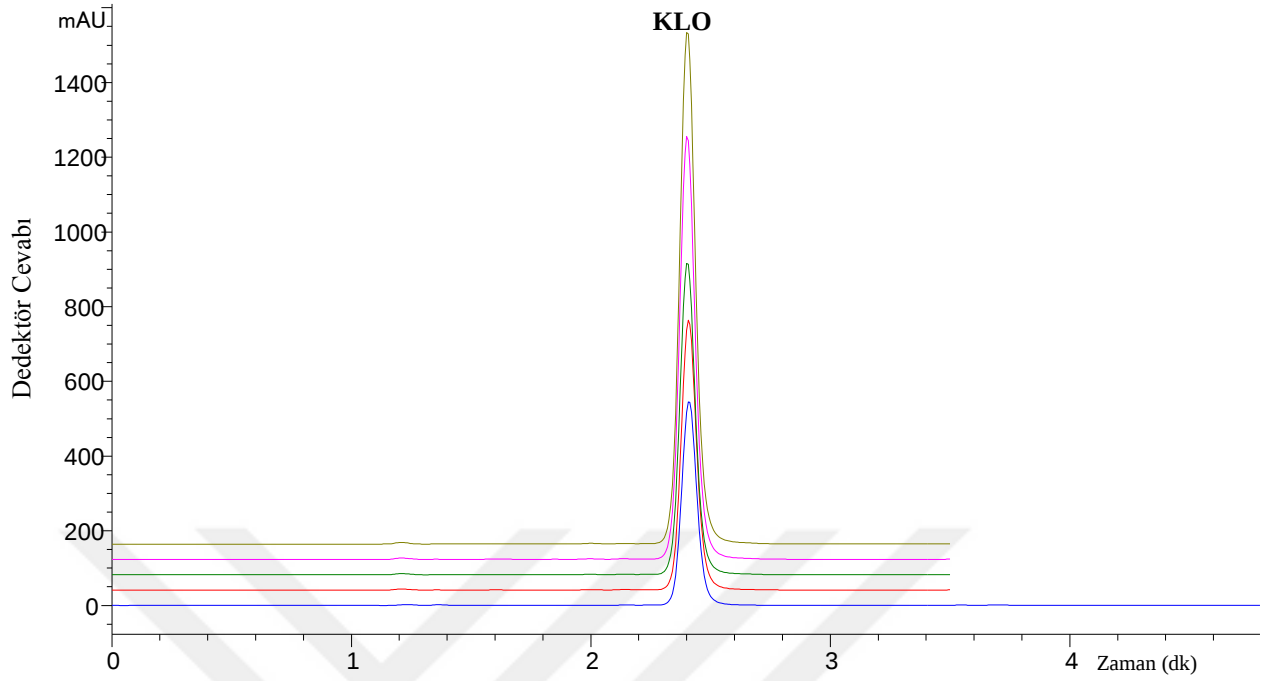
Şekil 3.25. Optimize edilen koşullarda içme suyu numunesi üzerine eklenen $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (mavi), içme suyu numunesi üzerine eklenen $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), içme suyu numunesi üzerine eklenen $83 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), içme suyu numunesi üzerine eklenen $115 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.16. içme su numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Eklenen miktar	Bulunan miktar			BSS (%) *			BH (%)			Geri kazanım (%)		
	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP	KLO	DİN	BUP
$24 \mu\text{g mL}^{-1}$	24,122	25,289	25,114	0,650	0,312	0,849	-0,510	-5,371	-4,644	100,510	105,372	104,644
$45 \mu\text{g mL}^{-1}$	45,711	47,318	44,895	0,078	1,811	0,0485	-1,580	-5,151	-0,233	101,580	105,151	99,767
$83 \mu\text{g mL}^{-1}$	87,952	86,0389	82,854	0,207	0,261	1,123	-5,967	-3,661	0,175	105,967	103,661	99,825
$115 \mu\text{g mL}^{-1}$	113,297	122,496	118,706	0,180	0,035	1,318	1,481	-6,520	-3,223	98,519	106,519	103,223

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

Zirai ilaç numunesi ile yapılan çalışmaları sonuçları Şekil 3.26 ve Çizelge 3.17’da verilmiştir.



Şekil 3.26. Optimize edilen koşullarda zirai ilaç numunesi ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (mavi) üzerine eklenen $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (kırmızı), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (yeşil), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (pembe), zirai ilaç numunesi üzerine eklenen $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ saf madde ilavesi (sarı) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.17. KLO içeren zirai ilaç numunesi için geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

	KLO			
Bilinen miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	100			
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	94,78			
BSS (%) [*]	0,957			
BH (%)	5,212			
İlave edilen miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25	50	100	150
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	26,6	46,44	98,3	142,8
Geri kazanım (%)	97,1	94,15	96,54	94,71
Geri kazanıma ait BSS (%) [*]	0,116	0,089	0,096	0,116
Geri kazanıma ait BH (%)	2,896	5,845	3,458	5,288

^{*}5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

4.TARTIŞMA

Dünyada toplam nüfus günden güne artmaktadır. Nüfus sayısı artışı kıtlık oranını da son derece etkilemektedir. Artan kıtlık sebebiyle üreticiler, ürünlerini zararlılara karşı korumak ve geliştirmek için pestisitleri yaygın olarak kullanmaktadır. Ancak, pestisitler hem üründe hem de farklı alanlarda kalıntıları nedeniyle canlıları ve çevreyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu yüzden pestisitlerin tayinleri için analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemli olmaktadır.

En yaygın analiz tekniklerden biri olan kromatografik teknikler, günümüzde, toksik kalıntıları analiz etmek için çok kullanılan gelişmiş bir yöntemdir. YBSK yöntemi de uygulamasının kolaylığı ve analizlerde sağladığı farklı avantajlardan dolayı tercih edilmektedir.

KLO, DİN ve BUP'un fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde YBSK yönteminin bu üç maddenin analiz için uygulanabileceği anlaşılmıştır. YBSK yöntemiyle bu üç pestisit in eşzamanlı analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine için ilk olarak mobil fazdaki organik çözücünün ve tampon çözeltinin yüzdelerinin denemeleri yapılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda, tampon çözelti olarak amonyum asetat ve organik çözücü olarak asetonitril seçilmiştir. Gradyent sistemde asetonitril yüzdesi, % 60, % 70, % 75, % 80, % 85, % 90 ve % 95 oranlarında test edildi. Analiz sonucunda, artan asetonitril oranı ile analiz süresinin, ayırma gücünün ve kolonun verimliliğinin azaldığı görülmüştür.

Analiz esnasında pH etkisini önlemek için tampon kullanılmıştır. Tampon çözelti molaritesinin analiz sonuçları üzerindeki etkisinin incelenmesi için % 30 oranında, 5, 10, 20 ve 40, mM hazırlanan amonyum asetat tampon çözeltileri sisteme enjekte edilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde tampon çözelti molaritesinin kayda değer bir etkisinin olmadığı ancak 10 veya 20 mM amonyum asetat çözeltisi ile daha yüksek teorik tabaka sayısı elde edildiği görülmüştür.

Tampon çözelti molaritesi ve organik çözücü ile tampon çözelti yüzdelерinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda hem kabul edilebilir değеrlerde ayırım sağlamak hem de daha az organik atık kullanmak amacıyla optimum çalışma koşullarında hareketli faz bileşimi asetonril: 10 mM-amonyum asetat (75:25, h/h) olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde, hareketli faz bileşiminin ve tampon çözelti molaritesinin belirlenmesinden sonra, tüm parametreler sabit tutularak ve 3 farklı kolonda denemeler yapılmıştır. Farklı markalara ait ters faz C18 kolonların sonuçları incelendiğinde Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonunun ayırım için en uygun kolon olduğuna karar verilmiştir.

Ters faz yönteminde kolon sıcaklığının değışmesi analiz süresi, pik şekli gibi parametrelere etki etmektedir. Çünkü ters faz yönteminin mekanizmasında sıcaklık değışimlerinin etkisi entalpi ile açıklanmaktadır. Kolon sıcaklığı denemeleri 25 °C, 35 °C ve 45 °C’de yapılmıştır. Analizler sonucu üç değerde de aynı analiz süresi ve birbirine yakın değерlerde ayırım gücü ve etkinlik sağladığı görülmüştür. Fazladan enerji harcamamak için kolon sıcaklığına 25 °C olarak karar verilmiştir.

Uygun kolon sıcaklığının seçilmesinden sonra, tampon çözelti olarak sodyum asetat ile denemeler yapılmıştır. Analizlerde amonyum asetatın, sodyum asetatın daha iyi performans gösterdiği bulunmuştur.

Akış hızını artırarak analiz süresini kısaltmak için, seçilen kolonda 1.0, 1.25, 1.5 ve 2 mL dk⁻¹ akış hızlarında denemeler yapılmıştır. SUT parametrelerinin kabul değерleride dikkate alındığında 2 mL dk⁻¹ hızında 3,04 dakika gibi kısa bir sürede üç maddeninde analiz edilebileceği görülmüştür. Fakat çalışmaların bir sonraki aşaması olan bozunma çalışmalarında olası bozunma ürünlerinin etken maddelere girişim yapmasını engellemek ve idrar, su, toprak numuneleri gibi kompleks matrikslerden gelebilecek farklı maddelerde düşünüldüğünde 1 mL dk⁻¹ akış hızının uygun olduğuna karar verilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında tampon çözeltinin pH'ının analiz sonucu üzerindeki etkisi incelenmiştir. pH deneme çalışmaları, tampon çözeltisinin pH'ının 6,54, 5,5, 4,5 ve 3,5'a ayarlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, tampon çözeltisinin pH'sının analiz sonuçlara önemli bir etki etmediği görülmüştür. Bu yüzden tampon çözeltinin pH'sının değişmemesi uygun görülmüştür.

Geliştirilen YBSK yönteminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra sistem uygunluk parametreleri belirlenmiş olup bulunan parametreler doğrultusunda yöntemin uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır ve optimizasyon çalışmaları sonunda yöntem validasyonu aşamasına geçilmiştir.

Saf maddeler üzerinden bozundurma ürünlerinin analize etkisini incelemek için bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Şekil 3.19' da görüldüğü üzere saf maddeler stres koşulları 0,1 ve 1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 ve 1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3 ve 3' lük H₂O₂ ile oksidasyon, sıcak su banyosunda bekletme, UV ışık altında bekletme ve 60 °C etüvde bekletme koşullarına tabi tutulmuştur. Neredeyse tüm koşullarda üç maddeden en az birinin kısmen veya tamamen bozunduğu görülmüştür. Bu yüzden bu pestisitlerin asidik, bazik, ışıklı ve sıcak ortamlarda saklanması, depolanmasının veya tutulmasının uygun olmadığına karar verilmiştir.

Geliştirilen YBSK yönteminin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan yöntem geçerlilik testlerinin parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarının, doğrusal aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri bulunduktan sonra istatistiksel olarak değerlendirilmeleri yapılmıştır.

Sonuç olarak klorotalonil, dinobuton ve buprofezin pestisitlerinin eş zamanlı olarak YBSK yöntemi ile analizi Kinetex C18 (150 mm x4,6 mm; 5µm) kolonda, 25 °C kolon sıcaklığında ve 1 mL dk⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hareketli fazın içeriği asetonitril: 10 mM amonyum asetat tamponu (pH 6,54) (75: 25; h/h)'dir. Çalışma yapılan dalga boyu 254 nm olarak seçilmiş ve enjeksiyon hacmi

10 µL'dir. Bu koşullarda; klorotalonil, dinobuton ve buprofezin'in alıkonma zamanları sırasıyla 2,348, 3,316 ve 5,078 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde üç madde içinde doğrusal olarak 1-200 µg mL⁻¹, klorotalonil, dinobuton ve buprofezin için teşhis sınırı sırasıyla 0,0264, 0,0414, 0,0506 µg mL⁻¹ ve tayin alt sınırı ise kabul edilen % BSS sınırları içinde (< %2) sırasıyla 0,0799, 0,1255 ve 0,1535 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.18. Farklı örneklerde BUP, KLO ve DİN analizi

Pestisit	Numuneler	Yöntem	LOD	Analiz süresi (dakika)	Kaynak
BUP	Farklı göl suyu	YBSK-FDD	0,08 mg kg ⁻¹	18,391-18,53	(Tuzimski, 2009)
	Sebze ve su	GK-MS	-	17,161	(Chem ve ark., 2009)
KLO	Musluk suyu	YBSK/UV, 254nm	0,002 mgmL ⁻¹	-	(Survey ve ark., 2006)
	Toprak	SK-MS	0,1 mg mL ⁻¹	2,3	(Chaves ve ark., 2008)
	Sebzeler	YBSK-FDD, 246nm	0,01 mg L ⁻¹	2,6	(Hirakawa, 2015)
	Elma suyu	YBSK/FDD, 260nm	0,5 ng g ⁻¹	16,29	(Topuz ve ark., 2005)
DİN	Kan	GK-MS	-	23,88	(Hayat ve ark., 2010)
BUP	İdrar	YBSK-FDD	0,051 µg mL ⁻¹	5,078	Tez Çalışması
KLO	Toprak		0,027 µg mL ⁻¹	2,348	
DİN	Domates		0,042 µg mL ⁻¹	3,316	
	İçme suyu				
	Çeşme suyu				
	Atık su				
	Zirai ilaç				

Çizelge 3.18 'de görüldüğü gibi geliştirdiğimiz yöntem, literatür yöntemleri ile kıyaslandığında genelde, daha hassas sonuçlar alınmıştır ve kısa analiz süresi ile KLO, DİN ve BUP'un analizlerinin yapılmış olduğu anlaşılmıştır.

Avrupa Parlamentosu ve Konsey'in 396/2005 sayılı Tüzüğü Ek II, III ve V'de değişiklik yapan 18 Ocak 2019 tarih ve 2019/91 / EC biyolojik, su ve meyveler gibi ürünler maksimum kalıntı 0.01 mg / kg ila 6 mg / kg arasındadır. Bu yüzden geliştirdiğimiz yöntem daha hassas ve pestisitlerin tespit etme kabiliyetinin izin verilen sınırlar arasında olduğu bulunmuştur. Ancak, dinobutonun maksimum kalıntı limiti henüz onaylanmamıştır (<http://data.europa.eu/eli/reg/2019/91/oj>).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, insektisit olarak kullanılan buprofezin ve fungusit olarak kullanılan klorotalonil ve dinobuton pestisitlerinin YBSK yöntemiyle eş zamanlı olarak analizi için gerekli parametreler optimize edilerek yöntemin validasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, mobil fazda organik çözücü yüzdesi, tampon çözelti molaritesi, sabit faz, akış hızı, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin denemeleri yapılarak analiz için en iyi koşullar belirlenmiştir.

Literatür taramalarında KLO, DİN ve BUP'un aynı anda tayini için herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Hem çalışılan bu üç pestisit için aynı anda analizinin gerçekleştirilmesi hem de biyolojik numune, sebze, su, toprak ve zirai ilaç uygulamalarının yapılması çalışmanın özgünlüğünü göstermektedir.

Sonuç olarak, elde edilen verilere göre, KLO, DİN ve BUP pestisitlerinin eşzamanlı analizi için hızlı, hassas, kesin, uygulaması kolay, doğru, ekonomik ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan YBSK yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin sağlıklı insan idrarından, domates, su, toprak ve zirai ilaç örneklerinden eşzamanlı analizine başarıyla uygulanabileceği gösterilmiştir.

Geliştirilen bu yöntemin referans bir yöntem olarak kullanılabilir olması da düşünülmektedir.

ÖZET

Bazı Pestisitlerin Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Eş Zamanlı Analizi

Bu tezin amacı pestisit olarak kullanılan klorotalonil, dinobuton ve buprofezin'in eş zamanlı tayini için hassas ve ekonomik bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmektir. Bu sebeple, çeşitli sabit fazlar denenerek maddelerin ayırımları için en iyi sabit faz belirlenmiştir. Diğer taraftan farklı hareketli faz kompozisyonları, farklı derişimlerde tampon çözeltiler, sıcaklık, akış hızı etkileri gibi deney şartları da optimize edilmiştir. Kinetex C 18 (150 mm x 4.6 mm; 5 µm) (Phenomenex, ABD) kolon ve asetonitril: tampon çözelti (10 mM, amonyum asetat; pH 6,54), 75: 25 (h/h) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak iyi bir kromatografik ayırıma ulaşılmıştır. Analizler 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızında ve 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Araştırmalar sonucunda optimum çalışma şartlarında, hızlı, basit, duyarlı, doğru, kesin, çevreci ve tamamen valide edilmiş analiz yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen hızlı ve duyarlı ters faz YBSK yöntemi klorotalonil, dinobuton ve buprofezin'in eş zamanlı miktar tayinleri için zaman almayan numune hazırlama işlemine sahip olmasından dolayı kalite kontrol laboratuvarlarında kolayca uygulanabilecektir. Bozunma çalışmalarının da yapıldığı geliştirilen YBSK yöntemi idrar, domates, toprak, içme suyu, çeşme suyu, atık su ve KLO içeren zirai ilaç numunesine de uygulanmıştır. Böylece kompleks matrislerde yöntemin uygulanabilirliği de gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Buprofezin, Dinobuton, Klorotalonil, YBSK, Validasyon

SUMMARY

Simultaneous Analysis Of Some Pesticides By High Performance Liquid Chromatography Method

The aim of this thesis is to develop a sensitive and economical liquid chromatographic method for the simultaneous determination of chlorothalonil, dinobuton and buprofezin pesticides. For this reason, various stationary phases have been tested to determine the best stationary phase for the separation of compounds. On the other hand, different mobile phase compositions, buffer solutions in different concentrations, temperature and flow rate effects were optimized. A good chromatographic separation was achieved by using Kinetex C 18 (150 mm x 4.6 mm; 5 μ m) (Phenomenex, USA) column and acetonitrile: buffer solution (10 mM, ammonium acetate; pH 6.54), 75: 25 (v / v) mobile phase composition. The analyzes were carried out at a flow rate of 1 mL min⁻¹, 25 ° C and a wavelength of 254 nm.

At the end of the research, rapid, simple, sensitive, accurate, accurate, environmental and fully validated analysis method has been developed in optimum working conditions. The proposed rapid and sensitive reverse phase HPLC method can be easily applied in quality control laboratories due to the fact that it does not take time to prepare samples for simultaneous determination of chlorothalonil, dinobuton and buprofezin. The purposed HPLC method, in which degradation studies were performed, also applied to the pesticide sample containing urine, tomato, soil, drinking water, tap water, wastewater and CLO. Thus, the applicability of the method in complex matrices is also shown.

Keywords: Buprofezin, Chlorothalonil, Dinobuton, HPLC, Validation

KAYNAKLAR

- AKAMATSU, M. (2011). Importance of physicochemical properties for the design of new pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf102525e>
- AKDOĞAN, İ. (2008). Pestisit Kalıntılarının Gaz Kromotografik Analizinde Kalibrasyon Yöntemlerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.354 ,İstanbul.
- AL-TAHER, F., CHEN, Y., & WYLIE, P. (2017). *Reduction of Pesticide Residues in Tomatoes and Other Produce*. (December). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-240>
- ALİ, E., MAO, K., LİAO, X., JİN, R., & Lİ, J. (2019). Cross-resistance and biochemical characterization of buprofezin resistance in the white-backed planthopper , *Sogatella furcifera* (Horvath). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (April), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.008>
- ATABEY, T. (2016). Edirne Yöresinde Üretilen Pirinçlerde Pestisit Tayini, Namik Kemal Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- ATTALLAH, E. R. (2016). *Validation of Multiresidue Method for Determination of 340 Pesticide Residues in Fresh Pepper using LC – MS / MS*. (2004), 1–12.
- BAKİRCİ, G. T., YAMAN ACAY, D. B., BAKİRCİ, F., & ÖTLEŞ, S. (2014). Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. *Food Chemistry*, 160, 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.051>
- BIDLINGMEYER, B.A. (1992). *Practical HPLC Methodology and Applications*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 69-200.
- BLIENER, D.M. (2006). *Validating chromatographic methods: A practical guide*. Danvers, Wiley- Interscience Pub.
- BOULANOUAR, S., MEZZACHE, S., COMBÈS, A., & PİCHON, V. (2018). Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. *Talanta*, 176, 465–478. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.067>
- BRANCATO, A., BROCCA, D., CABRERA, L. C., LENTDECKER, C. DE, ERDOS, Z., FERREIRA, L., VİLLAMAR-BOUZA, L. (2018). DOI:10.1007/s12010-013-0525-3). 2005(396). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5285>
- CASRO, M., BOLFARINE, H., GALEA-ROJAS, M.M., CASTILHO, V. (2005). An exact test for analytical bias detection. *Anal. Chim. Acta*, 538: 375.
- CHANG, P.-L., HSİEH, M.-M., & CHİU, T.-C. (2016). Recent Advances in the Determination of Pesticides in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4), 409. <https://doi.org/10.3390/ijerph13040409>

- CHAN, C.C. (Ed.) (2004). Potency Method Validation. In: *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Eds.: Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM, New Jersey: Wiley- Interscience Pub.
- CAPPELİNİ, L., et al. (2012). Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environmental Technology* Vol. **33**, No. 20, October 2012, 2299–2304. São Carlos, Brazil.
- CHEM, F., KOREA, S., FOOD, K., & QUECHERS, T. (2009). *A Multiresidue Method for the Determination of 118 Pesticides in Vegetable Juice by Gas Chromatography - Mass Spectrometry and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*. 10095–10101. <https://doi.org/10.1021/jf902712v>
- CHEN, C., QIAN, Y., CHEN, Q., TAO, C., LI, C., & LI, Y. (2011). Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.007>
- CHRISTIAN, G.D. (Eds.) (2004). *Analytical chemistry*. 6th Ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- CROWTER J.B. (Ed.) (2001). Validation of pharmaceutical methods. In: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Eds.: Ahuja S, Scypinski S. San Diego: Academic Press.
- DEMIRCI, A., ÖZCİMDER, M. (2009). *Kromatografik Yöntemler*. Ankara:Kurban Matbaacılık.
- DÖKMECİ, İ. (1988). Toksikoloji, Akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, s.547, İstanbul.
- ERKMEN, C. (2017). *Yeni Nesil Hılc Kolon Kullanılarak Bazı Antiviral İlaçların Farmasötik Dozaj Şekillerinden Sıvı Kromatografisi İle Analizi*. Ankara Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- ERMER, J. (Ed.) (2005). Fundamentals of Validation in Pharmaceutical Analysis. In: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ermer J, Miller JH., Wiley: VCH Publishers.
- ERMER J, PLOSS HJ. (2005). Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 859.
- European Pharmacopoeia (2014) 8th Ed. Council of Europe, Strasbourg.
- FANALI S, HADDAD PR., POOLE C, SCHOENMAKERS P and LLOYD DK. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.
- FAO. (2017). DOI:10.1007/s12010-013-0525-3). In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://doi.org/10.4161/chan.4.6.12871>
- FENİK, J., TANKIEWICZ, M., & BIZIUK, M. (2015). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 814–826. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.008>
- GİRİ, D. (2015). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types,

- G.J. SMİTH .(1987). Pesticide use and toxicology in relation to wildlife: Organophosphorus and carbamate compounds, Washington, D.C. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Resource Publication, **170**, 171 p. 1987.
- GRDINIC, V., VUKOVIC, J. (2004). Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**: 489-512.
- GÖRÖĞ S. (2007). The changing face of pharmaceutical analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.*, **26**: 12-17.
- GÜMÜŞTAŞ,M.(2009). Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü Ve Kalsiyum Kanal Blokörü Kombinasyonu İlaçların Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Aynı Anda Analizi, Ankara Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- GÜMÜŞTAŞ,M.(2016). Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- HAJICOSTAS, E. (2003). Validation of Analytical Methods. Springer-Verlag Pub., Berlin.
- HAMILTON, R.J., SEWEL, P.A. (1982). *Introduction to HPLC*. 2nd Ed., Chapman and Hall, New York. 1-160.
- HAO, Y., ZHANG, H., ZHANG, P., YU, S., MA, D., & Lİ, L. (2019). Chlorothalonil inhibits mouse ovarian development through endocrine disruption. *Toxicology Letters*, **303**(November 2018), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.011>
- HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D.L. and McDOWALL, R.D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 193.
- HAYAT, K., ASHFAQ, M., ASHFAQ, U., & SALEEM, M. A. (2010). *Determination of pesticide residues in blood samples of villagers involved in pesticide application at District Vehari (Punjab), Pakistan*. **4**(October), 666–684.
- HEYDEN,Y.,et al.(1996). Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopeia XXIII for tetracycline hydrochloride: comparison of different columns in an interlaboratory approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.*,**14**: 1313–1326
- HIBBERT, D.B. (2007). *Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory*. Oxford University Press, Inc., New York.
- HİRAKAWA, Y. (2015). *Development of the Assay Methods for Pesticides by Immunological Technique*.
- HUBER L. (2007). Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- INTERAÇÕES, A. E., AMBIENTE, C. O. M. O., PEREIRA, V. J., PAULO, J., &

- RODRÍGUES, A. (2016). Physical-Chemical Properties of Pesticides : Concepts , Applications , and Interactions With the Environment Propriedades Físico-Químicas Dos Agrotóxicos : *File:///C:/Users/Satellite/Downloads/31533-140970-2-PB.Pdf*, 32(3), 627–641. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n3a2016-31533>
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2A (R1)
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2B (R1).
- Internet: <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/91/oj>
- J.H. KANG AND Y.S. CHANG. (2011). Organochlorine Pesticides in Human Serum, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Republic of Korea, 215-240, 2011.
- KELESSIDIS, A., & STASINAKIS, A. S. (2012). *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.012>.
- KIRKLAND, J. J. (2008). *Introduction To Modern Liquid Third Edition Introduction To Modern Liquid Third Edition*.
- KHAN,A.,et al.(2009). Determination of residues of trichlorfon and dimethoate on guava using HPLC Food Chemistry **114** (2009) 286–288 : Agricultural Research Institute, Tarnab Peshawar,Pakistan.
- KLAASSEN C.D. (2001) In: Casarett&Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, pp 763-774, 6th Ed.USA: McGraw-Hill., USA.
- KROMIDAS, S. (Ed.) (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Publishers.
- LEE, Y.-D., & JANG, S.-W. (2010). Determination of Buprofezin Residues in Rice and Fruits Using HPLC with LC/MS Confirmation. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 29(3), 247–256. <https://doi.org/10.5338/kjea.2010.29.3.247>
- LÓPEZ, S. H., SCHOLTEN, J., KIEDROWSKA, B., & DE KOK, A. (2019). Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.024>
- LU, D., QIU, X., FENG, C., LIN, Y., XIONG, L., WEN, Y., WANG, G. (2012). Simultaneous determination of 45 pesticides in fruit and vegetable using an improved QuEChERS method and on-line gel permeation chromatography – gas chromatography / mass spectrometer. *Journal of Chromatography B*, 895–896, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.006>
- MATTÍCE, J. (2010). Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis. *Journal of Environment Quality*. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0001br>
- MEYER, V. R., & WILEY, J. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*

fourth edition (Vol. 3). Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA), St. Gallen, Switzerland.

- MUHAMMETOGLU, A., DURMAZ, S., & USLU, B. (2010). Evaluation of the environmental impact of pesticides by application of three risk indicators. *Environmental Forensics*, **11**(1–2), 179–186. <https://doi.org/10.1080/15275920903559180>
- OZKAN, S.A. (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. USA: HNB Publishers.
- PRICHARD E BARVICK, V. (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. UK: John Wiley & Sons Pub.
- RILEY CM, ROSANSKE TW (Eds.) (1996). *Development and Validation of Analytical Methods*. Oxford: Pergamon Press.
- SAMSİDAR, A., & SHAARANİ, S. (2018). Trends in Food Science & Technology A review of extraction , analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and food stuffs. *71*(June 2017), 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.011>
- SCIENCES, E., & BO, E. S. (2018). *Toxicity Assessment Of Pesticides With No Ecotoxicological Toxicity Assessment Of Pesticides With No Ecotoxicological Data To Freshwater Algae*.
- SHABIR GA (2003). Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, **987**: 57-66.
- SHAH, D., BENVENUTÌ, M., MCCALL, E., JOSHI, S., & BURGESS, J. A. (2009). *LC-MS / MS Analysis of Pesticide Residues in Rice and Unexpected Detection of Residues in an Organic Rice Sample*.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA .(1998). *Principles of Instrumental Analysis*. 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA.
- SMITH, K., EVANS, D. A., & EL-HITÌ, G. A. (2008). Role of modern chemistry in sustainable arable crop protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2174>
- SNYDER LR, KIRKLAND JJ, GLAYCH JL. (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed., John Wiley & Sans Inc., New York.
- SURVEY, U. S. G., SUBSTANCES, T., & PROGRAM, H. (2006). Results of Analyses of the Fungicide Chlorothalonil, Its Degradation Products, and Other Selected Pesticides at 22 Surface-Water Sites in Five Southern States, 2003–04. In *North*.
- S.V. KUMAR MD. FAREEDULLAH Y. SUDHAKAR B. VENKATESWARLU E. ASHOK KUMAR .(2010). Current review on organophosphorus poisoning, *Archives of Applied Science Research*, **2** (4): 199-215, 2010.

- ŞİŞLİ, M. N. (1994). Çevre Biyolojisi. Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara.
- SWARTZ, M.E, KRULL, I.S. (1997). *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker, New York.
- THOMPSON, M., ELLISON, SLR., AND WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for validation of. methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**: 835-855.
- TİRYAKİ O. CANHİLAL R. VE HORUZ S. (2010) Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, **26(2)**, 154-169.
- TİRYAKİ, O.,TEMUR, C. (2016). The Fate of Pesticide in the Environment. J. BIOL. ENVIRON. SCI., 2010, 4(10), 29-38; Erciyes University, Seyrani Agriculture Faculty, Plant Protection Department, 38039 Kayseri-TÜRKİYE.
- TOPTANCI,I.(2013). Çiçek ve Salgı Ballarında Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (Pah), Pestisit ve Antibiyotik Kalıntılarının GC/MS ve LC/MS/MS İle Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- TOPUZ, S., ÖZHAN, G., & ALPERTUNGA, B. (2005). Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.11.012>
- TORBECK, L.D. (Ed.). (2007). *Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design*. New York: Informa Healthcare USA.
- TUZİMSKİ, T. (2009). Application of SPE-HPLC-DAD and SPE-HPTLC-DAD to the analysis of pesticides in lake water. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 22(4), 235–240. <https://doi.org/10.1556/jpc.22.2009.4.1>
- US FDA. (1983). Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (1983). Rockville, MD.
- US FDA. (2000). Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls, Federal Notices 5, 776.
- VAN LOCCO J, ELSKENS M, CROUX C, BEERNAERT H. (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of correlation coefficient. *Accred. Qual. Assur.*, **7**: 281-285.
- WAKSMUNDZKA, M., & SHERMA JOSEPH. (2010). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. In *CRC Press*.
- W.M. VALENTİNE. (1990). Pyrethrin and pyrethroid insecticides, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **20(2)**:375-382, 1990.
- YADAV, I., & DEVİ, N. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environmental Science and Engineering*, 6(February), 140–158.
- YAZGAN ,M.S.(1997). Türkiye’ de Pestisit Kirliliği, Türkiye’ de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II, Gebze, Türkiye, 22-23 Kasım 1997.

YILDIZ, M., GÜRKAN, O., TURGUT, C., KAYA, Ü., ÜNAL, G.(2005). Tarımsal Savaşımında Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları, 6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara, Türkiye, 3– 7 Ocak 2005.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : WELDEJEWORGİS HNDEYA
Soyadı : GEBREHİWOT
Doğum yeri ve tarihi : TİGRAY BÖLGESİ, 19.06.1992
Uyruğu : ETİYOPYA
Medeni durumu : EVLİ
İletişim adresi ve telefonu : MEKELLE, ETİYOPYA
Elektronik Posta : weldshhndeya@gmail.com

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2010–2013/Lisans / Mekelle Üniversitesi /Kimya Bölümü (Tigray, Etiyopya)

2009–2010/Üniversite öncesi özel okul /Samre (Tigray, Etiyopya)

2007–2009/Lise/ Gijet Lisesi(Tigray, Etiyopya)

1999–2007/İlköğretim/ Mayweyzero İlköğretim Okulu(Tigray, Etiyopya)

Yabancı dili: İngilizce ve Türkçe

III- Ünvanları

Lisans

IV- Mesleki Deneyimi

2013–2014/MIT Laboratuvar. Ltd./ Laboratuvar asistanı (Mekelle, Etiyopya)

2014–/ Mekelle Üniversitesi / Laboratuvar asistanı (Mekelle, Etiyopya)

V- Bilimsel ilgi Alanları

Pestisit analizleri, YBSK, Yöntem validasyonu.

VI-Faaliyetler

1. ‘Development of RP-HPLC Method for Chlorothalonil, Dinobuton and Buprofezin from Environmental Samples’ başlıklı poster bildirisi 20th EUROANALYSIS 2019 kongresinde sunulmak üzere kabul edilmiştir.
2. ‘Optimization And Validation Of Hplc Method For Some Pesticides From Human Urine And Commercial Dosage Form’ başlıklı poster bildirisi INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SYMPOSIUM ON DRUG RESEARCH & DEVELOPMENT (DRD 2019) kongresinde sunulmak üzere kabul edilmiştir.