

28388.

**DOMATESLERDE LİKİT KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE
2,4-D TAYİNİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**INVESTIGATIONS ON THE DETERMINATION OF 2,4-D
IN TOMATOES BY LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD**

Vural Gökmen

**Y.Ü. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ

olarak hazırlanmıştır

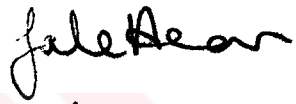
1993

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

İşbu çalışma, jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Prof. Dr. Jale ACAR

.....


Üye :

.....

Doç. Dr. Ayhan TEMİZ

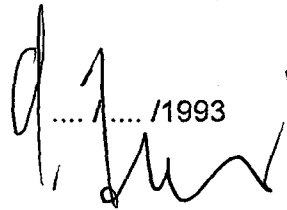
Üye :

.....

Yard. Doç. Dr. Ferhunde ŞAHBAZ

ONAY

Bu tez / / 1993 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki
jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

..... / / 1993


Prof. Dr. Gültekin GÜNAY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZET

2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), herbisit olarak Türkiye' de kullanılmasına izin verilen bir maddedir. Ancak bu maddenin kontrolsüz bir şekilde, bazı sebzelerin serada yetiştirilmesinde büyümeyi düzenleyici olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Buna karşılık bugüne kadar Türkiye seralarında yetiştirilen bu sebzelerde kalıntı 2,4-D miktarının belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Bazı bitkisel ürünlerde 2,4-D tayini amacıyla kullanılan gaz kromatografik yöntemlerde örneğin temizlenmesi ve esterifikasyonu uzun zaman aldığından ve fazla miktarda kimyasal kullanımını gerektirdiğinden bu araştırmada, domateslerdeki 2,4-D' nin serbest asit formunda analiz edilebildiği HPLC için bir yöntem geliştirmeye çalışılmıştır. Bu amaçla bitkisel materyallerde gaz kromatografisi ile 2,4-D' nin metil esteri formunda tayinine uygun bir yöntem esas alınmıştır ve HPLC' ye uyarlanmaya çalışılmıştır.

Bu şekilde araştırmanın başlangıcında, HPLC' de 2,4-D' nin serbest asit ve metil esteri formunda tayini için mobil faz seçimi yapılmış ve bunun için 3 farklı izokratik ve bir gradiyent mobil faz karışımı kullanılmıştır. Kullanılan mobil fazların bileşimleri şöyledir:

1. 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren izokratik metanol:su karışımı (75:25, v/v)
2. İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v)
3. İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v)
4. Gradiyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı

2,4-D tayini için en uygun mobil faz karışımının 50:50 (v/v) oranında hazırlanmış izokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı olduğu saptanmıştır. Bu nedenle HPLC ile kantitatif olarak domateslerdeki 2,4-D miktarının belirlenmesinde bu mobil faz karışımı kullanılmıştır.

Geri kazanma oranının belirlenmesi amacıyla domateslere 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg düzeylerinde 2,4-D ilave edilmiştir. Daha sonra bu örnekler sıcak alkali hidrolizine tabi tutulmuş ve ardından asitlendirilerek aseton:su:diklormetan ayırımı ile ekstrakte edilmiştir. Asitlendirilmiş organik ekstraktın ön temizlenmesi amacıyla asit/baz ayırımı uygulanmış ve daha sonra örnek Amberlite XAD-2 kolonunda temizlenmiştir. Kantitatif analizler esterleştirme uygulamadan serbest asit formunda ve metanol/ H_2SO_4 esterifikasyonu uyguladıktan sonra metil esteri formunda HPLC' de yapılmıştır. Domatesten % geri kazanma oranları 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg ilave

düzeyleri için sırasıyla serbest asit formunda %90.6-93.6, %65.0-77.7, %62.85-74.65 ve metil esteri formunda ise %63.55-73.27, %50.76-55.0, %30.67-31.72 olarak bulunmuştur.



ABSTRACT

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is permitted to be used only as a herbicide in Turkey, but it is well known that it is also used ignorantly as growth regulator during the growth of some vegetables in greenhouses. Unfortunately, no study has been carried out to determine the residues of 2,4-D in greenhouse vegetables.

In most of the methods in which gas chromatography was used for the determination of the residues of 2,4-D in plant materials, cleaning-up of the sample and esterification of 2,4-D have appeared as very complex treatments increasing the time and the total cost of analysis. Therefore, it has been the purpose of this study to develop an HPLC method for the determination of 2,4-D residues in tomatoes. A gas chromatographic method offered for the determination of 2,4-D residues in plant materials as methyl ester form was accepted as the basis and modified for HPLC.

At the beginning of the study, the mobile phase to be used for the analysis of 2,4-D and 2,4-DME by HPLC technique was chosen. To do this, 3 isocratic and a gradient mobile phase mixtures were investigated. These mobile phase mixtures are listed below:

1. Methanol:water mixture (75:25, v/v) containing 0.001 M PO_4^{3-} and 0.005 M cetrinide
2. Acetonitrile:water mixture (75:25, v/v) containing 2% acetic acid
3. Acetonitrile:water mixture (50:50, v/v) containing 2% acetic acid
4. Gradient mixture of acetonitrile:water containing 2% acetic acid

The best results for 2,4-D and 2,4-DME were obtained with the acetonitrile:water mixture (50:50, v/v) containing 2% acetic acid. Therefore, this mobile phase mixture was used for the quantitative analysis of 2,4-D residues in tomato samples.

To determine the % recovery of 2,4-D, 0.5, 2 and 4 mg/kg of 2,4-D were added into tomato samples of 2,4-D. Then tomatoes were hydrolyzed with hot alkaline solution. Following acidification step, they were extracted with acetone:water:dichloromethane partition. The acidified organic extract was pre-cleaned with acid/base distribution and then effectively cleaned by eluting through Amberlite XAD-2 column. Both the free acid and methyl ester forms of 2,4-D were analyzed quantitatively by HPLC method. % recoveries corresponding to the added 0.5, 2 and 4 mg/kg of 2,4-D were found out to be 90.6-93.6%, 65.0-77.7% and

62.85-74.65% for the free acid form, and 63.55-73.27%, 50.76-55.0% and 30.67-31.72% for methyl ester form, respectively.



TEŞEKKÜR

Tez konumu belirleyen, araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde önemli yardımlarını gördüğüm tez hocam Prof. Dr. Jale Acar' a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmama maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Araştırma Fonu Sekreterliği' ne ve "Türkiye Piyasasında Tüketime Sunulan Gıdalarda Mikotoksin, Hormon, Ağır Metal İyonları ve Çeşitli Kalıntıların Saptanması" isimli proje kapsamında tez çalışmasının yürütülmesinde kullanılan cihaz ve çeşitli malzemelerin teminini sağlayan bölüm başkanımız Prof. Dr. İlbilge Saldamlı' ya ve diğer proje çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca karşılaştığım problemlerin çözümlenmesinde yardımcı olan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma da teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Araştırma materyali.....	12
3.1.2. Kimyasallar ve diğer yardımcı maddeler.....	12
3.2. Metot	12
3.2.1. Yüksek Performans Likit Kromatografisi (HPLC) ile 2,4-Dikloro- fenoksiasetik Asit (2,4-D) Tayini	12
3.2.1.1. HPLC sistem elemanlarının tanıtılması	12
3.2.1.2. 2,4-D tayini için mobil faz seçimi	13
3.2.1.3. 2,4-D ve 2,4-DME standart çözeltilerinin hazırlanması	15
3.2.2. 2,4-D ve 2,4-DME için spesifik dedeksiyon dalgaboyunun saptanması.....	16
3.2.3. Domates Örneklerinde Kalıntı 2,4-D Miktarının Belirlenmesi.....	16
3.2.3.1. Domateslerin parçalanması	16
3.2.3.2. Hidroliz.....	16
3.2.3.3. Ekstraksiyon (1)	17
3.2.3.4. Ekstraktın Amberlite XAD-2 kolonunda temizlenmesi	18
3.2.3.5. Ekstraksiyon (2)	19
3.2.3.6. Esterleştirme.....	20
3.2.3.7. Domates örneklerinde HPLC ile kantitatif olarak 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesi.....	20
3.2.4. Kuru madde tayini.....	20

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam ediyor)

	Sayfa
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	22
4.1. 2,4-D ve 2,4-DME İçin Spesifik Dedeksiyon Dalga Boyunun Saptanması	22
4.2. Mobil Faz Kompozisyonu ve Akış Hızının Standart Çözeltilerde 2,4-D Tayinine Etkileri.....	22
4.2.1. İzokratik 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su karışımının (75:25, v/v) etkileri.....	22
4.2.2. İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımının etkileri.....	25
4.2.3. İzokratik asetonitril:% 2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının etkileri.....	26
4.2.4. Gradyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımının etkileri.....	29
4.3. Mobil Faz Kompozisyonu ve Akış Hızının Standart Çözeltilerde 2,4-DME Tayinine Etkileri.....	36
4.3.1. İzokratik 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su karışımının (75:25, v/v) etkileri.....	36
4.3.2. İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımının etkileri.....	39
4.3.3. İzokratik asetonitril:% 2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının etkileri.....	42
4.3.4. Gradyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımının etkileri.....	44
4.4. Farklı Mobil Faz Karışımları İle Ters Faz C18 Kolonda 2,4-D ve 2,4-DME İçin Elde Edilen Mutlak Alıkonma Süreleri ve Kapasite Faktörü (k') Değerleri.....	46
4.5. 2,4-D' nin Domatesten % Geri Kazanma Oranının Belirlenmesi.....	48
5. ÖNERİLER	53
6. DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ	54
7. ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 : 2,4-D' nin açık kimyasal formülü (Burgaz 1982).....	3
Şekil 3.1 : HPLC sistem elemanlarının yerleşimi.....	13
Şekil 3.2 : Domateslerde kalıntı 2,4-D tayini için kullanılan yöntemlerin akım şeması.....	21
Şekil 4.1 : İzopropil alkol su (75:25, v/v) karışımı içinde elde edilen 2,4-D ve 2,4-DME spektrumları (a) 2,4-D, (b) 2,4-DME.....	22
Şekil 4.2 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: izokratik 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	23
Şekil 4.3 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	24
Şekil 4.4 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M hegzadesiltrimetiamonyumbromit (setrimit) içeren izokratik metanol:su (75:25, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak (r=0,994), (b) Akış hızı=1.5 ml/dak (r=0,993)..	25
Şekil 4.5 : 2,4-D Kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	27
Şekil 4.6 : 2,4-D Kromatogramları . Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	28
Şekil 4.7 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı=1.0 ml/dak (r=0,965, p<0.05), (b) Akış hızı=1.5 ml/dak (r=0,960, p<0.05).....	29
Şekil 4.8 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	30
Şekil 4.9 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam ediyor)

	Sayfa
Şekil 4.10 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	32
Şekil 4.11 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl	33
Şekil 4.12 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak (r=0,998, p<0.05), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak (r=0,996, p<0.05).....	33
Şekil 4.13 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	34
Şekil 4.14 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	35
Şekil 4.15 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak gradiyent asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak (r=0,995, p<0.05), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak (r=0,998, p<0.05).....	36
Şekil 4.16 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO ₄ ⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	37
Şekil 4.17 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO ₄ ⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	38
Şekil 4.18 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak 0.001 M PO ₄ ⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren izokratik metanol:su karışımı (75:25, v/v) kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak (r=0,990, p<0.05), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak (r=0,9979, p<0.05).....	39
Şekil 4.19 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam ediyor)

	Sayfa
Şekil 4.20 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	41
Şekil 4.21 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v) kullanılmıştır. (a) Akış hızı=1.0 ml/dak ($r=0,998$, $p<0.05$), (b) Akış hızı=1.5 ml/dak ($r=0.985$, $p<0.05$).....	42
Şekil 4.22 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl	43
Şekil 4.23 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v) kullanılmıştır. Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r=0,998$, $p<0.05$).....	44
Şekil 4.24 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl (e) 4 ng/µl.....	45
Şekil 4.25 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak gradiyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı kullanılmıştır. Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r=0,990$, $p<0.05$).....	46
Şekil 4.26 : Kantitatif analizlerde kullanılan 2,4-D ve 2,4-DME standart eğrileri (a) 2,4-D ($r=0.9996$), (b) 2,4-DME ($r=0.9967$).....	49
Şekil 4.27 : Örnek kromatogramı (Kontrol, 0 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50).....	50
Şekil 4.28 : Örnek kromatogramı (0.5 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50)....	50
Şekil 4.29 : Örnek kromatogramı (2 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50)...	51
Şekil 4.30 : Örnek kromatogramı (4 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50)...	51
Şekil 4.31 : Örnek kromatogramları (2,4-DME). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı (50:50). (a) 0 mg/kg, (b) 0.5 mg/kg, (c) 2 mg/kg, (d) 4 mg/kg.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 : Araştırmada kullanılan mobil fazlara ait pH değerleri.....	14
Çizelge 4.1 : Farklı mobil faz kompozisyonları kullanılarak C18 kolonda elde edilen mutlak alıkonma süreleri.....	46
Çizelge 4.2 : Farklı mobil faz karışımları kullanarak C18 ters faz kolonda 2,4-D için elde edilen kapasite faktörü (k') değerleri.....	47
Çizelge 4.3 : Farklı mobil faz karışımları kullanarak C18 ters faz kolonda 2,4-DME için elde edilen kapasite faktörü (k') değerleri	48
Çizelge 4.4 : Domateste farklı ilave düzeylerinde 2,4-D için 2,4-D asit formunda elde edilen % geri kazanma oranları.....	49
Çizelge 4.5 : Domateste farklı ilave düzeylerinde 2,4-D için 2,4-DME formunda elde edilen % geri kazanma oranları.....	49

1.GİRİŞ

Son yıllarda artış gösteren örtü altı sebze tarımında domates önemli bir yere sahiptir. Dış satımın önem kazanması nedeniyle bu yer giderek genişleme eğilimindedir. Buna rağmen, örtü altı sebze yetiştiriciliğinde bazı sorunlar bulunmaktadır. Bu sorunların en önemlisi seralarda düzenli ve yeterli bir ısıtma yapılamaması sebebiyle meyve tutumunun yetersiz olmasıdır. Her ne kadar soğuk kış aylarında günlük ortalama sıcaklıklar bitki gelişimi için yeterli ise de, gece sıcaklıklarının düşük olması, çiçek tozu oluşumunu engellemekte ve normal meyve tutumu gerçekleştirilememektedir. Don ve düşük sıcaklıklardan korunmak amacıyla yapılan ısıtma ise, toplam üretim maliyetini çok yüksek oranda artırdığından meyve tutumu için pratik bir çözüm olarak görünmemektedir. Bu nedenle örtü altı domates ve diğer bazı sebzelerin yetiştirilmesinde, hormon olarak bilinen bitki büyüme düzenleyici kimyasalların kullanımı zorunlu hale gelmiş ve son yıllarda kullanımı giderek artmıştır.

Yaygın olarak kullanılan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) bir herbisit olup; yine bu amaçla kullanılmak üzere Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na imaline 07.08.1964, ithaline ise 17.05.1971 yılından beri izin verilmektedir. Aynı amaçla 2,4-D ester halinde de kullanılabilir. 2,4-D esterinin imaline ise 02.01.1973'ten beri izin verilmektedir (Anonymous, 1992).

Aslında herbisit olan bu maddeler bitkilerde büyüme düzenleyici kimyasal olarak da kullanılabilir. Ancak kullanımındaki bilgi ve deneyim eksikliği nedeniyle, yanlış ve yüksek dozda 2,4-D uygulanması sonucu özellikle domates meyvelerinde koflaşmalar ve şekil bozuklukları gözlenmektedir. Diğer taraftan kanserojen olarak nitelenen bu tür maddelerin, domateslerin tüketilmesi ile insan sağlığını olumsuz etkileyebileceği de bildirilmektedir.

Klorlu fenoksiasetik asit grubunda yer alan 2,4-D ile insan hücre kültürleri üzerinde yapılan in-vitro çalışmalarda, bu bileşiğin düşük konsantrasyonlarda bile DNA hasarı meydana getirdiği ve dolayısıyla 2,4-D'nin genetik hasar oluşturma potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir. 2,4-D ile yapılan kanserojenite testlerinde bu etkinin değerlendirilebilmesinin yetersiz olduğu, ancak bu maddenin ko-kanserojenik etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalara göre de tümör oluşumunu hızlandırdığı belirtilmektedir (Burgaz, 1982).

Birleşmiş Milletler Gıda Tarım Teşkilatı (FAO) ve Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ortak komisyonu (Codex Alimentarius Commission), 1986 yılı şubat ayında 2,4-D

için bazı gıdalarda bulunabilecek en yüksek düzey ile ilgili sınırlamalar getirmiştir. Buna göre arpa, buğday ve çavdarda 0.5 mg/kg, turunçgillerde 2 mg/kg, et, süt ve yumurtada 0.05 mg/kg ve otlarda 0.5 mg/kg düzeyine kadar 2,4-D kalıntı düzeyine izin verilmiştir. Almanya ve diğer Avrupa ülkeleri ise kendi standartlarında bu miktarları buğday ve diğer hububat için 0.1 mg/kg olarak sınırlarken, taze meyve ve sebze için 0.2 mg/kg sınırını koymuşlardır(Gilsbach ve Thier, 1982; Ebing et al., 1985; Meemken et al., 1987). Ayrıca FAO/WHO ortak komisyonu, günlük vücuda alınabilecek en yüksek 2,4-D miktarını (ADI) ise 0.3 mg/kg insan vücut ağırlığı olarak belirlemiştir.

Ülkemizde 2,4-D' nin herbisit olarak kullanımına yasal olarak izin verildiği halde, 2,4-D uygulanmış ürünlerde 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesine yönelik kapsamlı bir çalışma henüz yapılmamıştır.

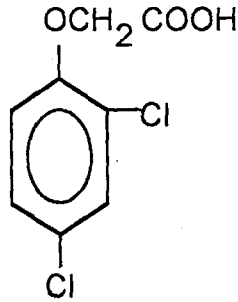
Yabancı literatürde, bitkisel materyallerde, toprakta, suda ve insan idrarındaki kalıntı 2,4-D düzeyinin saptanmasına yönelik birçok araştırma yer almaktadır. Bu araştırmaların hemen hepsinde gaz kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. 2,4-D gibi yüksek polariteye sahip bileşiklerin gaz kromatografik olarak tayin edilebilmesi için derivatize edilmeleri zorunludur (Roseboom et al., 1982). Ancak 2,4-D gibi bileşikler uçucu hale getirmek için uygulanan bu işlem analiz süresinin artmasına ve yöntemin daha kompleks bir hale gelmesine neden olmaktadır (Moye, 1981).

Buna karşılık 2,4-D, yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) ile derivatizasyona gerek duyulmadan serbest asit formunda analiz edilebilmektedir. Bu çalışmalar, şimdiye kadar birçok araştırmacı tarafından 2,4-D formülasyonlarında ve su örneklerinde yapılmıştır (Akerblom ve Lindgren, 1983; Cochrane et al., 1983; Grorud ve Forrette, 1983; Akerblom, 1985; Fayyad et al., 1989; Larson ve Houglum, 1991). Ancak bitkisel materyallerdeki kalıntı 2,4-D düzeyinin belirlenmesinde HPLC' nin kullanıldığı bir kalıntı analiz yöntemi bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, daha önce Specht ve Tillkes (1981) tarafından bitkisel materyallerdeki çeşitli fenoksikarboksilik asit kalıntılarının belirlenmesi amacıyla geliştirilen ve domatesler için uygun olduğu da saptanan gaz kromatografik yöntemin modifiye edilerek, domateslerdeki 2,4-D kalıntılarının HPLC ile saptanabilmesi olanaklarının araştırılmasıdır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2,4-D klorlu fenoksiasetik asit grubunda yer alan ve herbisit olarak kullanılan bir maddedir. Erime noktası 138°C olan 2,4-D, benzen, alkol, eter, kloroform vb. organik çözücülerde çözünürken; suda çok az çözünen beyaz kristal bir tozdur (Burgaz, 1982). 2,4-D' nin sudaki çözünürlüğü, 25°C' de 0.07 ppm' dir (Anonymous, 1981). 2,4-D' nin kimyasal açık formülü Şekil 2.1' de verilmiştir .



Şekil 2.1 : 2,4-D' nin açık kimyasal formülü (Burgaz 1982).

Özellikle kuvvetli kök sistemlerine sahip, geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde kullanılan 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asit herbisitlerin düşük dozlarda (2,5-10 ppm) bitkiler üzerindeki fizyolojik etkisi, bitkinin doğal büyüme hormonları gibi olup büyümeyi hızlandırmaktadır. Buna karşılık, yüksek konsantrasyonlarda (100-1000 ppm) aşırı ve kontrolsüz şekilde büyümeyi hızlandırarak bitkilerin ölümüne neden olmaktadır (Burgaz, 1982).

Bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler genel olarak şu aşamalardan oluşmaktadır:

- i. Ekstraksiyon
- ii. Ekstraktın temizlenmesi
- iii. Derivatizasyon
- iv. Kantitatif veya kalitatif tayin

2,4-D ve benzeri asidik herbisitler bitkisel materyallerde serbest, konjuge veya bağlı asit formlarında bulunabilmektedirler (Lokke, 1975; Jensen and Glas, 1981; Bristol et al., 1982). Asidik herbisitlerin karboksil grubu, bitkisel materyal içindeki herhangi bir bileşikle birleşmemiş durumda ise serbest, zayıf bir bağla bitki bileşenlerinden birine bağlı ise konjuge formdaki kalıntı oluşmaktadır. Eğer karboksil grubu bitki bileşenlerinden birine, ancak sıcak hidroliz ile parçalanabilen bir bağ ile bağlı ise, bu kez bağlı formdaki kalıntıdan söz edilir (Jensen and Glas, 1981).

Bitkisel materyallerdeki asidik herbisit kalıntılarının tayininde önceleri, asitlendirilmiş örneklerin eter, hekzan, dietileter/hekzan karışımı veya aseton gibi çözücülerle ekstrakte edildiği gaz kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu yöntemler ile sadece serbest formdaki kalıntılar belirlenebildiği bilinmektedir (Jensen and Glas, 1981).

Son zamanlarda literatürde yer alan çalışmalarda asidik, enzimatik veya alkali hidrolizi uygulamalarına rastlanmaktadır. Hidroliz yapıldığı durumlarda, doğrudan asitlendirilmiş organik çözücülerle ekstraksiyon uygulanan yöntemlere kıyasla daha yüksek düzeyde kalıntı saptandığı belirtilmektedir. Kalıntı miktarları arasındaki bu fark önceleri bağlı kalıntı olarak karakterize edilmiştir. Daha sonra yürütülen çalışmalarda ise, oda sıcaklığında seyreltik alkali ile ekstraksiyonun, sıcak alkali hidrolizi ile aynı düzeyde kalıntı verdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, bitkisel materyallerde 2,4-D ve diğer asidik herbisitlerin, bağlı formdan çok serbest ve konjuge formda buldukları ileri sürülmüştür (Jensen and Glas, 1981).

Jensen ve Glas (1981), buğday ve arpa örneklerinin yeşil kısımları ile sap ve tane kısımlarında, ayrı ayrı üç farklı yöntemle, gaz kromatografik olarak kalıntı 2,4-D tayini yapmışlardır. Bu çalışmada örnekler seyreltik alkali ile ekstraksiyon, asit hidrolizi ve alkali hidrolizi uygulanmış ve bu üç yöntemin sonuçları birbiriyle kıyaslanmıştır. Buğday ve arpa örneklerinin yeşil ve sap kısımları için 0.2 N NaOH, tane kısımları için ise 0.1 N NaOH ekstraksiyonu uygulanmıştır. İkinci grup örnekler için 0.5 N H₂SO₄ ile asit hidrolizi ve üçüncü grup örnekler için 1.0 N KOH ile alkali hidrolizi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar incelenmiştir. Buna göre, yeşil kısımlarda alkali hidrolizi ve alkali ekstraksiyonu uygulanarak yürütülen denemelerde hemen hemen aynı düzeyde kalıntı saptanırken, asit hidrolizi uygulanan aynı örneklerdeki kalıntı düzeyi daha düşük kalmıştır. Sap kısımlarında her üç yöntem ile elde edilen kalıntı 2,4-D düzeyi yaklaşık aynı olmuştur. Tane kısımlarında ise, alkali ve asit hidrolizi yöntemleriyle herhangi bir kalıntıya rastlanılamazken, alkali ekstraksiyonu uygulanan aynı örneklerde çok az da olsa 2,4-D kalıntısı bulunduğu belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar, buğday örnekleri ile yaptıkları bir başka çalışmada da, örneklerdeki 2,4-D kalıntısının tamamen ekstrakte edilebilmesi için en az 3 veya 4 aşamalı ekstraksiyon uygulanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, buğday örneklerindeki bilinen miktarda 2,4-D kalıntısını seyreltik sulu alkali çözeltisi ile arka arkaya 4 kez ekstrakte etmişler ve ardından substrata 1.0 N NaOH çözeltisi kullanarak alkali hidrolizi uygulamışlardır. Yeşil ve sap kısımlarındaki kalıntının %90-95' lik kısmı ilk

ekstraksiyon ile geri kazanılmıştır. Tanelerdeki kalıntının tamamı ise sadece tek ekstraksiyonla geri alınabilmiştir. Yeşil kısımlardaki kalıntının tamamı ise ancak dördüncü ekstraksiyondan sonra geri alınabilmiştir. Ekstraksiyondan arta kalan substrata 1.0 N NaOH ile hidroliz uygulanmış ve dördüncü ekstraksiyondan sonra örneklerde saptanabilir miktarda 2,4-D kalmadığı bildirilmiştir.

Smith (1985), buğday örneklerindeki 2,4-D kalıntı miktarını belirlemek için gaz kromatografik bir yöntem kullanmıştır. Araştırmacı, örnekleri önce seyreltik NaOH çözeltisi ile ekstrakte etmiş ve asitlendirdikten sonra organik çözücü ile ekstraksiyon uygulamıştır. Ekstrakt, metilasyondan sonra florasil kolonunda temizlenmiş ve elektron tutucu dedektör kullanılarak, gaz kromatografik olarak analiz edilmiştir. Geri kazanma oranları, 0.5 ve 1.0 mg/kg düzeylerinde 2,4-D ilave edilmiş örnekler için sırasıyla %83.3 ve %88.2 olarak elde edilmiştir. Araştırmacı alkali ekstraksiyonu uygulayarak bitki bünyesindeki tüm ester ve amin formundaki 2,4-D kalıntılarının fenoksiakonat anyonu haline dönüştürüldüğünü bildirmiştir.

Bevenue ve ark. (1963), patateslerde doğrudan asitlendirilmiş organik çözücü karışımıyla ekstraksiyon ile çok düşük düzeyde 2,4-D kalıntısı saptanabildiğini kaydetmişlerdir. Nelson ve ark. (1971) ise patatesleri ekstraksiyondan önce 6 N H₂SO₄ ile hidrolize ederek, doğrudan asitlendirilmiş benzen ile ekstraksiyona göre 2-7 kat daha fazla 2,4-D kalıntısı saptadıklarını görmüşlerdir. Benzer sonuçlar yeşil fasulyelerdeki 2,4-D kalıntılarının saptanmasına yönelik yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (Bristol et al., 1982).

Birçok çalışma, 2,4-D gibi klorlu fenoksi asitlerin bitki bileşenleri ile konjugasyon yaptıklarını doğrulamaktadır. Lokke (1975), hububat örneklerindeki klorlu fenoksi asit kalıntılarını belirlemek için asit/enzim hidrolizi, eter/hekzan ekstraksiyonu ve %65 asetonitril ile ekstraksiyon olmak üzere üç ayrı gaz kromatografik yöntem kullanmıştır. Araştırmacı, örnekleri %5 fosforik asit ile hidrolize ettikten sonra, ardından diyastaz enzimi ile 50°C' de 2 saat enzimatik hidrolize tabi tutmuş ve sonuçları eter/hekzan ekstraksiyonu ve %65 asetonitril ekstraksiyonu yöntemlerinde aldığı sonuçlarla kıyaslamıştır. Sülfürik asit varlığında eter/hekzan ekstraksiyonu ile bulunan kalıntı 2,4-D miktarının, kombine asit ve enzim hidrolizi ile elde edilen kalıntı miktarından yaklaşık 3-10 kat daha az olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık % 65 asetonitril ekstraksiyonu ile elde edilen kalıntı düzeyi ise, kombine asit ve enzim hidrolizi ile elde edilen kalıntı miktarı ile aynı düzeyde bulunmuştur.

Bristol ve ark. (1982) patateslerdeki serbest ve toplam hidrolize edilebilir 2,4-D ve 2,4-diklorofenol (2,4-DCP) kalıntılarını saptamaya çalışmışlardır. Serbest formdaki

kalıntının ekstraksiyonunda asitlendirilmiş etileter/petrol eteri karışımı kullanılmıştır. Hidrolize edilebilir kalıntının saptanmasında ise asit hidrolizi uygulanmış ve ardından serbest ve hidrolizlenmiş kalıntı, benzen ile ekstrakte edilmiştir. 2,4-D ve 2,4-DCP' nin kantitatif tayinleri metil ester formunda, gaz kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, patateslerdeki toplam 2,4-D' nin en az %18' inin konjuge formda bulunduğunu kaydetmişlerdir.

Cook ve ark. (1983) ise, Bristol ve ark. (1982) tarafından önerilen yöntemi modifiye ederek, 2,4-D ve 2,4-DCP uygulanmış darı örneklerindeki serbest ve konjuge formlardaki kalıntı düzeyini belirlemeye çalışmışlardır. Darı örneklerindeki 2,4-D ve 2,4-DCP kalıntılarının sadece % 15-19' luk gibi küçük bir kısmının serbest formda bulunduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca darı örnekleri için hem asit, hem de alkali hidrolizini denemişlerdir. Alkali hidrolizi sırasında meydana gelen aşırı köpüklenme, gaz kromatografik tayinde bazı sorunlara neden olmuş ve bu yüzden denemeler asit hidrolizi uygulanarak yürütülmüştür. Alkali hidrolizi sırasında meydana gelen köpüklenmenin neden olduğu sorunlar başka diğer araştırmacılar tarafından da kaydedilmiştir.

Specht ve Tillkes (1981), hububat ve çeşitli bitkisel örneklerdeki fenoksialkanoik asit kalıntılarını saptamak için gaz kromatografisi/elektron tutucu dedektör (GC/ECD) ve gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi (GC/MS) kullanmışlardır. Bu çalışmada, örnekler öncelikle 1.0 N NaOH ile kaynar su banyosunda hidrolize edilmiş, ardından alkali hidrolizat asitlendirilerek aseton:diklormetan:su ayırımı ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt Bio Beads S-X3 dolgulu jel kromatografi kolonunda temizlendikten sonra GC/ECD veya GC/MS ile analiz edilmiştir. Alkali hidrolizinden sonra uygulanan aseton:diklormetan:su ayırma işleminin emülsiyon oluşumunu engellediği görülmüştür. Gaz kromatografik analizler metil ester formunda gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar özellikle GC/ECD kullanıldığında, derivatizasyondan sonra mini silikajel kolonunda temizleme işlemi yapılmasını önermişlerdir.

Cessna (1990), yetiştirilmeleri sırasında 2,4-D uygulanmış buğday-çavdar melezi bitki örneklerinin yeşil ve tohum kısımlarında, alkali ekstraksiyonu uygulayarak kalıntı düzeyini gaz kromatografik olarak belirlemeye çalışmıştır. Araştırmacı ayrıca analizden önce yeşil kısımlara 0.1 mg/kg, tane kısmına ise 0.05 mg/kg düzeyinde 2,4-D ilave etmiştir. Geri kazanma oranları yeşil kısımlar ve taneler için sırasıyla %90 ve %75 olarak bulunmuştur.

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, 2,4-D' nin bitkisel materyal bünyesindeki formu da göz önüne alınarak, ekstraksiyondan önce asit veya alkali hidrolizi uygulandığı veya örnekteki kalıntının doğrudan seyreltik alkali ile ekstrakte edilmeye çalışıldığı görülmektedir.

Uygulanan ekstraksiyon yöntemi ne olursa olsun, ekstraktın mutlaka temizlenmesi gerekir. Genellikle ekstrakta uygulanan ilk temizleme işlemi asit/baz ayırmadır. Bunun için asitlendirilmiş organik ekstrakt, seyreltik sulu alkali çözeltisi ile ekstrakte edilir. Böylelikle renkli organik faz atılırken, daha az renkli, 2,4-D içeren sulu faz ayrılmış olur (Munro, 1972; Cessna, 1980; Jensen and Glas, 1981; Bristol et al., 1982; Cook et al., 1983; Erner and Coggins, 1989).

Ekstraktın daha etkin bir şekilde temizlenmesi için ise çoğunlukla kolon veya jel kromatografisi kullanılmaktadır. Kolon kromatografisi daha çok örnek derivatize edildikten sonra uygulanan bir temizleme işlemidir. Kolon dolgu maddesi olarak silikajel, alüminyum oksit, asidik alüminyum veya florasil kullanıldığı görülmektedir (Popov, 1979; Samoïlov et al., 1979; Cessna, 1980; Specht and Tillkes, 1981; Bristol et al., 1981; Bristol et al., 1982; Roseboom et al., 1982; Sekita et al., 1982; Cook et al., 1983).

Bazı çalışmalarda ise kolon dolgu maddesi olarak polistiren jel yapıdaki maddelerin kullanıldığı bilinmektedir. Bunlar arasında Amberlite XAD-2, Separon SE sorbent ve polistirendivinilbenzen kopolimeri yer almaktadır (Pietrzyk and Chu, 1977a; Pietrzyk and Chu, 1977b; Smith and Hayden, 1979; Specht and Tillkes, 1981; Smith and Pietrzyk, 1983; Klement et al., 1986).

Specht ve Tillkes (1981), 11 fenoksialkanoik herbisitinin tayininde, ekstraksiyondan sonra jel kromatografik temizleme uygulamışlardır. Araştırmacılar, dolgu maddesi olarak Bio Beads S-X3' ü kullanmışlar ve başarılı sonuç almışlardır.

Fenoksikarboksilik asitlerin kalıntı analizlerinin son aşamasında, kalitatif ve kantitatif olarak spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir (Burgaz, 1982; Akerblom and Lindgren, 1983; Adolfsson and Renberg, 1991). Bunlardan spektrofotometrik yöntemler, özellikle de kütle ve infrared spektrofotometresi daha çok doğrulama amaçlı olarak kullanılmaktadır (Burgaz, 1982).

Son 20 yıldır, bitkisel materyallerdeki kalıntı 2,4-D ve benzeri asidik herbisitlerin tayinine yönelik geliştirilen yöntemlerin hemen tamamen gaz kromatografik yöntemler olduğu dikkati çekmektedir (Yip, 1971; Munro, 1972; Renberg, 1974;

Lokke, 1975; Smith and Hayden, 1979; Cessna, 1980; Bristol et al, 1981; Moye, 1981; Specht and Tillkes, 1981; Bristol et al., 1982; Cook et al., 1983; Sell and Maitlen, 1983; Specht and Tillkes, 1985; Waliszewski and Waliszewski, 1987; Allander, 1989; Erner and Cogging, 1989; Steinwandter, 1989; Cessna, 1990; Brondz and Olsen, 1992). Ancak 2,4-D gibi yüksek polariteye sahip bileşikler, gaz kromatografik tayinlerinden önce mutlaka derivatize edilmek zorundadırlar (Mierzwa and Witek, 1976; Jensen and Glas, 1981; Roseboom et al., 1982; Akerblom and Lindgren, 1983; Waliszewski and Szymczynski, 1985; Allander, 1989; Fayyad et al., 1989).

Fenoksikarboksilik asit herbisitlerin derivatizasyonu amacıyla geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında metilasyon, pentaflorobenzilasyon, etilasyon ve trikloroetilasyon sıkça rastlanılan yöntemlerdir (Jensen and Glas, 1981; Roseboom et al., 1982; Wong, 1982; Brondz and Olsen, 1992). Ancak metilasyon, reaksiyonunun kolaylığı ve verimi açısından daha çok tercih edilmektedir (Roseboom et al., 1982).

Fenoksikarboksilik asitlerin metil esterlerinin eldesinde derivatizasyon ajanı olarak diazometan, metanol/borontriflorid, dimetilsülfat/metanol ve metanol/sülfürik asit kullanılmaktadır (Munro, 1972; Renberg, 1974; Lokke, 1975; Popov, 1979; Smith and Hayden, 1979; Cessna, 1980; Specht and Tillkes, 1981; Sekita et al., 1982; Klement et al., 1986; Erner and Coggins, 1989; Cessna, 1990). Önceleri en çok kullanılan derivatizasyon ajanı diazometan iken, bu maddenin toksik ve kanserojen olması son yıllarda kullanımını sınırlamıştır (Brondz and Olsen, 1992). Buna karşılık metanol/sülfürik asit metilasyonu, kolay ve verimli bir yöntem olarak başarıyla kullanılmaktadır (Specht and Tillkes, 1981; Specht and Tillkes, 1985).

Bununla birlikte, 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asitlerin gaz kromatografik olarak tayinlerinde uygulanan derivatizasyon işleminin bazı dezavantajları bulunmaktadır (Moye, 1981). Bunlar şöyle sıralanabilir:

- a. Derivatizasyon sırasında oluşan yan ürünler, kromatografik tayinde aranılan maddenin separasyonunu engelleyerek yöntemin duyarlılığını düşürmektedir.
- b. Derivatizasyon reaksiyonunun verimi uygulanan yöntemle göre değişmekte ve her zaman aynı oranda gerçekleşmemektedir. Bu da yöntemin tekrar edilebilirliğini engellemektedir.

c. Derivatizasyon sırasında oluşan reaksiyon yan ürünlerinin temizlenmesi için uygulanan ek işlemler hem yöntemin süresini uzatmakta, hem de yöntemin maliyetini yükseltmektedir.

Buna karşılık, fenoksikarboksilik asit herbisitler, serbest asit formunda, derivatizasyona gerek duyulmadan HPLC ile analiz edilebilmektedir. Bu, analizi önemli ölçüde basitleştirip, hızlandırmaktadır. Bu tür maddelerin HPLC ile analizlerindeki en büyük problem ise duyarlılığın düşük olmasıdır. Ayrıca dedeksiyon dalga boyu spesifik değildir. Ancak bazı araştırmacılar, fenoksikarboksilik asitlerin metilmetoksikumarin veya naftasil esterleri formunda analiz edildiğinde duyarlılığın arttığını bildirmektedirler (Roseboom et al., 1982).

Son yıllarda, bitkisel materyallerdeki birçok farklı pestisit kalıntısının tayininde gaz kromatografisi yerine, HPLC kullanılmaya başlandığı görülmektedir (Moye, 1981). Ancak, 2,4-D gibi asidik herbisitlerin bitkisel materyallerdeki kalıntılarının HPLC ile saptanmasına yönelik bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte su gibi basit yapılı örneklerdeki 2,4-D kalıntılarının saptanmasında, 2,4-D formülasyonlarının saflık oranlarının belirlenmesinde ve herbisit formülasyonları içindeki kanserojen nitelikli fenolik safsızlıkların miktar tayininde HPLC kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Drinkwine et al., 1979; Moye, 1981; Roseboom et al., 1982; Cochrane et al., 1982; Smith and Pietrzyk, 1983; Grorud and Forrette, 1983; Akerblom and Lindgren, 1983; Grorud and Forrette, 1984; Akerblom, 1985; Wells and Michael, 1987; Wigfield and Lanouette, 1987; Geerdink et al., 1989; Fayyad et al., 1989; Larson and Hougum, 1991; Mattina, 1991a; Mattina, 1991b).

HPLC ile 2,4-D tayininde genellikle UV dedektörler kullanılmaktadır. Ancak bazı araştırmacılar, likit kromatografik sistemin kütle spektrofotometresi ile birlikte kullanılması ile duyarlılığının da arttığını ileri sürmektedir (Mattina, 1991a; Mattina, 1991b).

Roseboom ve ark. (1982), 2,4-D ve diğer bazı fenoksikarboksilik asit herbisitlerin tayininde HPLC mobil fazı olarak farklı oranlarda fosfat (PO_4^{-3}) tamponu ve hegzadesiltrimetilamonyum bromid (setrimit) içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımını kullanmışlardır. Araştırmacılar, farklı mobil fazların, ters faz C_{18} kolonda, 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asitlerin separasyon faktörlerini belirlemeye çalışmışlar ve 2,4-D için 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımının en iyi sonucu verdiğini görmüşlerdir. Bu çalışmada ayrıca 2,4-D'nin serbest asit formunda spesifik dedeksiyon dalga boyunun 280 nm olduğu da belirlenmiştir.

Grorud ve Forrette (1983), 2,4-D, 3,6-dikloro-o-anizik asit (Dicamba) ve 2-(4-kloro-2-metilfenoksi) propiyonik asit (MCP) içeren herbisit formülasyonları içindeki aktif madde ve safsızlıkların oranını HPLC ile belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada ters faz C₁₈ kolon ve mobil faz olarak 78:22 (v/v) ve 67:33 (v/v) oranlarında birleştirilmiş asetonitril : su karışımları kullanılmıştır. Araştırmacılar, her üç maddenin separasyonunun tek bir kromatogramda başarıyla sağlayabildiklerini kaydetmişlerdir.

Cochrane ve ark. (1983), farklı pH değerlerinde ve farklı oranlarda karıştırılmış asetonitril:fosfat tamponu karışımlarını kullanarak, çeşitli fenoksikarboksilik asit herbisit formülasyonlarını ters faz C₁₈ kolonda HPLC ile analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, 2,4-D tayini için pH değeri 4.0 olan asetonitril:fosfat tamponu (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında en iyi sonuçları aldıklarını bildirmişlerdir.

Akerblom ve Lindgren (1983), bazı herbisit formülasyonlarındaki fenolik safsızlıkların belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, mobil faz olarak 45:55 (v/v) ve 55:45 (v/v) oranlarında birleştirilmiş metanol : 0.1 M asetik asit karışımlarını kullanmışlar, ancak fenolik safsızlıkların belirlenmesinde UV dedeksiyonunun yeterince iyi olmadığını, bunun yerine elektrokimyasal dedektör kullanıldığında duyarlılığın arttığını bildirmişlerdir.

Akerblom (1985), çeşitli su örneklerindeki 2,4-D kalıntı miktarlarını HPLC ile belirlemiştir. Su örneklerini öncelikle bir ön-kolondan geçirilerek konsantre edilmiş, ardından da HPLC' de analiz edilmiştir. Mobil faz olarak metanol : 0.1 M asetik asit (50:50, v/v) karışımı kullanılmış ve separasyon ters faz C₁₈ kolonda gerçekleştirilmiştir. Su örneklerinde 2,4-D' nin dedeksiyon limiti 5-10 mg/l ve geri kazanma oranı da yaklaşık % 100 olarak bulunmuştur.

Larson ve Houglum (1991), Dicamba, 2,4-D ve MCP içeren herbisit formülasyonlarını, likit kromatografik bir yöntemle, ters faz C₁₈ kolon kullanarak analiz etmişlerdir. Araştırmacılar örnekleri izopropil alkol : su (2+1) karışımı içinde çözerek yine aynı karışım ile uygun konsantrasyonlara seyreltmişlerdir. Çalışmada asetonitril:su karışımı gradiyent mobil faz olarak kullanılmıştır. Buna göre ilk beş dakika 25:75 (v/v) asetonitril : su ve daha sonra 10 dakika boyunca da 40:60 (v/v) asetonitril : su karışımı olacak şekilde ayarlama yapılmıştır. Böylece her üç herbisit de iyi bir şekilde ayrılabilirdiği gözlenmiştir.

Bitkisel materyallerde gaz kromatografik yöntemlerle 2,4-D kalıntılarının saptanması konusunda çalışan bazı araştırmacılar kullandıkları yöntemin bazı modifikasyonlarla

HPLC' ye uyarlanabileceğini bildirmektedirler (Specht and Tillkes, 1981). Ayrıca çeşitli fenoksikarboksilik asitlerin serbest asit formunda HPLC ile tayin edilmesi konusunda geliştirilen bir yöntemin, bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntılarının belirlenmesinde de kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Roseboom et al., 1982).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma materyali

Denemelerde Ankara piyasasından yaz aylarında sağlanan, 2,4-D uygulanmamış tarla domatesleri materyal olarak kullanılmıştır.

Domates örnekleri analiz edilinceye kadar, polietilen torba içinde -18 °C' deki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar ve diğer yardımcı maddeler

Denemelerde kullanılan 2,4-D analitik saflıkta olup Merck (Almanya) firmasından sağlanmıştır. 2,4-D standart çözeltilerinin hazırlanışı Bölüm 3.2.1.3' de verilmiştir. Metanol (Merck), asetonitril (Merck), izopropil alkol (Merck), aseton (Merck), diklormetan (Merck), etilasetat (Merck) ve n-hekzan (Merck) gibi organik çözücüler HPLC kullanımı içindir. NaHCO₃ (Merck) sudaki (soğuk çözülmüş) %4' lük (g/g) çözeltisi, Na₂SO₄ (Merck) sudaki %5' lik (g/g) çözeltisi ve H₂SO₄ (Merck) sudaki %20' lik (g/g) çözeltisi kullanılmıştır. NaOH (Merck) 0.5 ve 1 N konsantrasyonlarında suda hazırlanmıştır.

Anhidroz Na₂SO₄ (Merck) ve NaCl (Merck) 500 °C' de 2 saat kurutulmuş ve kullanılıncaya kadar desikatörde muhafaza edilmiştir. Denemelerde kullanılan filtre kağıtları (Schleicher&Schull 589¹ siyah bant) ve cam pamuğu (Merck) diklormetan ile ekstrakte edildikten sonra ağzı kapalı bir kapta muhafaza edilmiştir.

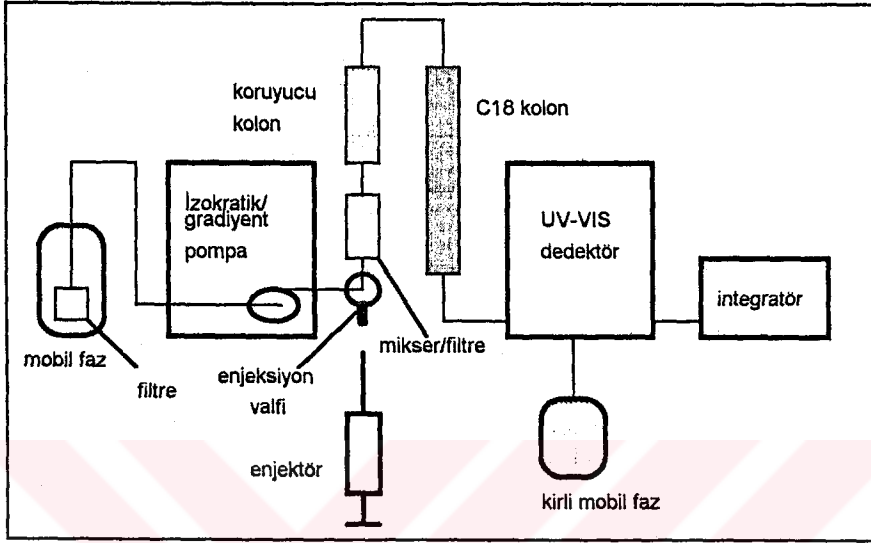
3.2. Metot

3.2.1. Yüksek Performans Likit Kromatografisi (HPLC) ile 2,4-Dikloro-fenoksiasetik Asit (2,4-D) Tayini

3.2.1.1. HPLC sistem elemanlarının tanıtılması

Çalışmada Varian Star model likit kromatografi cihazı kullanılmıştır. Bunun için izokratik çalışmalarda Varian 9001 model ve gradiyent çalışmalarda 9010 model pompa, Rheodyne model 7125 altı yollu, 10 µl kapasiteli örnek tutma hücresi bulunan enjeksiyon valfi ve 280 nm' de çalıştırılan Varian 9050 model , dalga boyu ayarlanabilir UV-VIS dedektör ile bağlanmıştır. Çalışmada paslanmaz çelikten yapılmış, 15 cm x 4.6 mm (iç çap) boyutlarında, oda sıcaklığında çalışan, 5 µm partikül büyüklüğündeki oktadesil (C₁₈) grupları ile doldurulmuş kolon kullanılmıştır. Kolon, analizden önce en az 2 saat mobil faz ile kondisyonlanmıştır. Ayrıca analitik

kolonun kullanım ömrünü uzatmak için hat üzerine 4 cm x 4.6 mm iç çap boyutlarında bir koruyucu kolon monte edilmiştir. Kromatografik sonuçlar Varian 4400 model integratör ile kaydedilmiştir. HPLC sistem elemanlarının sıralanışı Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : HPLC sistem elemanlarının yerleşimi

3.2.1.2. 2,4-D tayini için mobil faz seçimi

Araştırmanın başlangıcında izokratik pompa ile çalışılmış ve 3 ayrı mobil faz kullanılarak, HPLC' de 2,4-D tayini yapılmıştır. Kullanılan mobil fazların bileşimleri şöyledir:

- I. 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M hegzadesiltrimetilamonyumbromid (setrimit) içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı (Roseboom ve ark., 1982)
- II. Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı
- III. Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı

Larson ve Houglum (1991) asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımını gradiyent olarak kullanmışlar ve 2,4-D tayininde iyi sonuç almışlardır. Bu çalışmada ise asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı yukarıda belirtilen oranlarda izokratik olarak 2,4-D ve 2,4-DME tayininde kullanılmıştır.

Çalışmaya daha sonra gradiyent pompa ile devam edilmiş ve önce Larson ve Houglum (1991) tarafından önerilen gradiyent program kullanılmıştır. Buna göre asetonitril ve %2 asetik asit kompozisyonlarının zamanla değişimi şöyledir:

	t =0. dak.	t =5. dak.	t =15.dak.	t =20.dak.
Asetonitril	%25	%25	%40	%40
%2 asetik asit	%75	%75	%60	%60

Ancak bu gradiyent program ile iyi sonuç alınamamış ve uygulanan zaman programında bazı değişiklikler yapılmıştır. Buna göre asetonitril ve %2 asetik asit kompozisyonlarının zamanla değişimi ise aşağıdaki gibidir:

	t =0. dak.	t =3. dak.	t =7. dak
Asetonitril	%40	%50	%50
%2 asetik asit	%60	%50	%50

Kullanılan mobil fazların pH değerleri Schott CG 840 model pH-metre ile ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Araştırmada kullanılan mobil fazlara ait pH değerleri.

Mobil Faz	pH
Metanol : su (0.001 M PO_4^{-3} , 0.005 M setrimit; 75:25)	5.62
Asetonitril : %2 asetik asit (75:25)	3.50
Asetonitril : %2 asetik asit (50:50)	3.00
Asetonitril : %2 asetik asit (gradiyent)	2.80-3.00

Araştırmada kullanılan metanol ve asetonitril HPLC kalitesinde seçilmiş ve Büchi Fontavapor 285 model bidestile su cihazı ile elde edilen bidestile su kullanılmıştır. Setrimit (Merck) çözeltisi 0.03 M konsantrasyonda metanolde hazırlanmıştır. Fosfat tamponu ise bidestile su içerisinde hazırlanmış 0.25 M K_2HPO_4 (Merck) ve 0.25 M NaH_2PO_4 (Merck) çözeltilerinin eşit oranda karıştırılması ile elde edilmiştir. Mobil faz bileşenleri hazırlanıp, uygun oranda birleştirildikten sonra por büyüklüğü 0.45 μm olan rejenere selüloz asetat (Sartorius) filtreden geçirilmiştir. Mobil faz karışımları içindeki gaz kabarcıkları kullanılmadan önce ultrasonik banyoda (Branson 2200), 90 dakika tutularak uzaklaştırılmıştır. Bidestile su içindeki gaz kabarcıklarının uzaklaştırılmasında ise ayrıca vakum uygulanmıştır.

Metanol, izopropil alkol ve su kullanılmadan önce 0.45 μm rejenere selüloz asetat filtreden geçirilmiştir. İzopropil alkol:su karışımı 75:25 (v/v) olarak hazırlanmıştır. Mobil faz olarak 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v)

karışımı kullanıldığında metanolde hazırlanan, asetonitril : %2 asetik asit (75:25, 50:50 ve gradiyent) karışımları kullanıldığında ise izopropil alkol: su (75:25, v/v) karışımında hazırlanan standart çözeltiler kullanılmıştır.

3.2.1.3. 2,4-D ve 2,4-DME standart çözeltilerinin hazırlanması

2,4-D standart çözeltileri 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 ng/µl konsantrasyonlarında olacak şekilde 1000 ng/µl' lik stok çözeltiden hem metanolde, hem de izopropil alkol: su (75:25, v/v) karışımı içinde hazırlanmıştır.

2,4-D metil esteri (2,4-DME) standartlarının hazırlanmasında Specht ve Tillkes (1981) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Elde olunan 2,4-DME' deki esterleşme düzeyinin kontrolü için Biologische-Bundesanstalt Berlin /Almanya' dan sağlanan saf 2,4-DME ile karşılaştırılmış ve elde olunan 2,4-DME' de esterifikasyonun %93.5 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Bu amaçla 2,4-D' nin metanolde hazırlanmış 10 ng/µl' ik çözeltisinden 4.5 ml alınıp üzerine damla damla 0.5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilmiş ve cam kabın tıraşlı kapağı derhal kapatılmış, kap arada sırada hafif çalkalanarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 50 ml %5' lik Na₂SO₄ çözeltisi ve 10 ml n-hekzan ilave edilerek 1 dakika süreyle çalkalanmış ve 100 ml' lik ayırma hunisine aktarılmıştır. Ayırma hunisinde fazların ayrılması için bir süre beklenmiş ve alttaki sulu faz atılmıştır. Hekzan fazı 50 ml % 4' lük NaHCO₃ çözeltisi ile 1 dakika süreyle çalkalanmış ve sulu faz ayrılarak atılmıştır. Hekzan fazı anhidroz Na₂SO₄ kaplanmış siyah bant filtre kağıdı ve cam pamuğu üzerinden filtre edilerek 25 ml' lik armut balona aktarılmıştır. Daha sonra hekzan, Rotary evaporatör (Büchi R110) kullanarak 40°C' deki su banyosunda uçurulmuştur. Balon içeriği daha sonra azot gazı akımında tamamen kurutulmuştur. Kurutulmuş kalıntı 4.5 ml metanolde veya izopropil alkol:su karışımı (75:25, v/v) içinde yeniden çözülmüştür. Bu çözeltilerin yaklaşık 10 ng/µl konsantrasyonunda olduğu kabul edilmiş ve buradan 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 ng/µl konsantrasyonlarındaki 2,4-DME standart çözeltileri hazırlanmıştır.

Başlangıçta düzgün ve tekrar edilebilir bir kromatogram elde edilinceye kadar 1 ng/µl' lik standart 2,4-D veya 2,4-DME çözeltisi sürekli olarak sisteme enjekte edilmiş, ardından diğer standart çözeltiler karışık düzende analiz edilmiş ve standart eğriler çizilmiştir.

Kullanılan mobil faz karışımlarının 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarında 2,4-D ve 2,4-DME tayinine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca 2,4-D analizlerinde en iyi sonuçların

alındığı asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v) ile tekrar edilebilirlik denemeleri yapılmıştır.

3.2.2. 2,4-D ve 2,4-DME için spesifik dedeksiyon dalgaboyunun saptanması

Spesifik dedeksiyon dalgaboyunun saptanması amacıyla 2,4-D ve 2,4-DME' nin izopropil alkol:su karışımı (75:25, v/v) içinde 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlanan standart çözeltileri kullanılmıştır.

Hazırlanan standart çözeltilerin dalgaboyu taramaları, Shimadzu 2101 model UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 200-400 nm dalgaboyları arasında yapılmıştır.

3.2.3. Domates örneklerinde kalıntı 2,4-D miktarının belirlenmesi

Bu amaçla, Specht ve Tillkes (1981) tarafından bitkisel materyallerde gaz kromatografisi yardımıyla 2,4-D tayini için önerilen yöntem önce hiçbir farklılık yapmadan olduğu gibi uygulanmıştır. Daha sonra elde olunan sonuçlar incelenmiş ve bu konudaki diğer kaynaklar da gözönüne alınarak belirtilen yöntemde bazı değişiklikler gerçekleştirilmiştir.

Önce parçalanmış domates örneklerine 0.0 (kontrol), 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg olacak şekilde 2,4-D ilave edildikten sonra Specht ve Tillkes (1981) tarafından önerilen yöntem gereğince örnekler temizlenmiş, ardından esterifikasyon uygulanarak ve uygulanmadan HPLC yardımıyla 2,4-D tayini yapılmıştır. Bu yöntemde yapılan tüm değişiklikler, yöntemin uygulanışı içinde yer yer verilmektedir.

3.2.3.1. Domateslerin parçalanması

-18 °C' de dondurucuda saklanan domatesler, analizden önce yumuşayınca kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sap kısmı ayrıldıktan sonra domatesler parçalayıcıda (Waring Blender) iyice parçalanmıştır. Parçalanmış domateslerin bir kısmı kuru madde tayini için ayrılmıştır.

3.2.3.2. Hidroliz

Darası alınmış 400 ml' lik bir beher içine 25 g parçalanmış domates konulduktan sonra bunun üzerine sırasıyla 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg 2,4-D olacak şekilde 2,4-D standart çözeltilerinden ilave edilmiş ve bir cam baget ile iyice karıştırılmıştır. Kontrol örneğe 2,4-D ilavesi yapılmamıştır. Daha sonra behere 15 ml 1 N NaOH ve 60 ml su ilave edilmiştir. Beher içeriğinin ağırlığı (A) kaydedilmiş ve sonra sıcaklığı yaklaşık 95 °C olan su banyosunda 2 saat süreyle hidrolize edilmiştir. Beher içeriği soğutulduktan sonra ağırlığı saf su ile ilk ağırlığı olan A' ya tamamlanmıştır.

3.2.3.3. Ekstraksiyon (1)

Alkali hidrolizat 5 ml %20' lik H_2SO_4 ile asitlendirildikten sonra ($pH \leq 1.0$), 200 ml aseton ilave edilerek 2 dakika, Virtis marka homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiş ve siyah bant filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrat hacmi (V_f) kaydedilmiş ve filtrat 1000 ml' lik ayırma hunisine aktarıldıktan sonra bu hacmin 1/10' u kadar gram NaCl ilave edilip 3 dakika kuvvetlice çalkalayarak doyurulmuştur. Daha sonra üzerine 100 ml diklormetan ilave edilip, 1000 ml' lik ayırma hunisi içinde 2 dakika çalkalanmıştır. Fazların ayrılması için 30 dakika beklenmiştir. Süre sonunda alttaki sulu faz ve varsa emülsiyon fazı atılmış ve organik faz 500 ml' lik ölçü silindrine aktarılarak, hacmi (V_0) kaydedilmiştir. Ekstrakt içindeki örnek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$V_0 \text{ içindeki örnek miktarı (g)} = \frac{S \times V_f}{T}$$

Burada ;

- S : Tartılan örnek miktarı (g)
- V_f : Filtrat hacmi (ml)
- T : Aseton-su ekstraktının toplam hacmi (ml)

olarak kullanılmıştır. T hacmi, 200 ml aseton, 15 ml 1 N NaOH, 60 ml su, 5 ml %20'lik H_2SO_4 ve örnek içindeki su miktarının toplam hacmidir. T hesaplanırken hacim kontraksiyonu göz önünde bulundurulmuştur (200 ml aseton ve 100 ml su için bu değer 5 ml' dir ve toplam hacim 295 ml alınmalıdır).

Emülsiyon fazı bulunduğu durumlarda berrak kısmın hacmi filtrasyondan önce V_1 olarak ölçülmelidir. Bu durumda V_1 içindeki örnek miktarı şöyle hesaplanır:

$$V_1 \text{ içindeki örnek miktarı (g)} = \frac{S \times V_f}{T} \times \frac{V_1}{V_{\text{teorik}}}$$

$$V_{\text{teorik}} = V_f - \frac{V_f \times W_t}{T} + 100$$

Burada;

- S : Tartılan örnek miktarı (g)
- V_1 : Organik fazın berrak olan kısmının hacmi (ml)
- V_{teorik} : Organik fazın teorik hacmi (ml)
- T : Aseton-su ekstraktının toplam hacmi, ml
- V_f : Filtrat hacmi, ml
- W_t : İlave edilen su + 15 ml 1 N NaOH + 5 ml %20 H_2SO_4 + örnekteki suyun toplamı (ml)

Organik faz, içinde 20-30 g anhidroz Na_2SO_4 bulunan 500 ml' lik erlenmayere alınmış, 20 dakika çalkalayarak kurutulmuştur. Kurutulmuş ekstrakt daha sonra, üzeri anhidroz Na_2SO_4 ile kaplanmış siyah bant filtre kağıdından geçirilerek 500 ml' lik altı yuvarlak balona aktarılmıştır. Filtre tabakası 2 kez 20 ml diklormetan ile yıkanmış ve hepsi bir balonda toplanmıştır. Balon içeriği, 40 °C' deki rotasyon evaporatörde, son hacim yaklaşık 2 ml oluncaya kadar evapore edilmiştir. Örnek üzerine hava üflenerek tamamen kuruması sağlanmıştır. Ancak bu son işlem çok zaman aldığından ön denemelerden sonraki örneklerde Ebing ve arkadaşları (1985) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla kalıntı, pipetle 25 ml' lik bir cam kaba 7.5 ml etilasetat ile aktarılmış, 3 g NaCl ilave edilip 1 dakika çalkalanmıştır. Üzerine 7.5 ml sikloheksan eklenerek tekrar 1 dakika daha çalkalanmıştır. Daha sonra 100 ml' lik ayırma hunisine alınarak faz ayırımı için beklenilmiştir. Sulu faz alt kısımdan alındıktan sonra üst kısımdaki organik faz Amberlite XAD-2 kolonunda temizlenmiştir.

3.2.3.4. Ekstraktın Amberlite XAD-2 kolonunda temizlenmesi

Ekstraktın temizlenmesinde, 40 cm x 14 mm (iç çap) boyutlarında, teflon musluklu cam kolon kullanılmıştır. Kolonun alt kısmına bir miktar cam pamuğu yerleştirilip, üzerine 5 g Amberlite XAD-2 (Sigma) doldurulmuştur. Kolon kullanılmadan önce sırasıyla 50 ml bidestile su (5 ml/dak), 50 ml 0.1 M NaHCO_3 / %80 asetonitril (2 ml/dak) ve 50 ml bidestile su (5 ml/dak) ile yıkanmıştır (Smith ve Hayden, 1979).

Ekstrakt, 5 ml/dakika hızında Amberlite XAD-2 kolonundan geçirilmiştir. Daha sonra kolondan 10 ml etilasetat:sikloheksan (1:1) karışımı geçirilmiş, eluat toplanarak 100 ml' lik ayırma hunisine aktarılmıştır. Eluat 2 kez 30 ml %4' lük NaHCO_3 ile ekstrakte edilmiş ve sulu faz erlenmayerde toplanmıştır (Eluat I) (Specht ve Tillkes, 1981).

Ancak Specht ve Tillkes(1981)' in Bio Beads S-X3 kolonundaki temizleme için önerdiği bu işlemlerin, örneğin temizlenmesinde yeterli olmadığı daha sonraki aşamalarda saptanmıştır. Bu nedenle kolonda temizleme aşamasında da bir farklılık yapılmıştır. Bu amaçla yukarıda belirtildiği şekilde (Bölüm 3.2.3.3) elde olunan organik ekstraktın (V_0) temizlenmesinde Bristol ve arkadaşları (1982) ile Jensen ve Glas (1981) tarafından önerilen yöntemler denenmiştir. Bristol ve arkadaşları (1982) tarafından önerilen 0.5 N NaOH ile ekstraksiyon ve temizleme daha iyi sonuç verdiği için bundan sonraki denemelerde aşağıda belirtildiği şekilde çalışılmıştır.

Bölüm 3.2.3.3' de belirtildiği şekilde elde edilen organik ekstraktın NaOH ile temizlenmesi amacıyla, organik ekstrakt (V_0) 1000 ml' lik ayırma hunisinde arka arkaya 100 ve 50 ml 0.5 N NaOH ile çalkalanmıştır. Daha renkli olan organik faz atılmıştır. Bu şekilde asit/baz ayırımı ile ekstraktın ön temizlenmesi sağlanmıştır. 0.5 N NaOH ekstraktları birleştirilip %20 H_2SO_4 ile $pH \leq 1.0$ dolaylarına asitlendirildikten sonra 5 ml/dakika akış hızında Amberlite XAD-2 kolonundan geçirilmiştir (Eluat II).

Smith ve Hayden (1979) tarafından bildirildiği gibi pH değeri ≤ 1.0 dolaylarında olan ekstrakt Amberlite XAD-2 kolonuna verildiğinde, 2,4-D kolon dolgu maddesi tarafından tutulmaktadır. Bu nedenle örnek Amberlite XAD-2 kolonundan geçirilmeden önce $pH \leq 1.0$ dolaylarına asitlendirilmiş ve sonra 5 ml/dakika akış hızında kolondan geçirilmiştir. Daha sonra kolon, elde olunan eluatın pH değeri pH kağıdı ile kontrol edilerek ~ 7.0 dolaylarına gelinceye kadar bidestile su ile yıkanmış ve eluatlar atılmıştır. Ardından kolon alkali ile yıkanarak 2,4-D' nin dolgu materyalinden ayrılması sağlanmıştır. Bu amaçla kolon 2 ml/dakika akış hızında 50 ml 0.1 M $NaHCO_3$ / %80 asetonitril ile yıkanmış ve eluat bir erlenmayerde toplanmıştır (Eluat II).

3.2.3.5. Ekstraksiyon (2)

Bölüm 3.2.3.4.' de belirtildiği gibi farklı iki şekilde Amberlite XAD-2 kolonunda temizlenen I ve II eluatları tekrar farklı işlemler uygulanarak ekstrakte edilmişlerdir. Bu amaçla önce elde olunan bikarbonat eluatı (I) %20' lik H_2SO_4 ile $pH \leq 1.0$ dolaylarına, pH kağıdı ile kontrol ederek asitlendirilmiştir. Bu sırada oluşan CO_2 hafif hafif çalkalayarak giderilmiştir. Asitlendirilmiş bikarbonat fazı 100 ml' lik ayırma hunisinde 3 kez 20 ml diklormetan ile ekstrakte edilmiştir. Diklormetan ekstraktları birleştirilip 20 ml bidestile su ile yıkanmış ve üzeri anhidroz Na_2SO_4 ile kaplanmış siyah bant filtreden geçirilmiştir. Daha sonra filtre tabakası diklormetan ile yıkanmış ve hepsi 250 ml' lik altı yuvarlak bir balonda toplanmıştır. Balon içeriği $40^\circ C$ ' deki rotasyon evaporatörde kuruyuncaya kadar buharlaştırılmıştır. Daha sonra evaporasyon kabındaki kalıntının tamamen kuruması için bir süre de azot gazı akımında tutulmuştur.

Amberlite XAD-2 kolonundan Bölüm 3.2.3.4' de belirtildiği gibi 0.1 M $NaHCO_3$ ile alınan eluat (II) ise, 2 ml %20' lik H_2SO_4 ile asitlendirildikten sonra 250 ml' lik ayırma hunisinde 2 kez 50 ml diklormetan ile ekstrakte edilmiştir. Diklormetan ekstraktları birleştirilip yine aynı şekilde üzeri anhidroz Na_2SO_4 kaplı siyah bant filtre kağıdından geçirilerek 500 ml' lik altı yuvarlak balona aktarılmıştır. Daha sonra

eluat I için uygulanan koşullarda rotary evaporatörde buharlaştırılmış ve azot gazı akımında kurutulmuştur.

Yukarıda belirtildiği şekillerde elde olunan kalıntılar izopropil alkol:su karışımında (75:25) çözülerek HPLC' de serbest asit formunda veya metanol / H₂SO₄ esterifikasyonu uygulandıktan sonra metil esteri formunda analiz edilmişlerdir.. Domateste kalıntı 2,4-D tayini için uygulanan yöntemlerin tüm aşamaları, ana hatlarıyla Şekil 3.2' de verilmiştir.

3.2.3.6. Esterleştirme

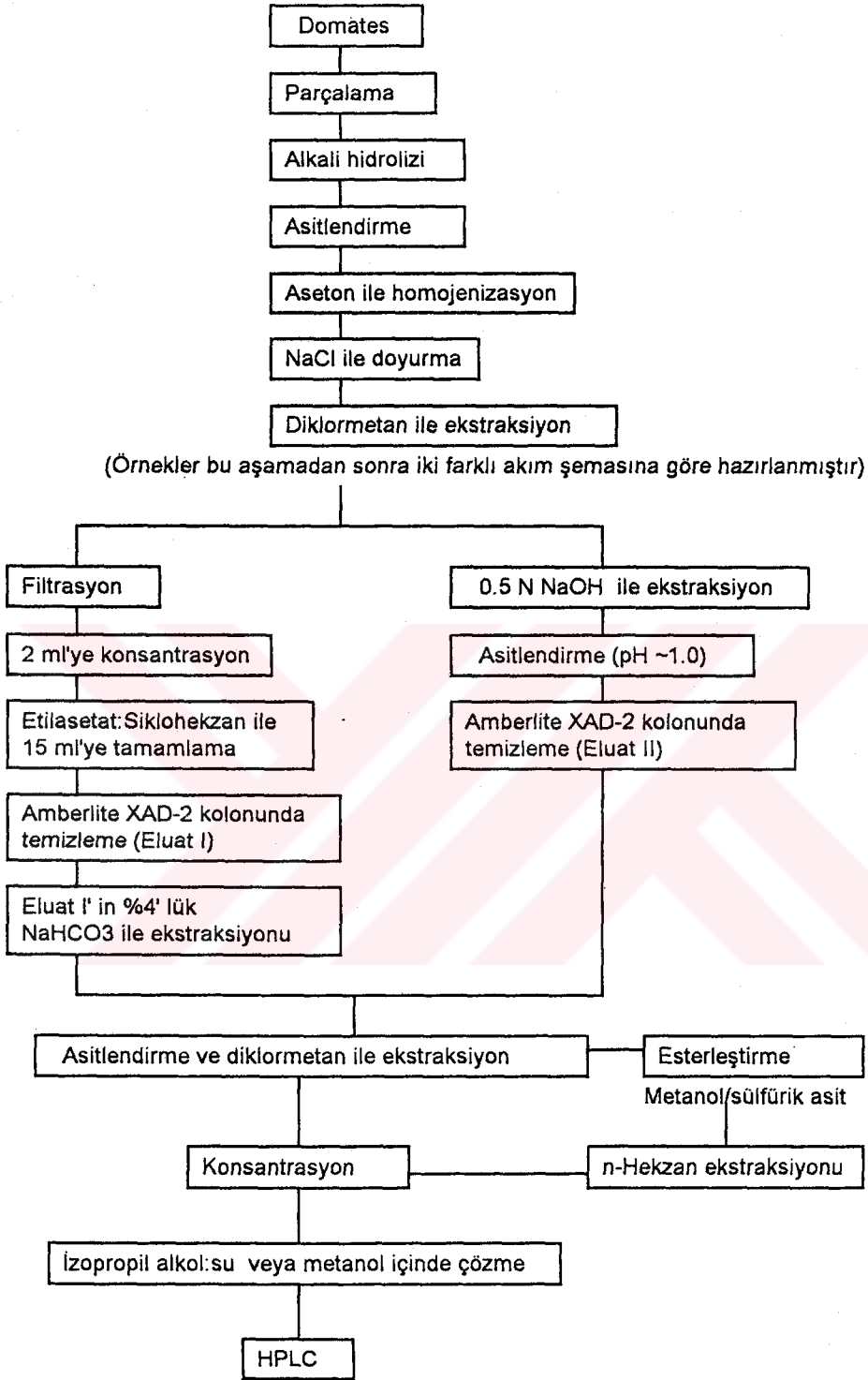
Bölüm 3.2.3.5' de de belirtildiği gibi HPLC kullanarak kalıntı 2,4-D analizleri hem serbest asit formunda, hem de metil esteri formunda yapılmıştır. 2,4-D' nin serbest asit formunda analizinde Bölüm 3.2.3.2, Bölüm 3.2.3.3, Bölüm 3.2.3.3 ve Bölüm 3.2.3.5' de belirtildiği gibi örnekte, esterifikasyon uygulanmadan, evaporatörden alınan kalıntı uygun bir çözücüde çözündürülerek HPLC' ye enjekte edilmiştir. Ancak metil esteri olarak analiz edilebilmesi için bu kalıntı, metanol / H₂SO₄ ile esterleştirilmiştir. Bunun için Bölüm 3.2.1.3' de belirtilen yöntem kullanılarak evaporatörden alınan kalıntı 4.5 ml metanolde yeniden çözündürülmüştür. Üzerine damla damla 0.5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilmiş ve ağzı kapalı bir cam kaptaki ara sıra çalkalayarak esterifikasyon tamamlanmıştır. Bunun üzerine 50 ml %5' lik Na₂SO₄ çözeltisi ve tam 10 ml n-hekzan ilave edildikten sonra 100 ml' lik ayırma hunisine aktarılmış ve 1 dakika çalkalanmıştır. Fazların ayrılmasından sonra su fazı atılmış ve hekzan fazı 50 ml % 4' lük NaHCO₃ çözeltisi ile 1 dakika çalkalanmıştır. Fazların ayrılması için bir süre beklenmiştir. Sulu faz tekrar atılmış ve hekzan fazı anhidroz Na₂SO₄ kaplı cam pamuğu ve filtre kağıdı üzerinden filtre edilmiştir. Filtrat 25 ml' lik armut balona aktarılmış ve hekzan fazı rotasyon evaporatör kullanarak 40°C' deki su banyosunda uçurulmuştur. Balon içindeki kalıntı hafif azot gazı akımında tamamen kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş kalıntı izopropil alkol : su (75:25) karışımı ile yeniden çözülerek HPLC' de analiz edilmiştir.

3.2.3.7. Domates örneklerinde HPLC ile kantitatif olarak 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesi

Yukarıdaki gibi 2,4-D ve 2,4-DME halinde hazırlanan örnekler izopropil alkol : su karışımı (75:25) veya metanol içinde çözülerek HPLC' de analiz edilmiştir.

3.2.4. Kuru madde tayini

Domates örneklerindeki kuru madde analizleri Pearson (1976)' a göre yapılmıştır.

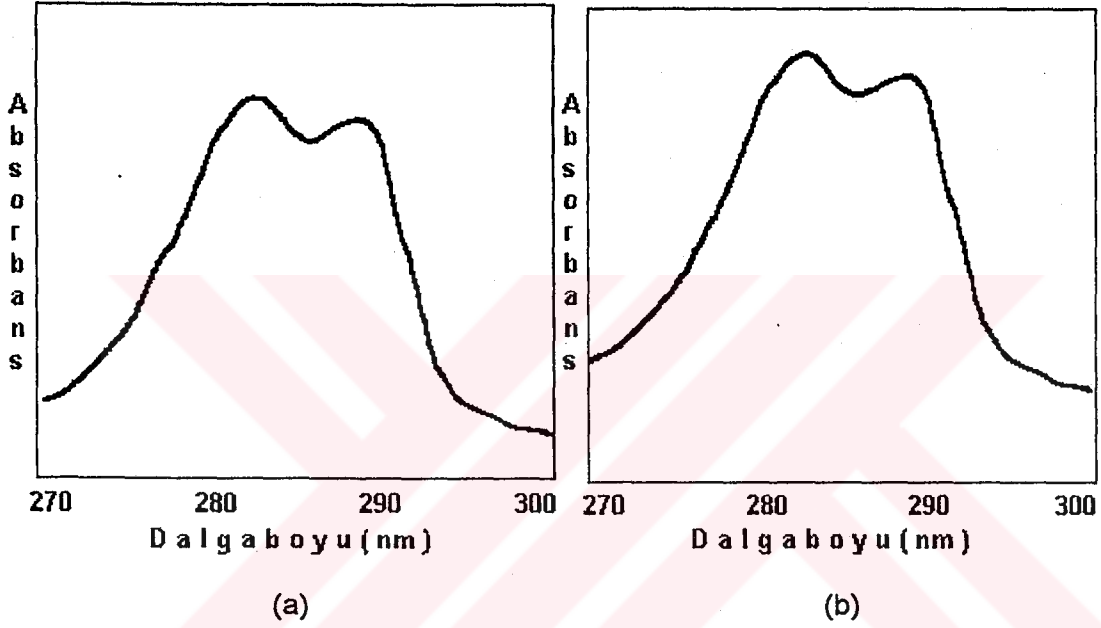


Şekil 3.2 : Domateslerde kalıntı 2,4-D tayini için kullanılan yöntemlerin akım şeması

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. 2,4-D ve 2,4-DME İçin Spesifik Dedeksiyon Dalgaboyunun Saptanması

Spesifik dedeksiyon dalga boyunun belirlenmesi amacıyla izopropil alkol : su (75:25,v/v) karışımı içinde hazırlanan 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 ng/µl konsantrasyonlarındaki 2,4-D ve 2,4-DME standart çözeltileri kullanılmıştır. 2,4-D ve 2,4-DME için spesifik dedeksiyon dalga boyu ~280 nm olarak bulunmuştur. UV-VIS spektrofotometrede elde edilen spektrumlar Şekil 4.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.1: İzopropil alkol : su (75:25, v/v) karışımı içinde elde edilen 2,4-D ve 2,4-DME spektrumları (a) 2,4-D, (b) 2,4-DME

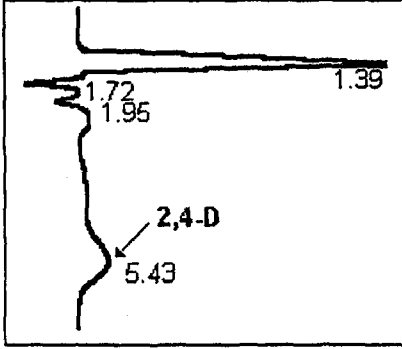
Roseboom ve arkadaşları (1982) tarafından yapılan çalışma sonucunda da 2,4-D için spesifik dalga boyunun ~280 nm bulunduğu kaydedilmiştir.

4.2. Mobil Faz Kompozisyonu ve Akış Hızının Standart Çözeltilerde 2,4-D Tayinine Etkileri

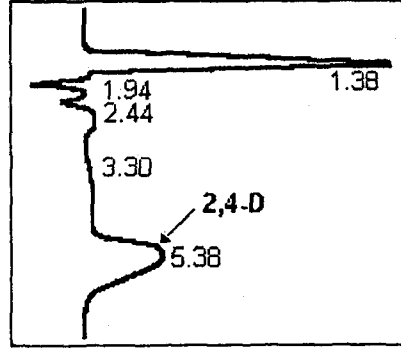
4.2.1. İzokratik $0.001 \text{ M PO}_4^{-3}$ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımının etkileri

Mobil faz olarak $0.001 \text{ M PO}_4^{-3}$ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında, yayvan biçimli 2,4-D pikleri elde edilmiştir. $0.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ konsantrasyonunda pik gözlenmesine karşılık, $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ' nin altında duyarlılığın düşük olduğu saptanmıştır. Tayin edilebilen en düşük 2,4-D miktarı yaklaşık $0.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 2,4-D olarak tespit edilmiştir.

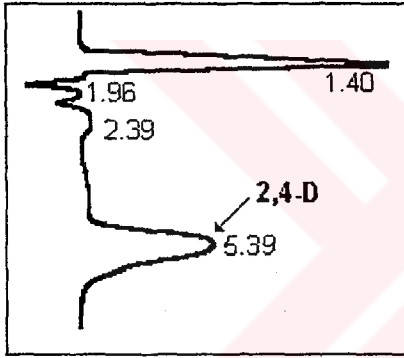
0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su karışımı kullanılarak, yürütülen denemelerde, 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarında elde edilen tipik 2,4-D kromatogramları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3' de verilmiştir.



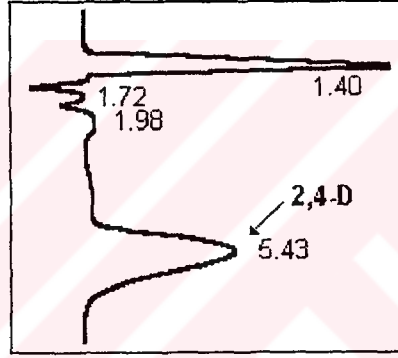
(a)



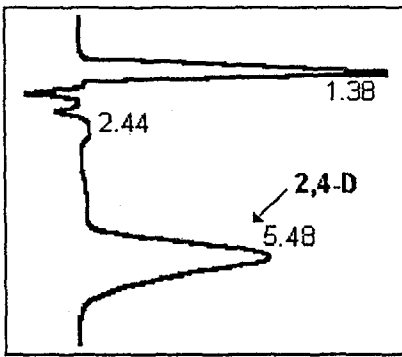
(b)



(c)

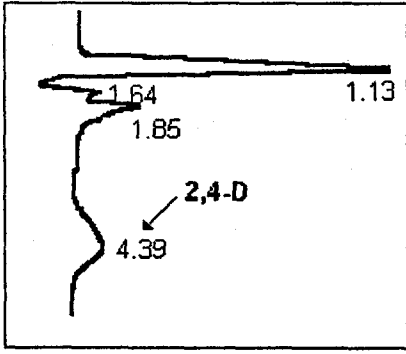


(d)

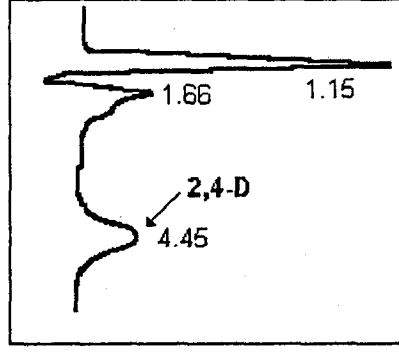


(e)

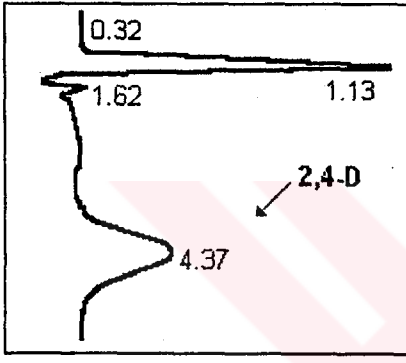
Şekil 4.2 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/ μl , (b) 1 ng/ μl , (c) 2 ng/ μl , (d) 3 ng/ μl , (e) 4 ng/ μl



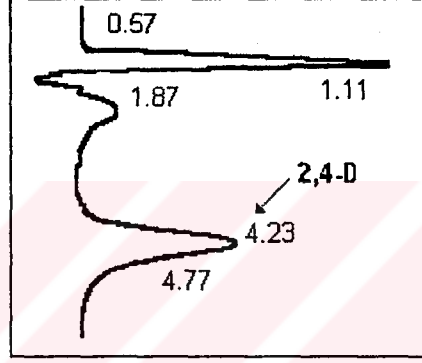
(a)



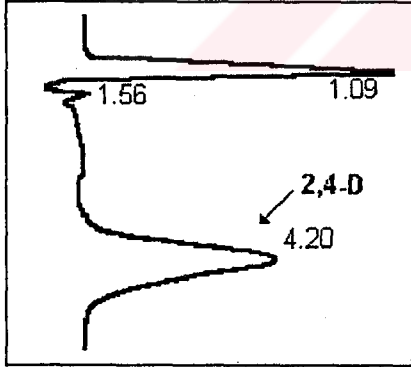
(b)



(c)



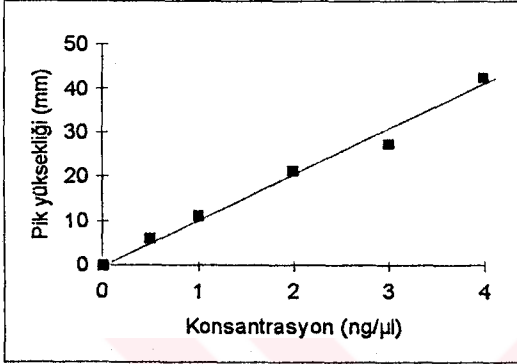
(d)



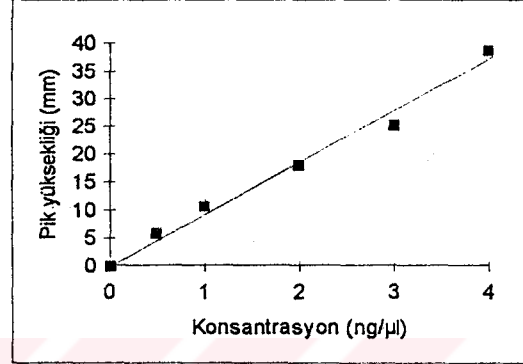
(e)

Şekil 4.3 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/ μl , (b) 1 ng/ μl), (c) 2 ng/ μl , (d) 3 ng/ μl , (e) 4 ng/ μl

0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su karışımı (75:25, v/v) ile her iki akış hızında elde edilen standart 2,4-D kromatogramlarının birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Standart 2,4-D çözeltilerinin 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarındaki kromatogramları istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Buna göre her iki akış hızı için, konsantrasyon ve pik yüksekliği arasındaki ilişkinin önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Elde edilen 2,4-D standart eğrileri Şekil 4.4.' de verilmiştir.



(a)



(b)

4.4 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak 0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M hegzadesiltrimetiamonyumbromit (setrimit) içeren izokratik metanol:su (75:25, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r = 0,993$, $p < 0,05$), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak ($r = 0,994$, $p < 0,05$).

Roseboom ve arkadaşları (1982) da çeşitli fenoksikarboksilik asit herbisitleri ters faz C_{18} kolonda analiz ettikleri çalışmada mobil faz olarak farklı oranlarda PO_4^{3-} ve setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımlarını kullanmışlardır. Bu çalışmada 2,4-D için en iyi sonuçlar 0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı ile elde edilmiş ve C_{18} kolonda tayin edilebilen en düşük 2,4-D miktarı toplam 3-5 ng düzeylerinde bulunmuştur. Ancak araştırmacılar 2,4-D' yi naftasil esteri ve metilmetoksikumarin esteri olarak analiz ettiklerinde ise toplam miktarın sırasıyla 0.3 ve 0.5 ng düzeylerine indiğini belirlemişlerdir.

4.2.2. İzokratik asetonitril : % 2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımının etkileri

Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı mobil faz olarak kullanıldığında keskin ve dik pikler elde edilmiştir. Ancak bu kez de 2,4-D pikinin diğer piklerden ayrılma derecesinin düşük olduğu ve 1 ng/µl' nin altında duyarlılığın düştüğü gözlenmiştir. 2,4-D' nin kolonda kalış süresi, bu mobil faz karışımı

kullanıldığında çok düşük olmuştur. Tayin edilebilen en düşük düzey 0.5 ng/μl olarak bulunmuştur.

Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanılarak 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarında elde edilen tipik 2,4-D kromatogramları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da verilmiştir.

Kromatogramlarda da görüldüğü gibi asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında, her iki akış hızında özellikle de 1.5 ml/dak akış hızında 2,4-D piklerinin ayrılma derecesi çok düşüktür ve dolayısı ile düşük konsantrasyonlarda duyarlılık da düşük olmuştur. Bu durum istatistiksel analizlerle de desteklenmektedir. Buna göre konsantrasyon ile pik yüksekliği arasındaki ilişkinin önemli olduğu görülmesine karşılık ($p < 0.05$), korelasyon katsayısı düşük bulunmuştur. Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanarak elde edilen 2,4-D standart eğrileri Şekil 4.7.' de verilmiştir.

Larson ve Hougum (1991), 2,4-D içeren pestisit formülasyonlarının tayininde asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımını gradiyent olarak kullanmışlardır. Araştırmacılar kullandıkları yöntemin çok duyarlı olduğunu ve korelasyon katsayısının 0.9996' dan daha yüksek bulunduğunu kaydetmişlerdir. Ancak Larson ve Hougum (1991) tarafından yapılan çalışmada belirlenen bu değerlerin, 80-200 ng/μl 2,4-D konsantrasyonları için geçerli olduğu bildirilmiştir.

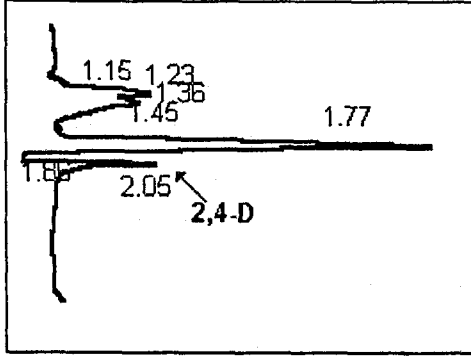
4.2.3. İzokratik asetonitril : % 2 su içeren asetik asit (50:50, v/v) karışımının etkileri

Pik şekli ve ayrılma derecesi açısından yürütülen ilk denemelerde asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının mobil faz olarak kullanılmasıyla iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bu karışımının kullanılması ile diğer karışımlara oranla duyarlılığın da yüksek olduğu görülmüştür. Ancak akış hızının 1.5 ml/dak düzeyine çıkarılmasıyla, 1.0 ml/dak akış hızında görülemeyen bazı piklerin de bulunduğu saptanmıştır.

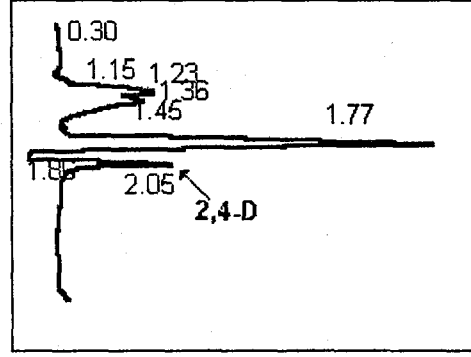
Asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v) kullanılarak 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarında elde edilen tipik 2,4-D kromatogramları Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de verilmiştir.

Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanıldığında, tekrar edilebilirlik düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla, analizler yaklaşık bir ay ara ile tekrar edilmiştir. 1.0 ml/dak akış hızında tekrar edilebilirliğin yüksek olduğu saptanmıştır. Buna karşılık 1.5 ml/dak akış hızında ikinci kez tekrar edilen

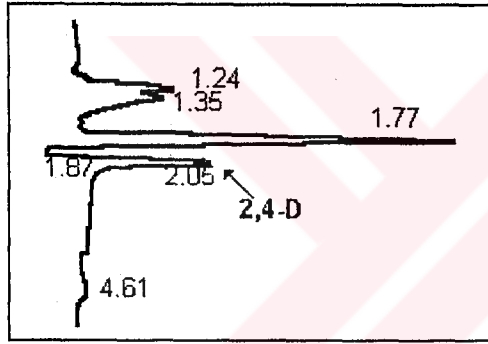
denemelerde 2,4-D' nin ayrılma düzeyinin oldukça düştüğü görülmüş ve 1 ng/ μ l 2,4-D içeren örnekler dışında ayrılmanın yeterli olmadığı saptanmıştır. Şekil11' de iyi sonuç alınamayan kromatogramlar verilmektedir.



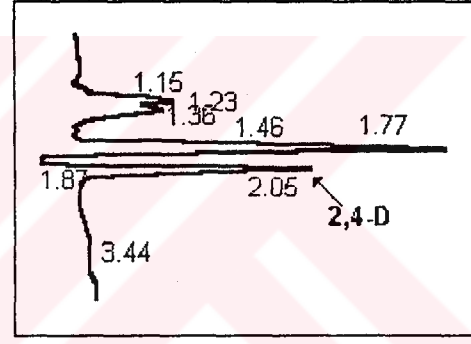
(a)



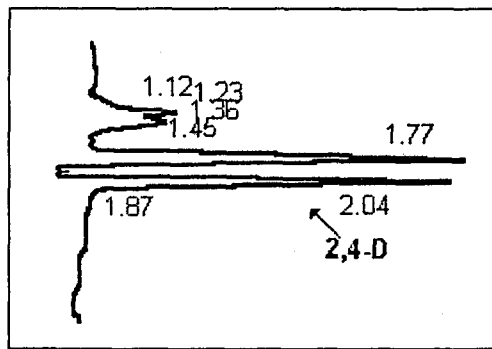
(b)



(c)

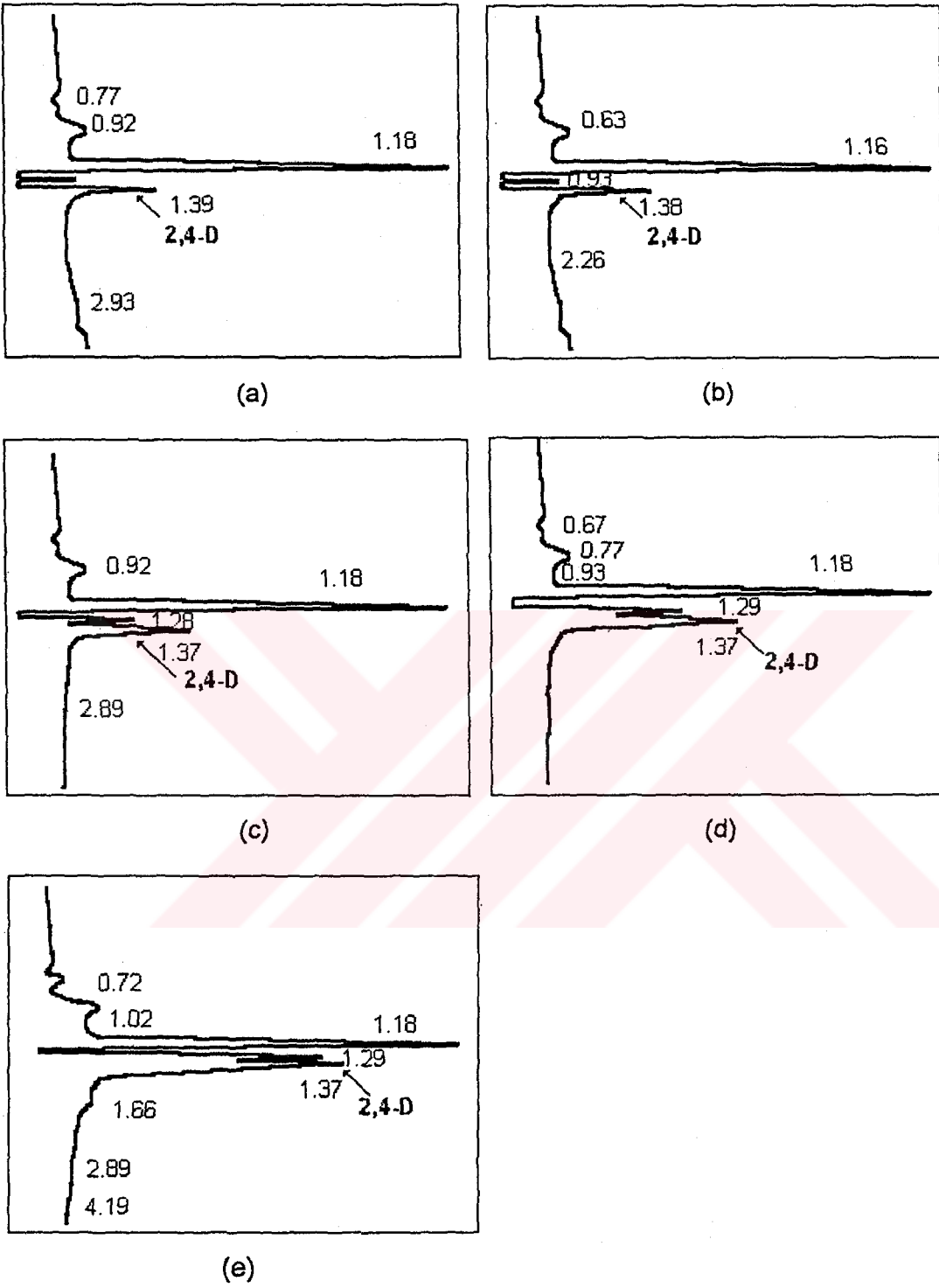


(d)

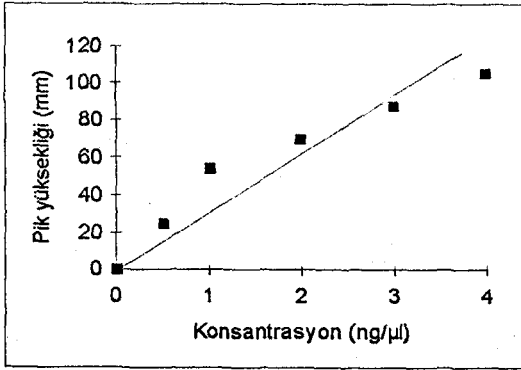


(e)

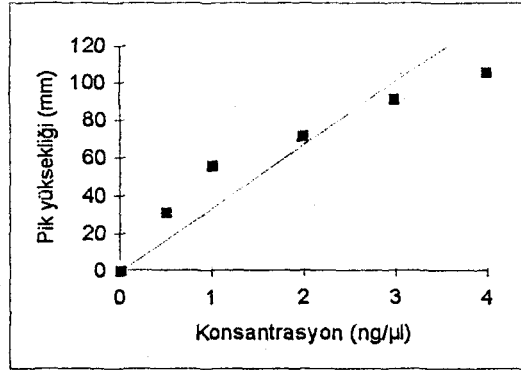
Şekil 4.5 : 2,4-D Kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/ μ l, (b) 1 ng/ μ l, (c) 2 ng/ μ l, (d) 3 ng/ μ l (e) 4 ng/ μ l



Şekil 4.6 : 2,4-D Kromatogramları . Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı= 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/μl, (b) 1 ng/μl, (c) 2 ng/μl, (d) 3 ng/μl (e) 4 ng/μl



(a)



(b)

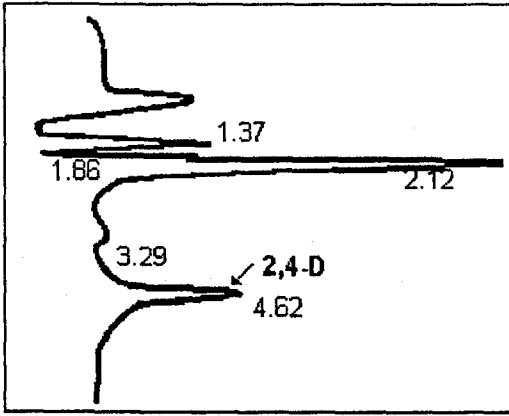
Şekil 4.7 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı=1.0 ml/dak ($r= 0,965$, $p<0,05$), (b) Akış hızı=1.5 ml/dak ($r= 0,960$, $p<0,05$).

Şekil 4.11' de de görüldüğü gibi 50:50 (v/v) oranında hazırlanmış asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında, 1.5 ml/dakika akış hızı için tekrar edilebilirlik düzeyi düşük olmuştur. 2,4-D' nin ayrılma düzeyi düşmüş ve 1 ng/μl' lik standardın dışındaki standart çözeltilerde iyi bir ayırım sağlanamamıştır. Bu nedenle yukarıda örnek olarak sadece 0.5, 1.0 ve 2.0 ng/μl' lik 2,4-D standartların kromatogramları verilmiştir.

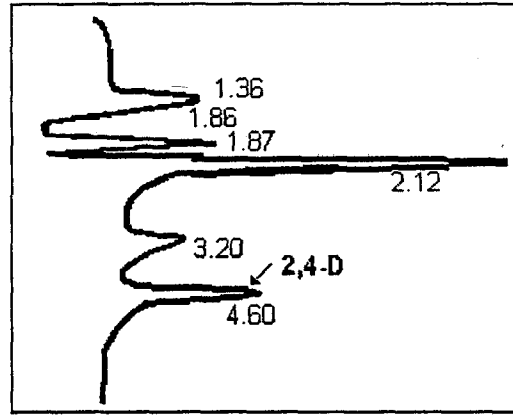
İlk denemelerde keskin ve iyi ayrılmış piklerin elde edilmesi, duyarlılığın yüksek olması yanında istatistiksel analiz sonuçları da bu mobil faz karışımının 2,4-D tayinindeki etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu örneklerle ait yapılan istatistiksel analizlerin sonucu, 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızları için konsantrasyon ve pik yüksekliği arasındaki ilişkinin önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca bu ilişkinin korelasyon katsayısı da yüksek bulunmuştur. Elde edilen standart 2,4-D eğrileri Şekil 4.12' de verilmiştir.

4.2.4. Gradyent asetonitril : % 2 asetik asit içeren su karışımının etkileri

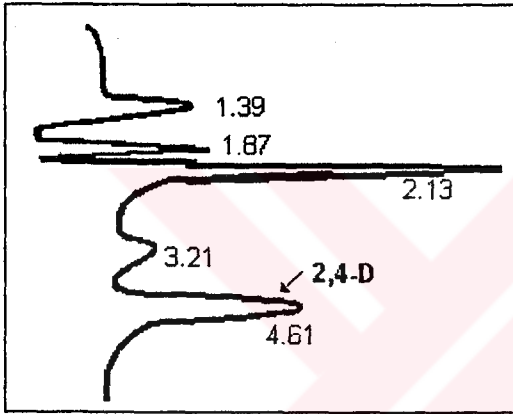
Zaman programı Bölüm 3.2.1.2' de verilen gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında, izokratik karışımlara oranla duyarlılığın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 0.5 ng/μl' lik 2,4-D piki izokratik karışımların çoğunda keskin ve dik bir şekilde gözlenemezken, gradiyent karışım ile 0.5 ng/μl' lik 2,4-D pikinin de net bir şekilde elde edildiği görülmüştür. Gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanılarak elde edilen tipik 2,4-D kromatogramları Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de verilmiştir.



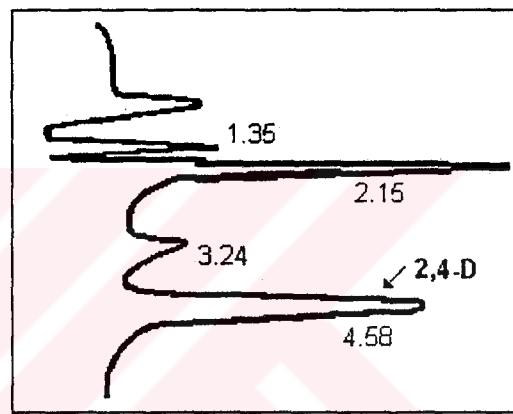
(a)



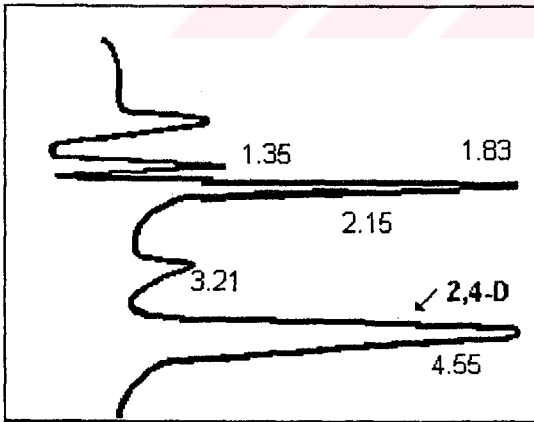
(b)



(c)

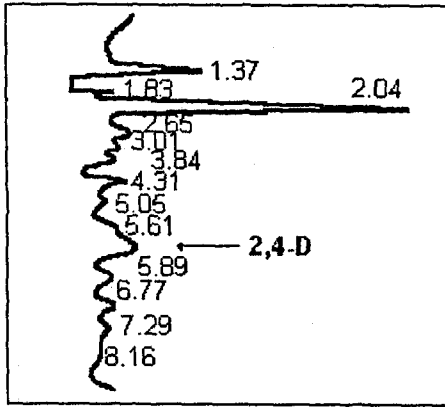


(d)

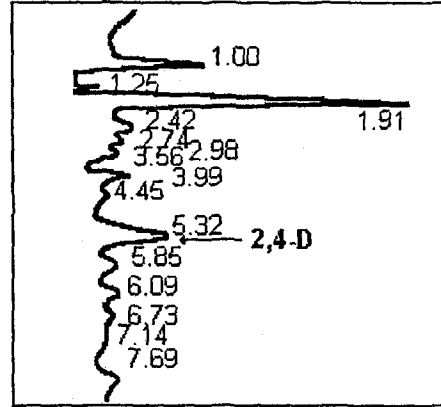


(e)

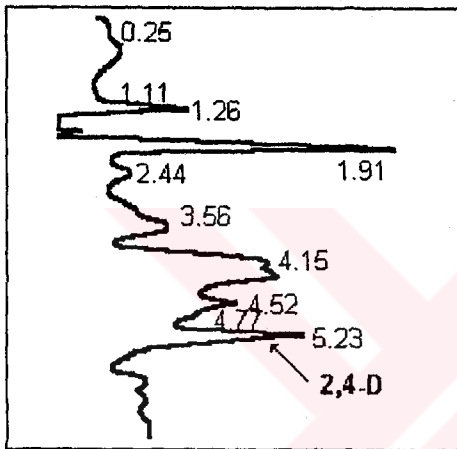
Şekil 4.8 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



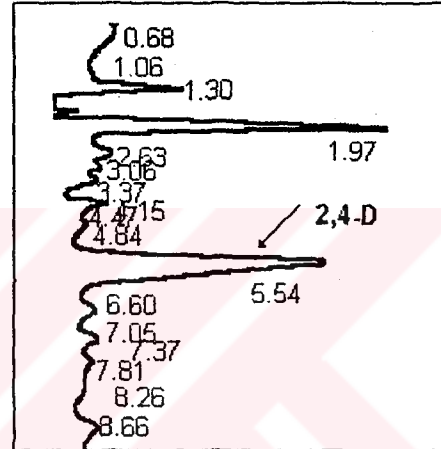
(a)



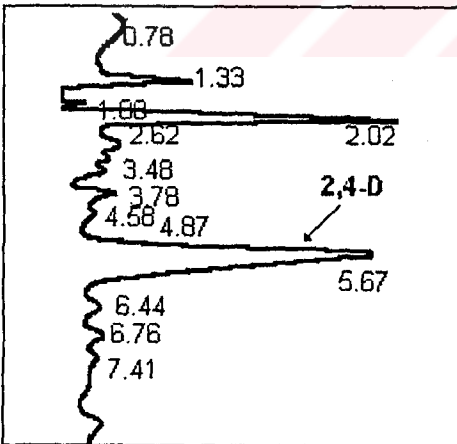
(b)



(c)

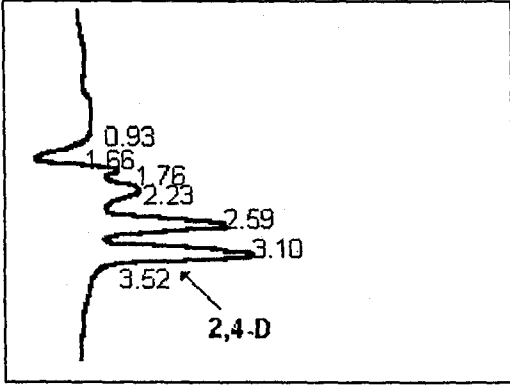


(d)

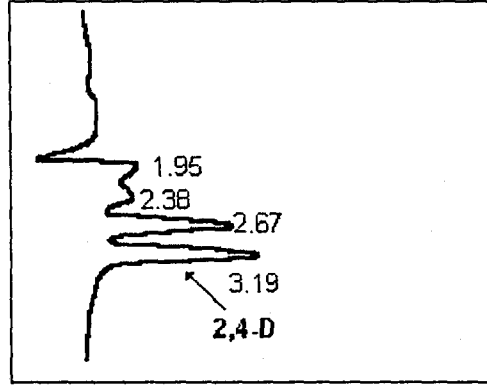


(e)

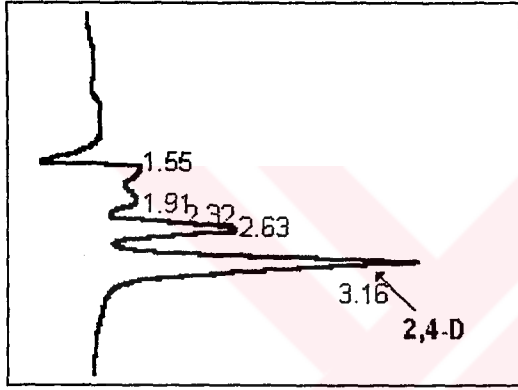
Şekil 4.9 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



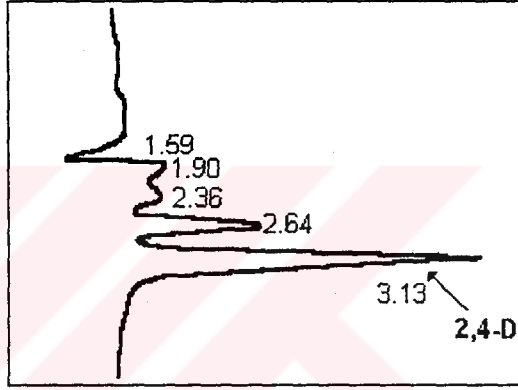
(a)



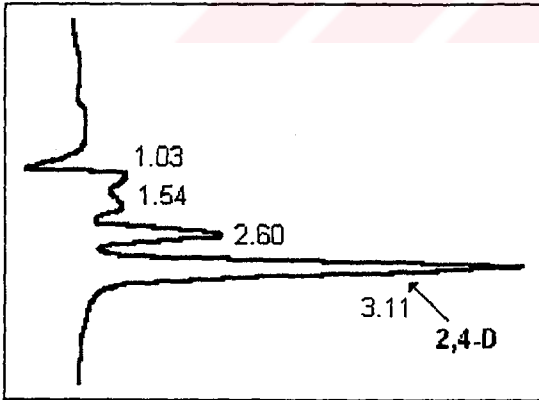
(b)



(c)

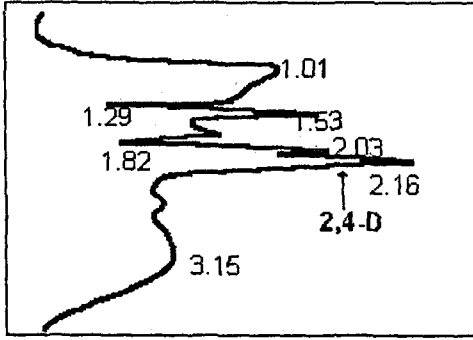


(d)

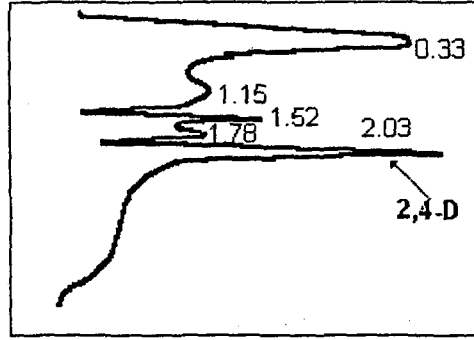


(e)

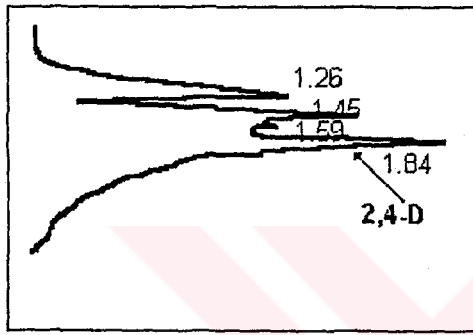
Şekil 4.10 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



(a)

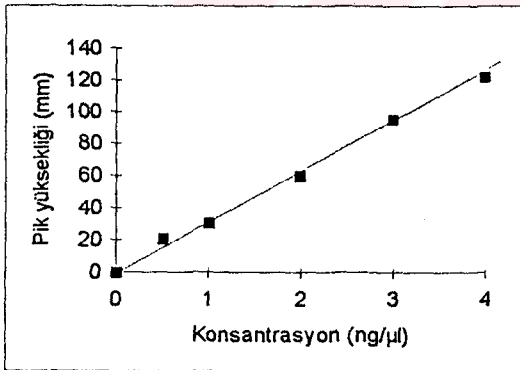


(b)

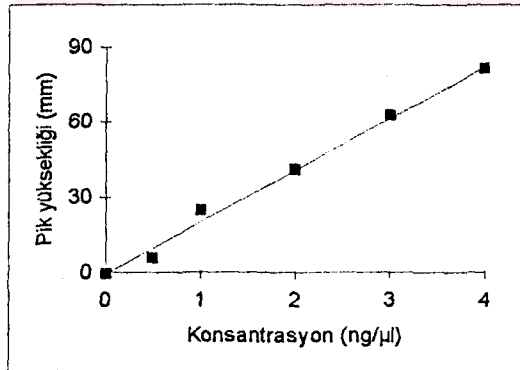


(c)

Şekil 4.11 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl

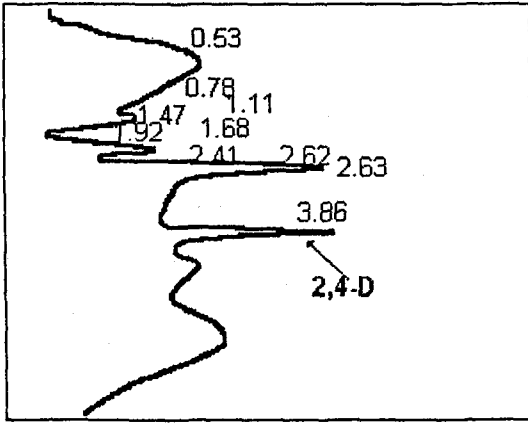


(a)

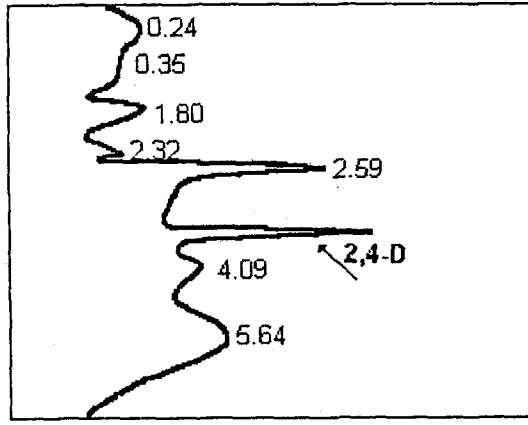


(b)

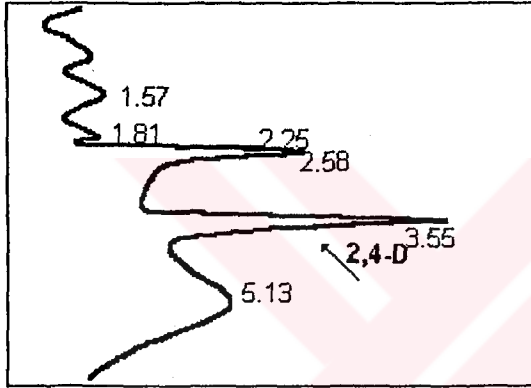
Şekil 4.12 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r=0,998$, $p<0.05$), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak ($r=0,996$, $p<0.05$).



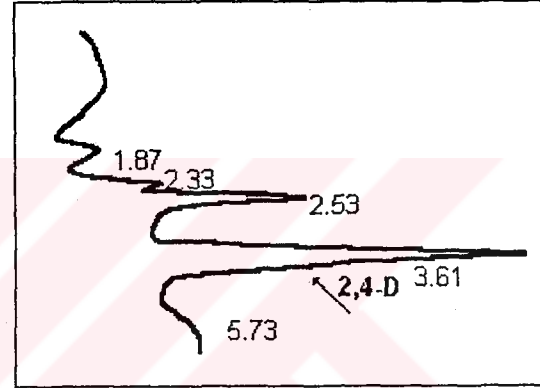
(a)



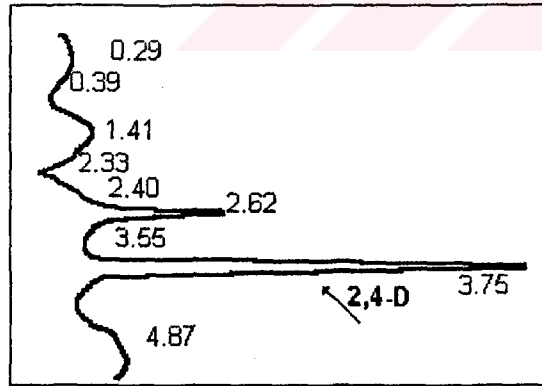
(b)



(c)

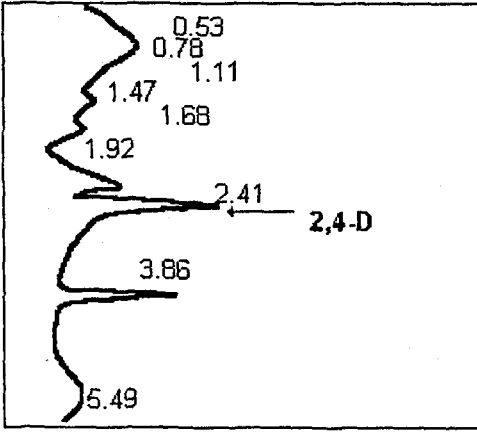


(d)

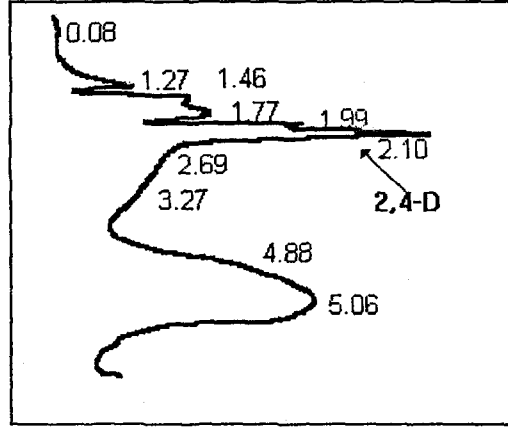


(e)

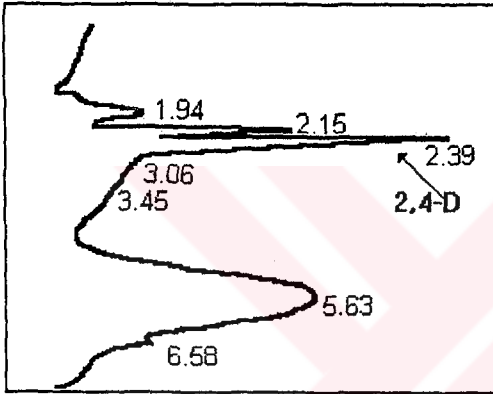
Şekil 4.13 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı=1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



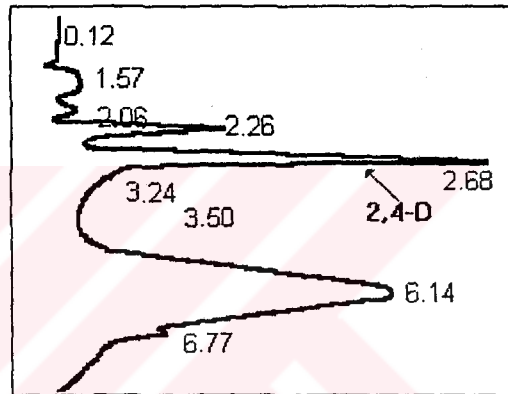
(a)



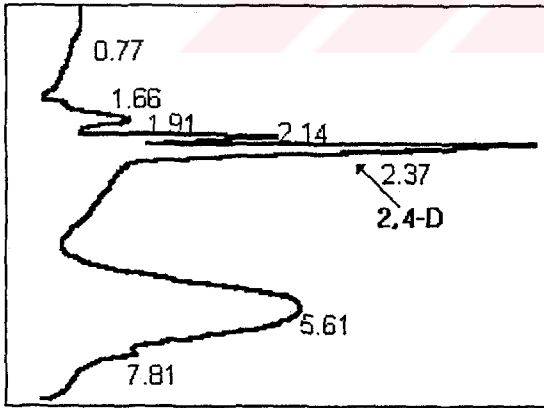
(b)



(c)



(d)

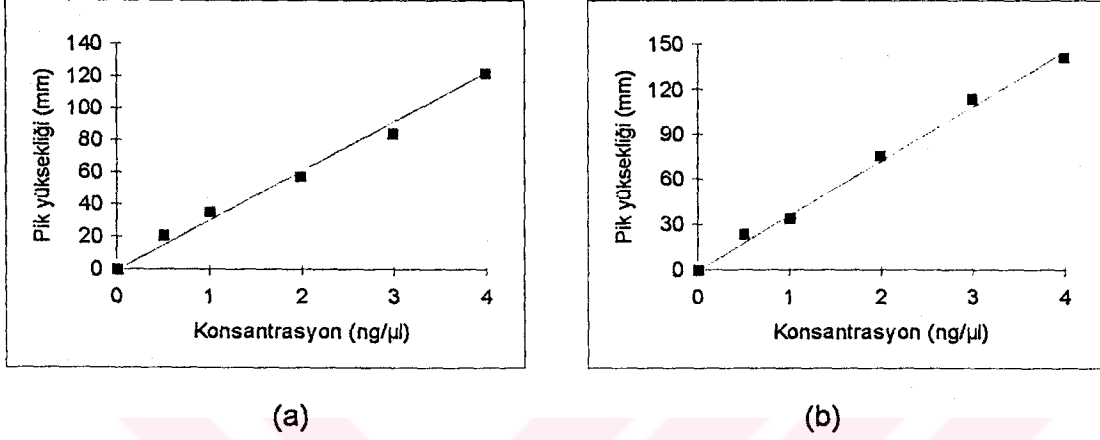


(e)

Şekil 4.14 : 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı=1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de de görüldüğü gibi akış hızının 1.0 ml/dakika' dan 1.5 ml/dakika' ya yükseltilmesi 2,4-D piklerinin separasyonunu güçleştirmiştir.

Gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı için konsantrasyon ile pik yüksekliği arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan istatistiksel analizler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.15' da verilmiştir.



Şekil 4.15 : 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak gradiyent asetonitril:%2 asetik asit içeren su karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı=1.0 ml/dak ($r= 0,995$, $p<0,05$), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak ($r= 0.998$, $p<0,05$).

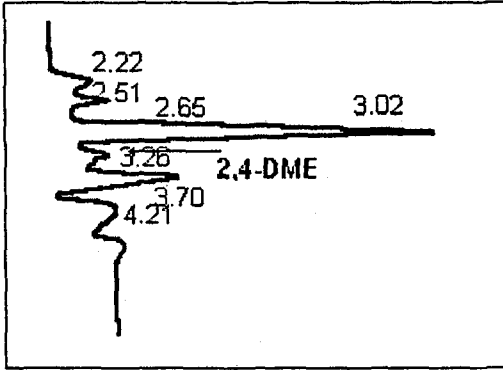
Larson ve Houglum (1991) da 2,4-D, dicamba ve MCCP içeren çeşitli herbisit formülasyonlarını analiz ettikleri çalışmalarında ters faz C₁₈ kolon ve gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanmışlardır. Gradyent programı; 5 dakika 25:75, 10 dakikada 40:60'a çıkış ve 5 dakika 40:60 olarak uygulanmıştır. Araştırmacılar bu gradiyent programı önermelerine rağmen, iyi sonuç alınamadığında asetonitril oranının veya zaman programının değiştirilmesini tavsiye etmişlerdir.

4.3. Mobil Faz Kompozisyonu ve Akış Hızının Standart Çözeltilerde 2,4-DME Tayinine Etkileri

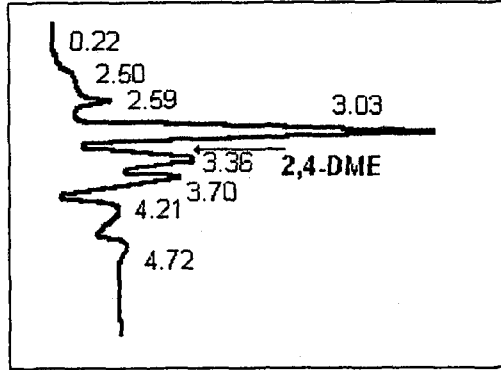
4.3.1. İzokratik 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımının etkileri

Mobil faz olarak 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında, 2,4-DME' nin C₁₈ kolonda ayrılma düzeyinin çok düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 2,4-DME' nin alıkonma süresinin stabil olmadığı saptanmıştır. 2,4-DME' nin tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon 1 ng/µl olmuştur.

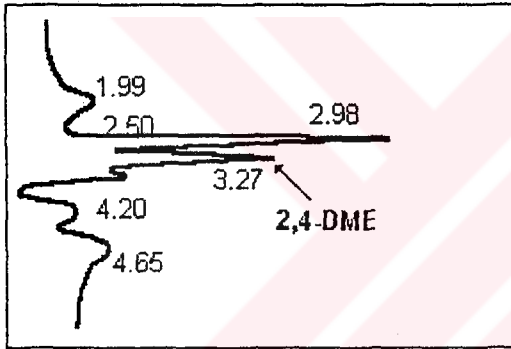
0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı kullanılarak 1.0 ve 1.5 ml/dakika akış hızlarında elde edilen tipik 2,4-DME kromatogramları Şekil 4.16 ve Şekil 4.17' de verilmiştir.



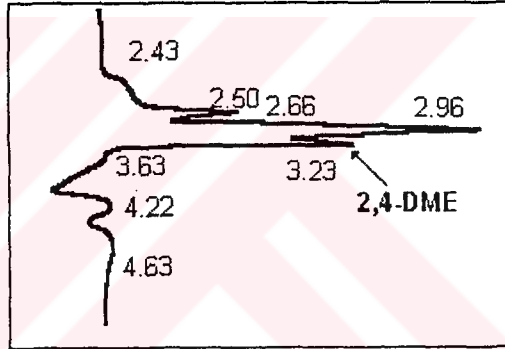
(a)



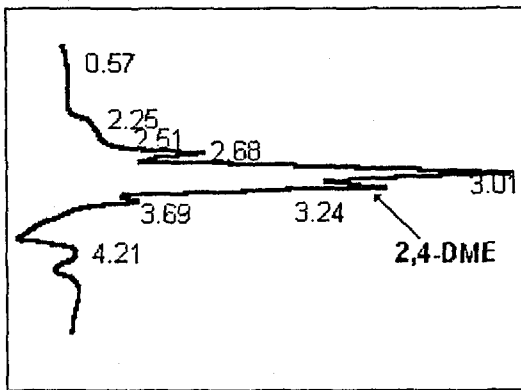
(b)



(c)

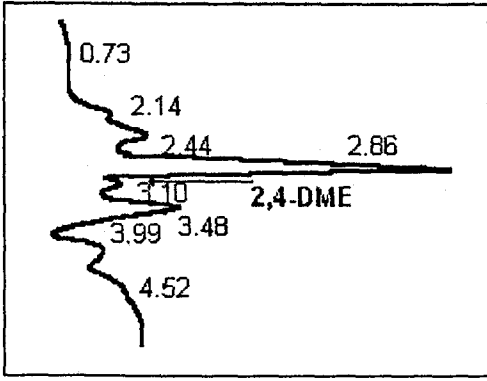


(d)

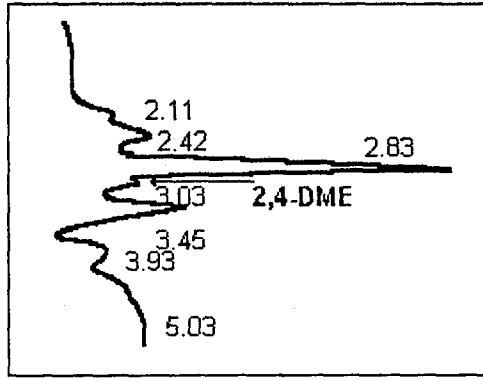


(e)

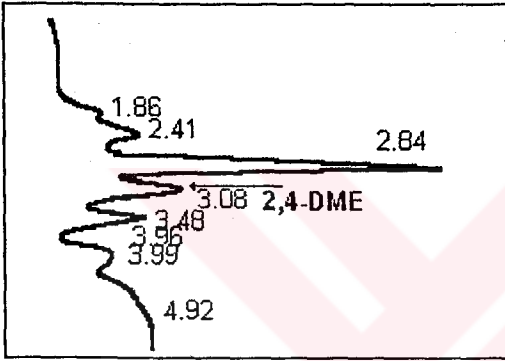
Şekil 4.16 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik 0.001 M PO_4^{3-} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/ μl , (b) 1 ng/ μl , (c) 2 ng/ μl , (d) 3 ng/ μl , (e) 4 ng/ μl



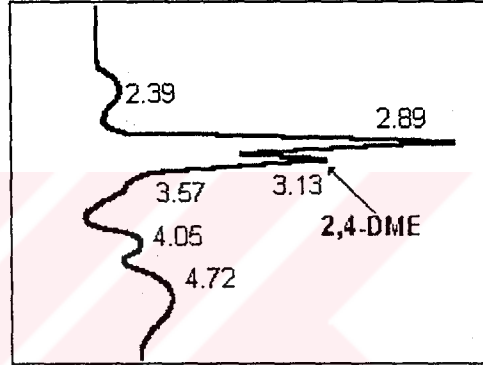
(a)



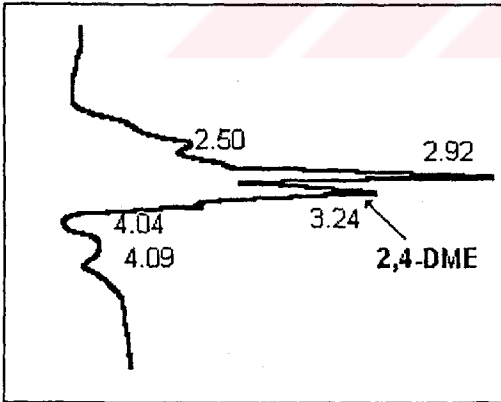
(b)



(c)



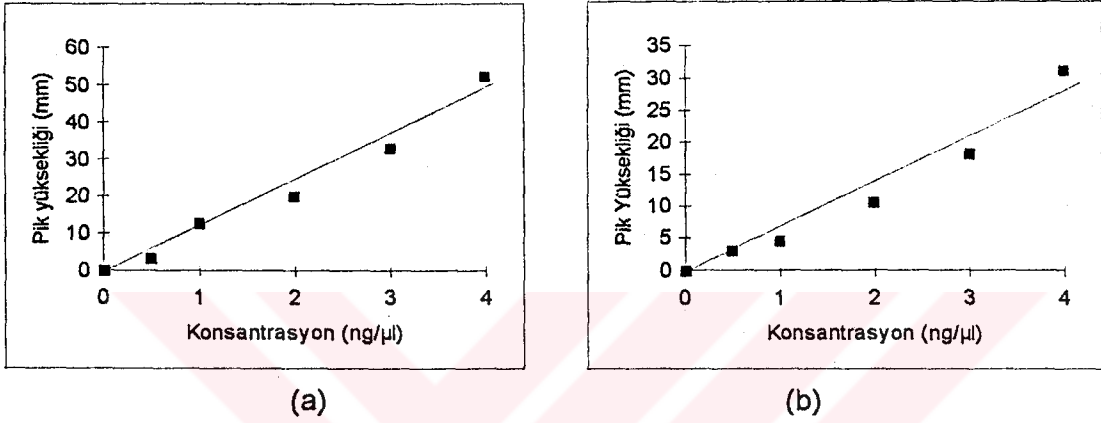
(d)



(e)

Şekil 4.17 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik $0.001 \text{ M PO}_4^{-3}$ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.5 ml/dak . (a) $0.5 \text{ ng/}\mu\text{l}$, (b) $1 \text{ ng/}\mu\text{l}$, (c) $2 \text{ ng/}\mu\text{l}$, (d) $3 \text{ ng/}\mu\text{l}$, (e) $4 \text{ ng/}\mu\text{l}$

0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında 1.0 ve 1.5 ml/dakika akış hızlarında elde edilen kromatogramlar birbirine benzer olmakla birlikte, 1.0 ml/dakika akış hızında 2,4-DME' nin ayrılma düzeyinin daha iyi olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler sonucu pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki ilişki her iki akış hızı için de önemli bulunmuş ve korelasyon katsayısı yüksek çıkmıştır. 1.0 ve 1.5 ml/dakika akış hızlarında elde edilen standart eğriler Şekil 4.18' de verilmiştir.



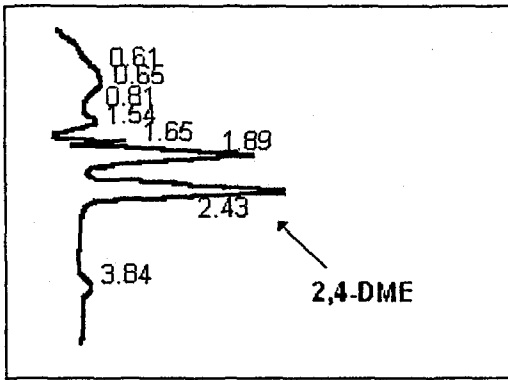
Şekil 4.18 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak 0.001 M PO_4^{-3} ve 0.005 M setrimit içeren izokratik metanol:su karışımı (75:25, v/v) kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r= 0,990$, $p<0,05$), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak ($r= 0,979$, $p<0,05$).

4.3.2. İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımının etkileri

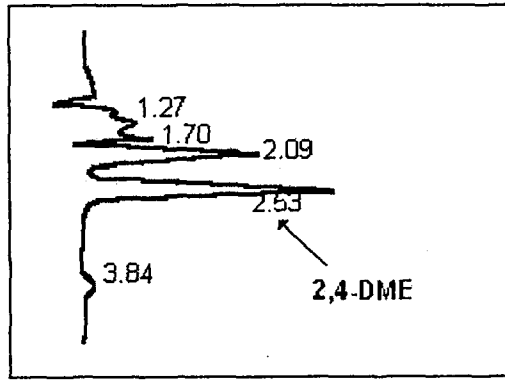
Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanıldığında keskin ve dik 2,4-DME pikleri elde edilmiştir. 2,4-DME piklerinin ayrılma düzeyi 1.0 ml/dakika akış hızında yüksek, 1.5 ml/dakika akış hızında ise düşük bulunmuştur. Ayrıca 2,4-DME' nin kolonda kalış süresinin çok kısa olduğu gözlenmiştir.

Asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı kullanılarak 1.0 ve 1.5 ml/dakika akış hızlarında elde edilen tipik 2,4-DME kromatogramları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20' de verilmiştir.

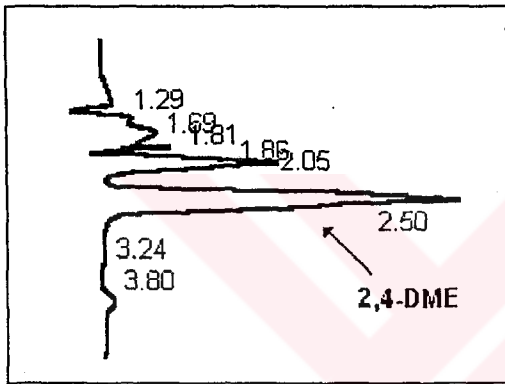
Şekillerde de görüldüğü gibi akış hızının 1.0 ml/dakika' dan 1.5 ml/dakika' ya yükseltilmesi 2,4-DME' nin C_{18} kolonda ayrılma düzeyini olumsuz yönde etkilemiştir. Aynı zamanda pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki korelasyon 1.0 ml/dak akış hızında daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen standart eğriler Şekil 4.21' de verilmiştir.



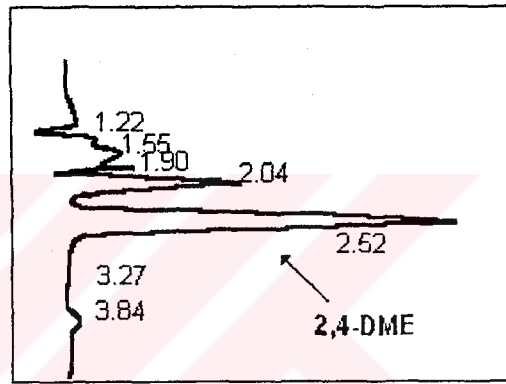
(a)



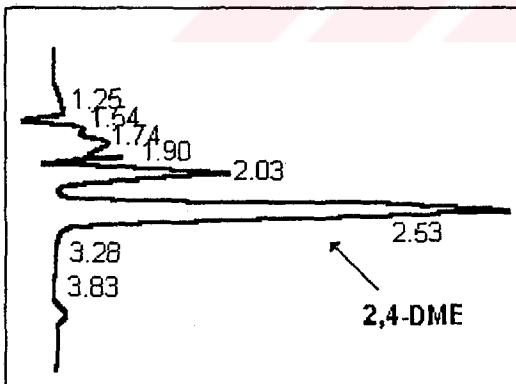
(b)



(c)

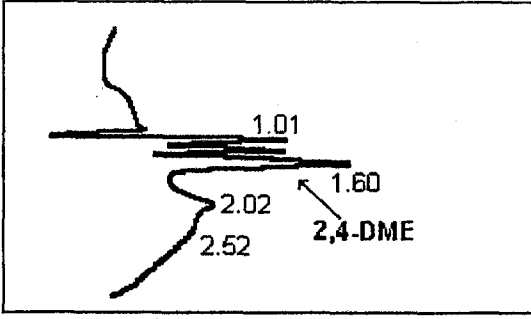


(d)

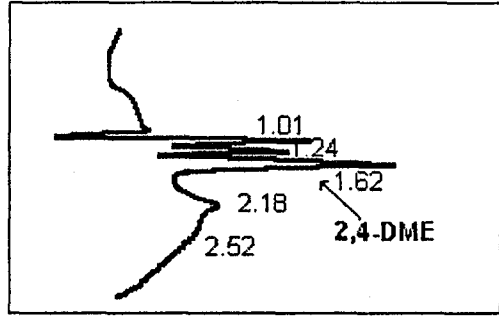


(e)

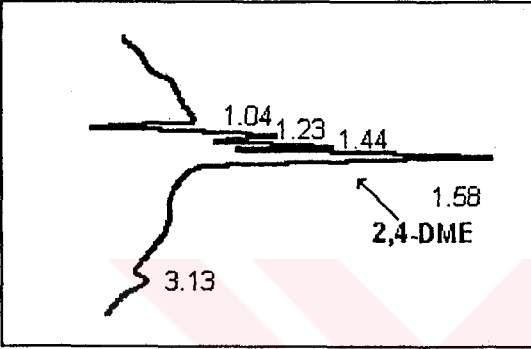
Şekil 4.19 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



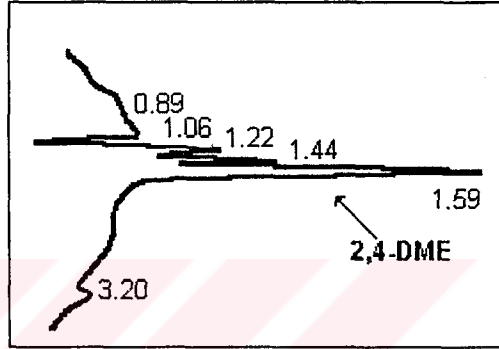
(a)



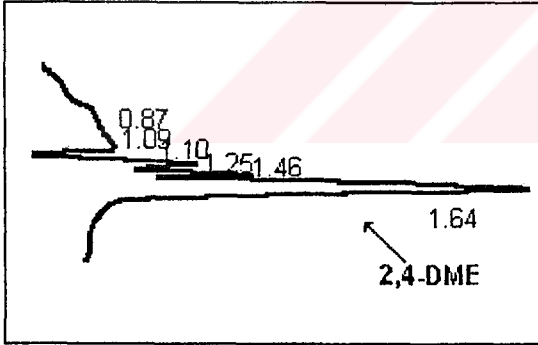
(b)



(c)

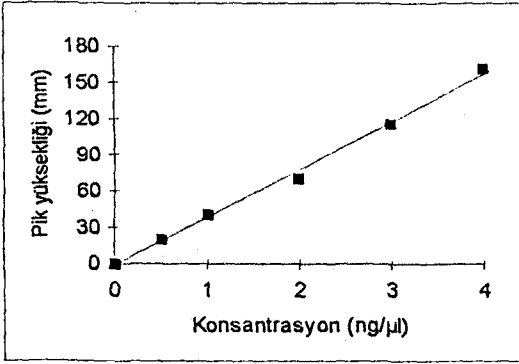


(d)

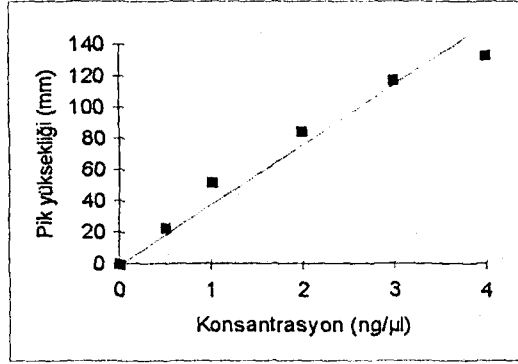


(e)

Şekil 4.20 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.5 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



(a)



(b)

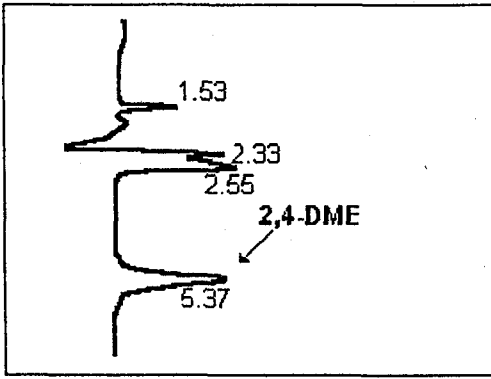
Şekil 4.21 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v) kullanılmıştır. (a) Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r= 0,998$, $p<0,05$), (b) Akış hızı= 1.5 ml/dak ($r= 0,985$, $p<0,05$)

4.3.3. İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının etkileri

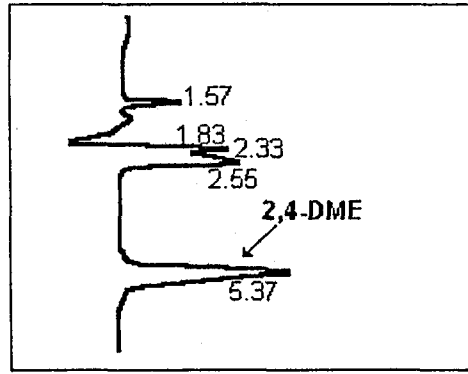
50:50 (v/v) oranında hazırlanmış asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında elde edilen 2,4-DME piklerinin keskin ve dik olduğu görülmüştür. 1.0 ml/dakika akış hızında 2,4-DME piklerinin ayrılma düzeyi oldukça yüksek iken, akış hızının 1.5 ml/dakika' ya yükseltilmesi 2,4-DME analizlerini olumsuz etkilemiştir ve separasyon düzeyi düşük bulunmuştur. Bu nedenle 1.5 ml/dak akış hızıyla çalışmaktan vazgeçilmiştir.

Asetonitril : %2 asetik asit içeren (50:50, v/v) karışımı kullanılarak 1.0 ml/dakika akış hızında elde edilen tipik 2,4-DME kromatogramları Şekil 4.22' de verilmiştir.

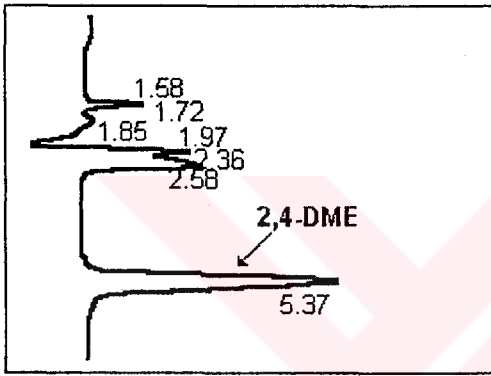
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki ilişki 1.0 ml/dakika akış hızı için önemli bulunmuş, ayrıca korelasyon katsayısı da oldukça yüksek olmuştur. 1.0 ml/dakika akış hızı için elde edilen 2,4-DME standart eğrisi Şekil 4.23' de verilmiştir.



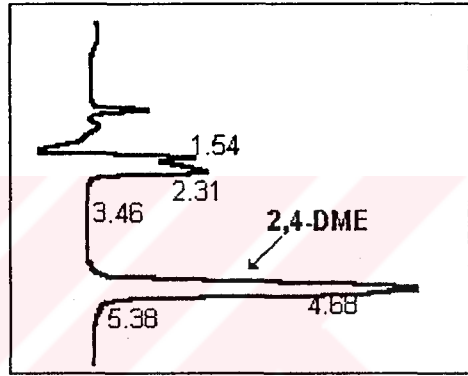
(a)



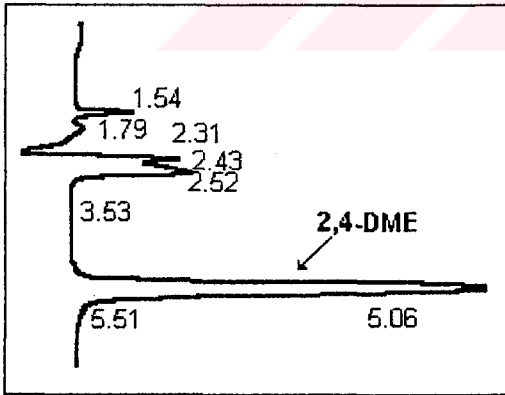
(b)



(c)

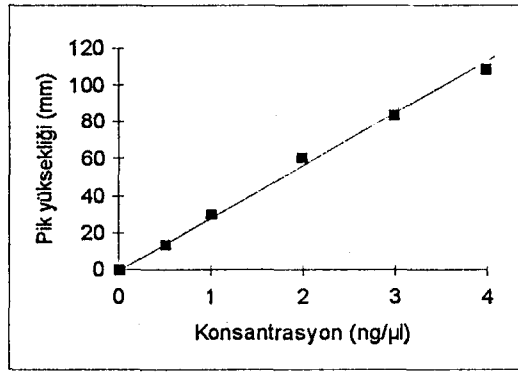


(d)



(e)

Şekil 4.22 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



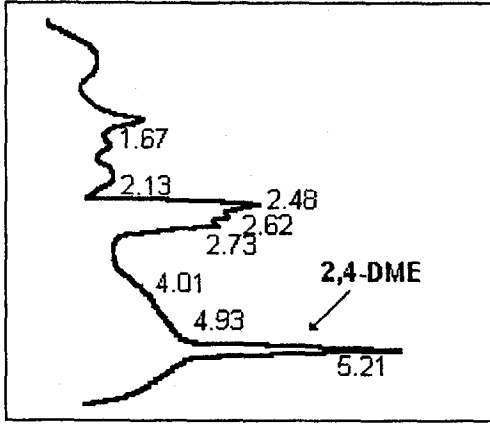
Şekil 4.23 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v) kullanılmıştır. Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r= 0,998$, $p<0,05$).

4.3.4. Gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımının etkileri

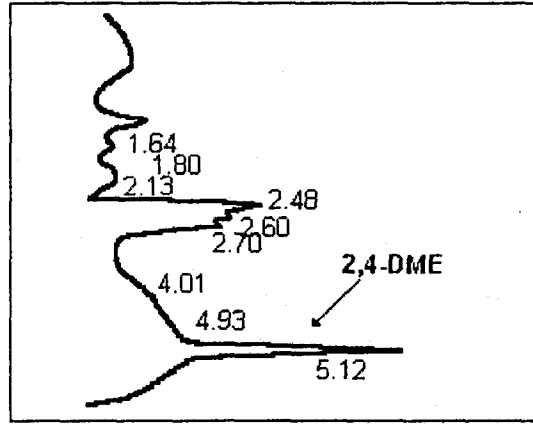
2,4-DME' nin gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanılarak analizlerinde 1.0 ml/dakika akış hızında keskin ve dik pikler elde edilmiş ve ayrılma düzeyinin yüksek olmuştur. Buna karşılık 1.5 ml/dakika akış hızında 2,4-DME' nin C₁₈ kolonda separasyonu sağlanamamıştır. Bu nedenle 1.5 ml/dak akış hızıyla çalışmaktan vazgeçilmiştir.

Gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanılarak 1.0 ml/dakika akış hızında elde edilen tipik 2,4-DME kromatogramları Şekil 4.24' de verilmiştir.

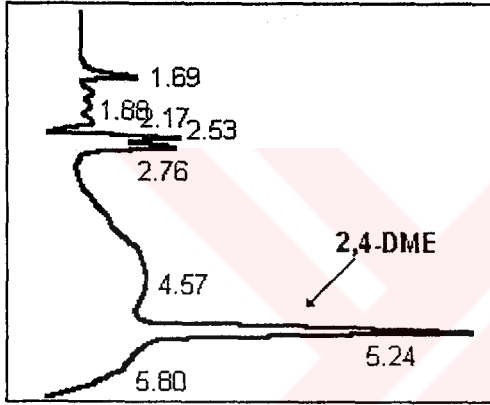
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda 1.0 ml/dakika akış hızında pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki ilişki önemli ve korelasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur. 1.0 ml/dakika akış hızı için elde edilen standart 2,4-DME eğrisi Şekil 4.25' da verilmiştir.



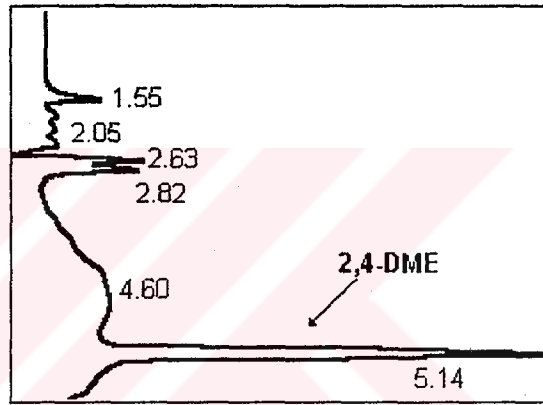
(a)



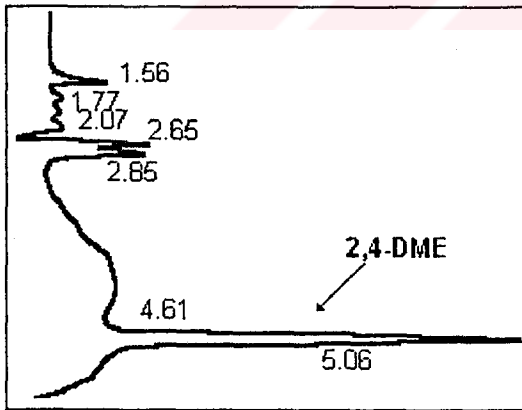
(b)



(c)

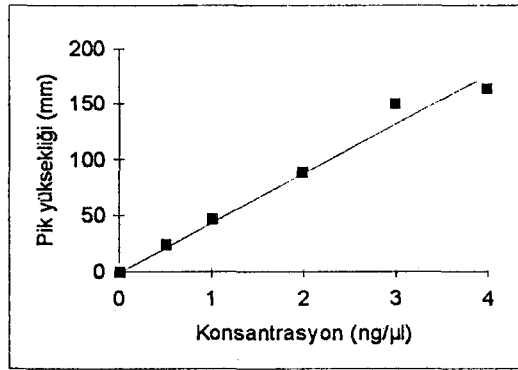


(d)



(e)

Şekil 4.24 : 2,4-DME kromatogramları. Mobil faz: gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı. Akış hızı: 1.0 ml/dak. (a) 0.5 ng/µl, (b) 1 ng/µl, (c) 2 ng/µl, (d) 3 ng/µl, (e) 4 ng/µl



Şekil 4.25 : 2,4-DME kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanılmıştır. Akış hızı= 1.0 ml/dak ($r= 0,990$, $p<0,05$).

4.4. Farklı mobil faz karışımları ile ters faz C₁₈ kolonda 2,4-D ve 2,4-DME elde edilen mutlak alıkonma süreleri ve kapasite faktörü (k') değerleri

Farklı mobil fazlar kullanılarak, farklı zamanlarda ve akış hızlarında C₁₈ kolonda 2,4-D asit ve 2,4-DME için elde edilen mutlak alıkonma süreleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Farklı mobil faz kompozisyonları kullanılarak C₁₈ kolonda elde edilen mutlak alıkonma süreleri

	Mutlak alıkonma süreleri (dakika)			
	I ^a	II ^b	III ^c	IV ^d
2,4-D asit				
1.0 ml/dak	5.38-5.48	2.04-2.05	4.55-4.62	3.55-4.09
1.5 ml/dak	4.20-4.37	1.37-1.39	5.23-5.89	2.10-2.68
2,4-D metil esterleri				
1.0 ml/dak	3.23-3.36	2.43-2.53	5.14-5.24	5.06-5.24
1.5 ml/dak	3.03-3.24	1.58-1.64	-	-

(a) 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su karışımı (75:25, v/v)

(b) Asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v)

(c) Asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v)

(d) Gradiyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı

(-) III ve IV no' lu mobil fazlar ile 1.5 ml/dak akış hızında çalışılmamıştır.

Çizelge 4.1' de de görüldüğü gibi 75:25 (v/v) oranında hazırlanmış asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında mutlak alıkonma süreleri çok kısa

olmuştur. Ancak bu karışım ile mutlak alıkonma sürelerinin oldukça stabil olduğu, diğer karışımlarda ise mutlak alıkonma sürelerinde sapmalar olduğu gözlenmiştir.

2,4-D' nin kapasite faktörü (k') değerleri, kullanılan herbir mobil faz karışımı için 1.0 ve 1.5 ml/dak akış hızlarında ayrı ayrı belirlenmiştir. Buna göre belirlenen kapasite faktörü (k') değerleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Farklı mobil faz karışımları kullanarak C₁₈ ters faz kolonda 2,4-D için elde edilen kapasite faktörü (k')* değerleri

Mobil faz no.	Kapasite faktörü (k')	
	1.0 ml/dak	1.5 ml/dak
1	2.88	2.81
2	0.63	0.65
3	2.38	4.32
4	1.03	0.65

(1) 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su karışımı (75:25, v/v)

(2) Asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v)

(3) Asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v)

(4) Gradyent asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı

(*) Kapasite faktörü değerleri $k' = t_1 - t_0 / t_0$ formülü ile elde edilmiştir. Burada t_1 2,4-D' nin alıkonma süresi, t_0 ise ilk pikin alıkonma süresidir.

75:25 (v/v) oranındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında elde edilen k' değerleri çok düşük bulunmuştur. Bu da 2,4-D' nin kolonda çok kısa süre kaldığını göstermektedir. Buna karşılık 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su karışımı kullanıldığında elde edilen k' değerlerinin uygun olduğu ve literatürle benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Roseboom ve arkadaşları (1982) yaptıkları çalışmada, 15cm x 4.6mm (iç çap) boyutlarındaki ters faz C₁₈ kolonda, 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımını mobil faz olarak kullanmışlar ve 2,4-D için k' değerinin 1.88 olduğunu kaydetmişlerdir.

2,4-DME analizlerinde elde edilen kapasite faktörleri ise Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3 : Farklı mobil faz karışımları kullanarak C₁₈ ters faz kolonda 2,4-DME için elde edilen kapasite faktörü (k')* değerleri

Mobil faz no.	Kapasite faktörü (k')	
	1.0 ml/dak	1.5 ml/dak
1	0.344	0.280
2	0.990	0.604
3	2.420	-
4	2.243	-

(1) 0.001 M PO₄⁻³ ve 0.005 M setrimit içeren metanol : su karışımı (75:25, v/v)

(2) Asetonitril : %2asetik asit içeren su karışımı (75:25, v/v)

(3) Asetonitril : %2asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v)

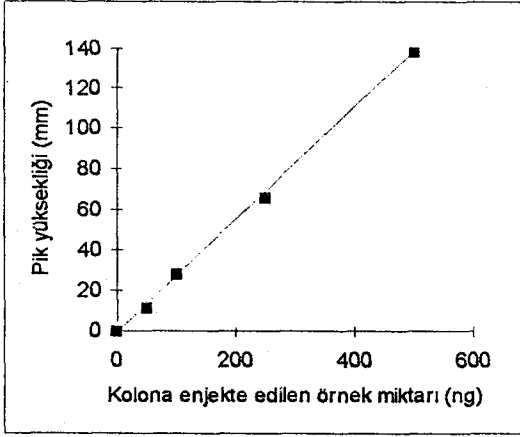
(4) Gradyent asetonitril : %2asetik asit içeren su karışımı

(-) 3 ve 4 no' lu mobil fazlar ile 1.5 ml/dak akış hızında çalışılmamıştır.

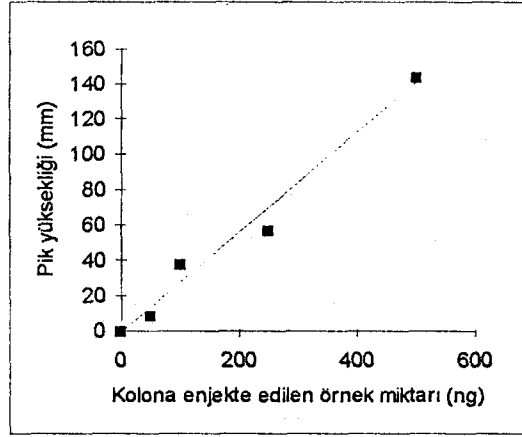
(*) Kapasite faktörü değerleri $k' = t_1 - t_0 / t_0$ formülü ile elde edilmiştir. Burada t₁ 2,4-DME' nin alıkonma süresi, t₀ ise ilk pikin alıkonma süresidir.

4.5. 2,4-D' nin Domatesten % Geri Kazanma Oranının Belirlenmesi

Geri kazanma oranlarının belirlenebilmesi amacıyla, 2,4-D uygulanmamış tarla domateslerine izin verilen ve daha yüksek dozlarda olmak üzere 2,4-D ilavesi yapılmıştır. Bunun için domates örneklerine 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg olacak şekilde 2,4-D ilave edilerek % geri kazanma oranları belirlenmiştir. 2,4-D ilave edilmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstraktın HPLC' de analizinde en iyi ayrılmış 2,4-D pikleri asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanıldığında elde edilmiştir. Bu nedenle kantitatif analizlerde mobil faz olarak asetonitril : %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılmıştır. 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg düzeylerinde 2,4-D ilave edilmiş domateslerden elde edilen ekstraktlar içindeki 2,4-D veya 2,4-DME konsantrasyonunun 5-50 ng/μl aralığında olduğu saptandığından, 2,4-D ve 2,4-DME için kantitatif analizler de kullanılmak üzere 0-50 ng/μl konsantrasyonları aralığında standart eğriler hazırlanmıştır. Buna göre 2,4-D ve 2,4-DME için elde edilen standart eğriler Şekil 4.26' da verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.26 : Kantitatif analizlerde kullanılan standart eğriler (a) 2,4-D ($r= 0,9996$, $p<0,05$), (b) 2,4-DME ($r= 0,9967$, $p<0,05$).

Farklı düzeyde 2,4-D ilave edilen domateslerle yürütülen denemelerde 2,4-D' nin geri kazanma oranının da farklı olduğu gözlenmiştir. Esterleştirme uygulamadan, 2,4-D asit formunda yürütülen denemelerde elde edilen % geri kazanma oranları Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Domatestte farklı ilave düzeylerinde 2,4-D için 2,4-D asit formunda elde edilen % geri kazanma oranları

İlave düzeyi (mg/kg)	25 g örnekteki 2,4-D miktarı (ng)	geri kazanılan 2,4-D miktarı (ng)	geri kazanma (%)
0.5	12 500	11 324-11 705	90.6-93.6
2	50 000	32 513-38 857	65.0-77.7
4	100 000	62 860-74 646	62.85-74.65

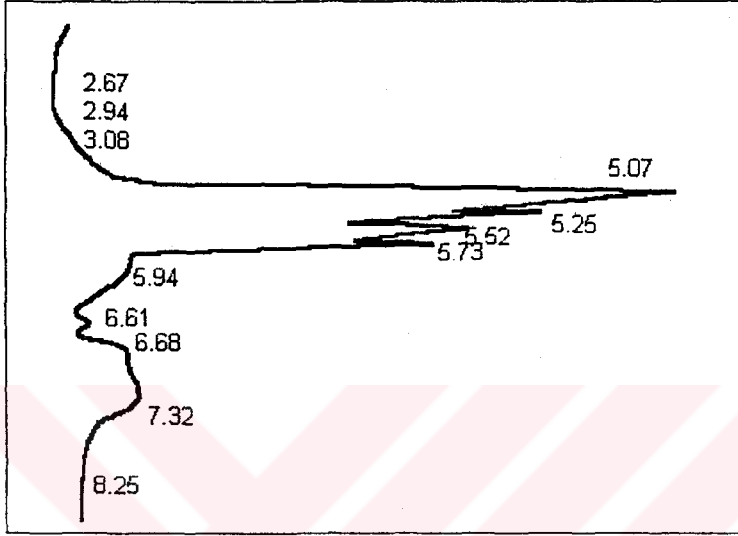
2,4-D' nin metil esteri formunda yürütülen denemelerde elde edilen % geri kazanma oranları ise Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5 : Domatestte farklı ilave düzeylerinde 2,4-D için 2,4-DME formunda elde edilen % geri kazanma oranları

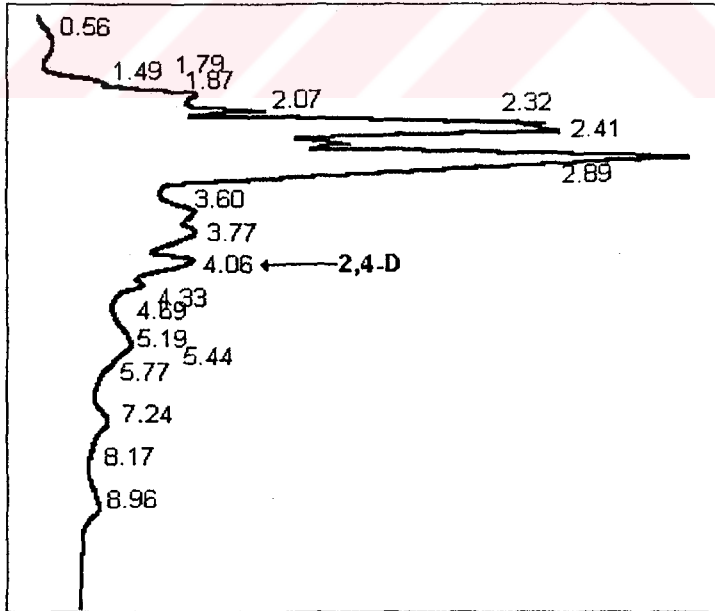
İlave düzeyi (mg/kg)	25 g örnekteki 2,4-D miktarı (ng)	2,4-DME olarak geri kazanılan 2,4-D miktarı (ng)	geri kazanma (%)
0.5	12 500	7 942 - 9 158	63.53-73.27
2	50 000	25 380-27 495	50.76-54.99
4	100 000	30 667-31 724	30.67-31.72

Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5' in kıyaslanmasından da görüldüğü gibi 2,4-D' nin domatesten geri kazanma oranları serbest asit formunda oldukça yüksek, buna karşılık metil esteri formunda ise düşük bulunmuştur.

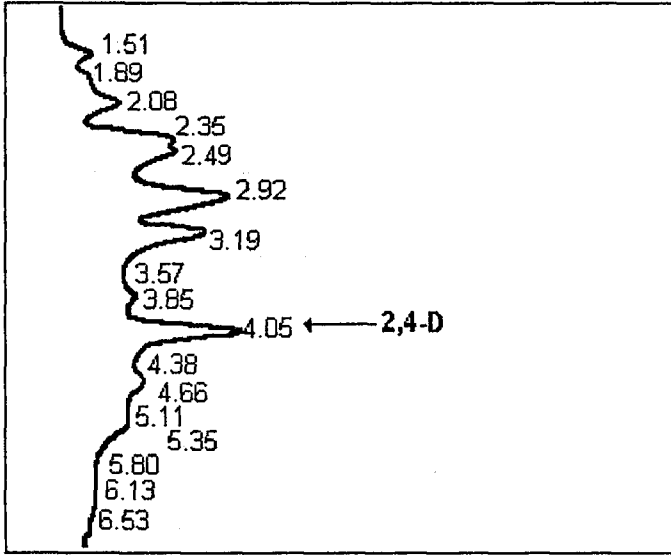
0, 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg ilave düzeyleri için asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50) kullanılarak elde edilen tipik 2,4-D kromatogramları Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30' da verilmiştir.



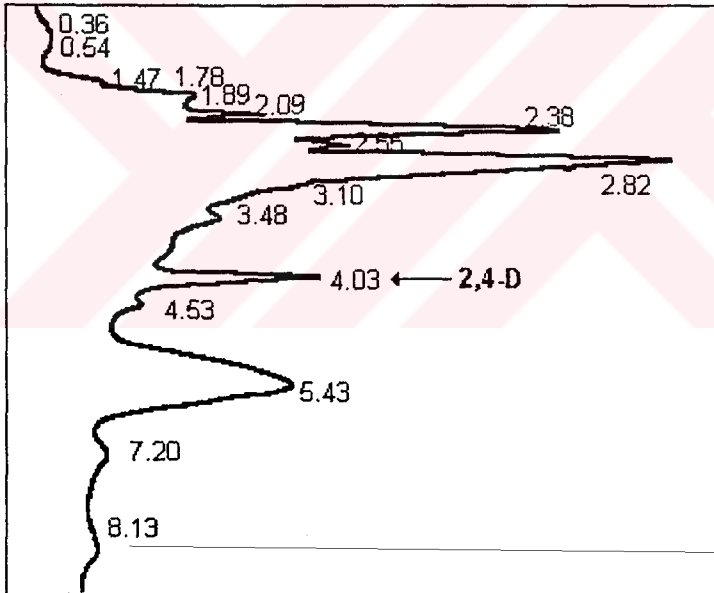
Şekil 4.27 : Kontrol örneği kromatogramı (0 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50) .



Şekil 4.28 : Örnek kromatogramı (0.5 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50).

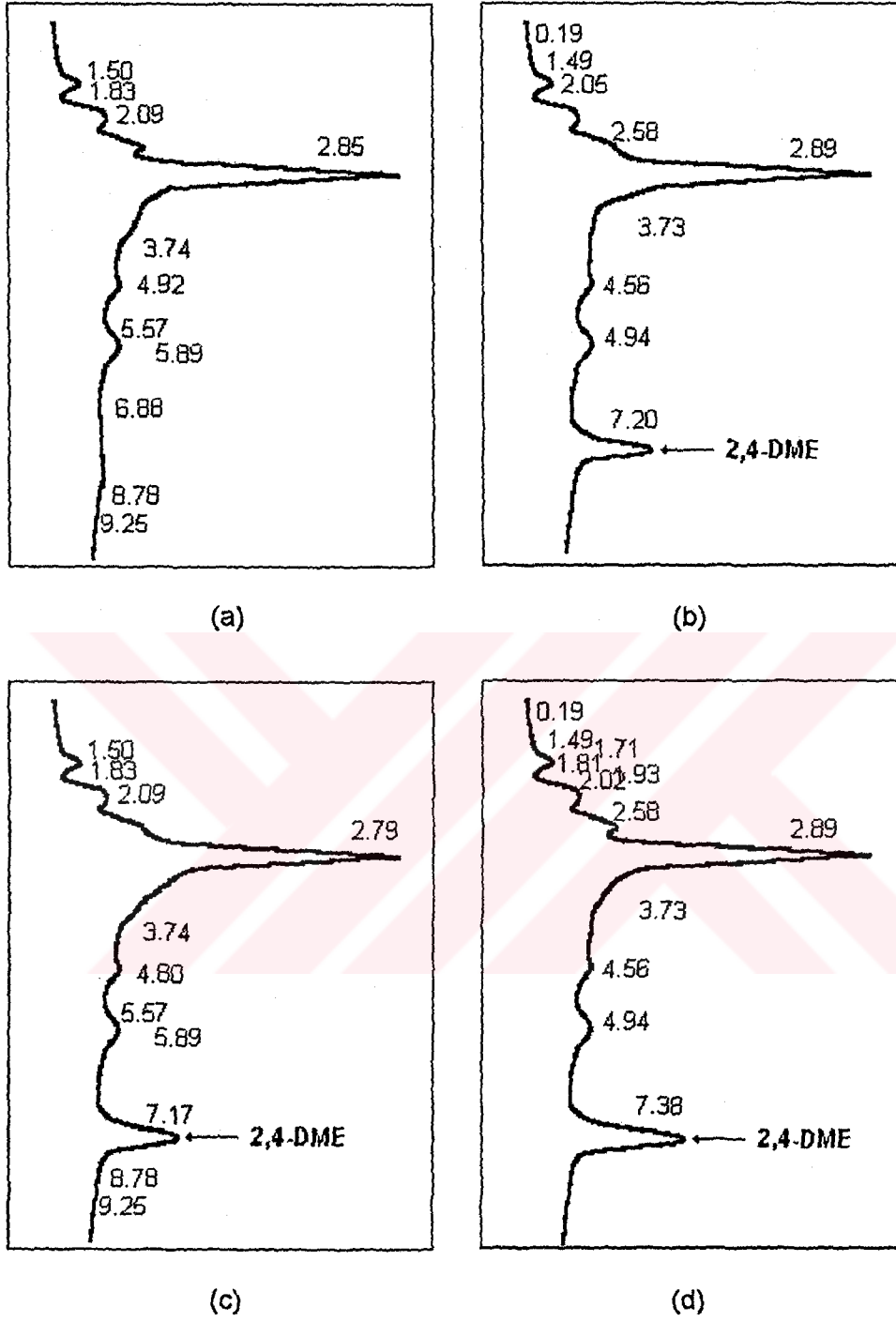


Şekil 4.29 : Örnek kromatogramı (2 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50).



Şekil 4.30 : Örnek kromatogramı (4 mg/kg). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50).

2,4-D' nin 2,4-DME olarak domatesten % geri kazanma oranının belirlenmesi amacıyla yürütülen denemelerde 0, 0.5, 2.0 ve 4.0 mg/kg ilave düzeyleri için elde edilen kromatogramlar ise Şekil 4.31' de verilmiştir.



Şekil 4.31 : Örnek kromatogramları (2,4-DME). Mobil faz: 1.0 ml/dak akış hızındaki asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50). (a) 0 mg/kg, (b) 0.5 mg/kg, (c) 2 mg/kg, (d) 4 mg/kg.

5. ÖNERİLER

Bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesinde çoğunlukla gaz kromatografisi kullanılmaktadır. Ancak 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asitler gibi yüksek polariteye sahip bileşiklerin gaz kromatografik olarak analiz edilebilmeleri için mutlaka esterleştirilmeleri gerekmektedir. Likit kromatografisi kullanıldığında ise bu bileşiklerin esterleştirmeye gerek duyulmadan serbest asit formunda analizleri mümkündür. Buna rağmen bitkisel materyallerdeki kalıntı 2,4-D analizlerinde HPLC' nin kullanıldığı bir çalışma henüz mevcut değildir.

Bu çalışmada, 2,4-D' nin serbest asit ve metil esteri formunda HPLC ile analizlerinde pik şekli ve ayrılma düzeyi açısından en iyi sonuçlar 50:50 (v/v) oranındaki izokratik asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı ile elde edilmiştir. Akış hızının 1.0 ml/dakika' dan 1.5 ml/dakika' ya çıkarılması 2,4-D analizlerini olumsuz etkilemiştir.

% geri kazanma denemelerinde elde edilen sonuçlara göre, domateslere 0.5 mg/kg düzeyinde ilave edilen 2,4-D, serbest asit formunda HPLC kullanılarak % 90.6 - 93.6 oranında geri kazanılmıştır. İlave edilen 2,4-D miktarının artması, geri kazanma oranının düşmesine neden olmuştur. 2,4-D' nin metil esteri formunda HPLC ile analizlerinde ise % geri kazanma oranlarının daha düşük olduğu görülmüştür. FAO/WHO tarafından belirlenen sınırlamalara göre, 2,4-D' nin birçok bitkisel gıdalarda bulunmasına izin verilen en yüksek miktarı 0.5 mg/kg' dir. Buna göre bu çalışmada kullanılan yöntem ile 0.5 mg/kg ilave düzeyinde elde edilen % geri kazanma oranları kabul edilebilir düzeyde olmuştur.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ

- Adolfsson, E. M. and Renberg, L., 1991,** Gas chromatographic determination of phenoxy acetic acids and phenoxy propionic acids as their 2,2,2-trifluoroethyl esters: *Chemosphere*, 23, 7, 845-854.
- Akerblom, M., 1985,** Simple precolumn sample enrichment in high-performance liquid chromatography for determination of phenoxy acid herbicides in water samples from exposure studies, *J. of Chrom.*, 319, 427-431.
- Akerblom, M. and Lindgren, B., 1983,** Simultaneous determination of active ingredient and chlorophenol impurities in phenoxy acid herbicide formulations by high performance liquid chromatography with ultra-violet and electrochemical detection : *J. of Chrom.*, 258, 302-306.
- Allender, W. J., 1989,** Determination of chlorophenoxy herbicides in plant material exposed to spray drift: *J. Chrom. Sci.*, 27, 4, 193-196.
- Anonymous, 1981,** Handbook of Pest Management in Agriculture, CRC Press Inc., Pimentel Boca Raton, Florida, Vol. III, 92.
- Anonymous, 1992,** Ruhsatlı Zirai Mücadele İlaçları, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları,, Bakanlık Basımevi, Ankara, s. 43
- Bristol, D. W., Cook, L. W., Koterba, M. T. and Nelson, D. C., 1982,** Determination of free and hydrolyzable residues of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol in potatoes: *J. Agric. Food Chem.*, 30, 137-144.
- Bristol, D. W., Nelson, D. C. and Cook, L. W., 1981,** Residues and dissipation of 2,4-D and 2,4-DCP in potato tubers: *American Potato J.*, 58, 144-151.
- Brondz, I. and Olsen, I., 1992,** Intra-injector formation of methyl esters from phenoxy acid herbicides: *J. Chrom.*, 598, 309, 312.
- Burgaz, S., 1982,** Türkiye'de kullanılan dipidril grubu ve klorlu fenoksiasetik asit grubu herbisitlerin analitik toksikoloji açısından incelenmesi: A. Ü. Eczacılık Fak., Farmasötik Toksikoloji anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 13-14, 25, 33-35.
- Cessna, A. J., 1980,** Simultaneous extraction and detection of residues of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid and bromoxynil from wheat: *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1229-1232.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

- Cessna, A. J.**, 1990, The determination of residues of 2,4-D in post-emergence-treated triticale: *Pestic. Sci.*, 30, 141-147.
- Cochrane, W. P., Lanouette, M. and Singh, J.**, 1983, High pressure liquid chromatographic determination of impurity phenols in technical 2,4-D acid and 2,4-dichlorophenol: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 3, 804-809.
- Cook, L. W., Zach, F. W., Klosterman, H. J. and Bristol, D. W.**, 1983, Comparison of free and total residues of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid and 2,4-dichlorophenol in millet resulting from postmergence and preharvest treatment: *J. Agric. Food Chem.*, 31, 268-271.
- Drinkwine, A. D., Bristol, D. W. and Fleeker, J. R.**, 1979, Separation of 2,4-D acid and its phenolic derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography: *J. Chrom.*, 174, 264-268.
- Ebing, W., Richtarsky, G., Boek, K., Eichner, M., Kypke-Hutter, K., Fetterroll, B., Oberdieck, R., Gilsbach, W., Thi Hanh, N., Mann, W., Specht, W., Stijve, T. und Wabbels, H.**, 1985 Zur Rückstandanalytik von Phenoxyalkansäure-Herbiciden in Setreidekörnern, *Lebensm. Chem., Gerichtl. Chem.*, 39, 126-130.
- Erner, Y. and Coggins, Jr., C. W.**, 1989, Free and bound residues of 2,4-D in "Marsh" grapefruit and "Washington" navel orange fruit: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114, 5, 846-850.
- Fayyad, M., Alawi, M. and El-Ahmad, T.**, 1989, High-performance liquid chromatographic determination of phenoxyalkanoic acid herbicides using iron(II) 1,10-phenanthroline as a mobile phase additive: *J. Chrom.*, 481, 439-444.
- Geerdink, R. B., Van Balkom, C. A. A. and Brouwer, H. J.**, 1989, Determination of phenoxyacid herbicides in water polymeric pre-column preconcentration and tetrabutylammonium ion-pair separation on PRP-1 column : *J. Chrom.*, 481, 275-285.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

- Gilsbach, W. und Thier, H.-P.**, 1982, Beitrage zur Rückstandanalyse von Chlorphenoxy-carbonsaure-Herbiciden in Weizenmehl: Z. Lebens. Unters. Forsch., 175, 327-332
- Grorud, R. B. and Forrette, J. E.**, 1984, Liquid chromatography of liquid formulations containing 2,4-D, dicamba, and MCCP as their salts: collaborative study: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 4, 837-839.
- Grorud, R. B. and Forrette, J. E.**, 1983, Liquid chromatography of liquid formulations containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, dicamba, and 2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid as their salts: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66,5, 1220-1225.
- Jensen, D. J. and Glas, R. D.**, 1981, Analysis for residues of acidic herbicides: Analysis of Pesticide Residues, A Wiley-Interscience Publication, New York, 223-261.
- Klement, J., Popl, M. and Voznakova, Z.**, 1988, Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil: Scientific Papers of the Prague Institute of Chemical Technology, H 22, 41-51.
- Larson, R. D. and Houglum, J. E.**, 1991, Liquid chromatography of pesticide formulations containing dicamba, 2,4-D, and MCCP: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 4, 679-681.
- Lokke, H.**, 1975, Analysis of free and bound chlorophenoxy acids in cereals: Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 13, 6, 730-736.
- Mattina, M. J. I.**, 1991a, Determination of chlorophenoxy acids using high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry: J. Chrom., 542, 385-395.
- Mattina, M. J. I.**, 1991b, Carrier effects in the analysis of phenylurea herbicides using high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry: J. Chrom., 549, 237-245.
- Meemken, H.-A., Rudolph, R., und Fürst, P.**, 1987, Nachweis und Bestimmung von Chlorphenoxy-carbonsauren durch Kapillar GC/MS: D. Lebens.-Rundschau, 83(8), 239-245

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

- Mierzwa, S., and Witek, S., 1977,** Gas-liquid chromatographic method with electron capture detection for the determination of residues of some phenoxyacetic acid herbicides in water as their 2,2,2-trichloroethyl esters: *J. Chrom.*, 136, 105-111.
- Moye, H. A., 1981,** High performance liquid chromatographic analysis of pesticide residues: *Analysis of Pesticide Residues*, A Wiley-Interscience Publication, New York, 157-197.
- Munro, H. E., 1972,** Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in tomato plants and other commercial crops by microcoulometric gas chromatography: *Pest. Sci.*, 3, 371-377
- Pearson, D., 1976,** *The Chemical Analysis of Foods*. Chuchill Livingstone, N. Y., Seventh Edition.
- Pietrzyk, D. J. and Chu, C. H., 1977a,** Separation of organic acids on Amberlite XAD copolymers by reversed phase high pressure liquid chromatography: *Anal. Chem.*, 49, 6, 860-867.
- Pietrzyk, D. J. and Chu, C. H., 1977b,** Amberlite XAD copolymers in reversed phase gravity flow and high pressure liquid chromatography: *Anal. Chem.*, 49, 6, 757-763.
- Popov, V. G., 1979,** Determining picloram and 2,4-D in water and soil by gas-liquid chromatography: *Third All-Union Conference on the analysis of Pesticide Residues. Summaries of papers.*, Moscow, 37-38.
- Renberg, L., 1974,** Ion exchange technique for the determination of chlorinated phenols and phenoxy acids in organic tissue, soil, and water: *Anal. Chem.*, 46, 3, 459-461.
- Roseboom, H., Herbold, H. A. and Berkhoff, C. J., 1982,** Determination of phenoxy carboxylic acid pesticides by gas and liquid chromatography: *J. Chrom.*, 249, 323-331.
- Samoilov, L. N., Popov, V. G. and Chekrygina, G. N., 1979,** Gas chromatographic determination of 2,4-D in plants in physiological and biochemical investigations: *Third All-Union Conference on the Analysis of Pesticide Residues. Summaries of papers.*, Moscow, 36.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

- Sekita, H., Takeda, M., Saito, Y. and Uchiyama, M., 1982,** Studies on analysis of pesticide residues in foods. XXXVI. Analytical method for multi-residues of chlorinated-phenoxy agricultural chemicals (2,4-D, 2,4,5-T and 2,4,5-TP fenoprop) in fruits: *J. of Hygienic Chem.* , 28, 4, 219-227.
- Sell, C. R. and Maitlen, J. C., 1983,** Procedure for the determination of residues of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in dermal exposure pads, hand rinses, urine and perspiration from agricultural workers exposed to the herbicide: *J. Agric. Food Chem.*, 31, 572-575.
- Smith, A. E. and Hayden, B. J., 1979,** Method for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid residues in urine: *J. Chrom.*, 171, 482-485.
- Smith, R. L. and Pietrzyk, D. J., 1983,** LC enrichment, separation, and determination of chlorophenols and phenoxyacetic acids on PRP-1: *J. Chrom. Sci.*, 21, 282-287.
- Smith, A. E., 1984,** Gas Chromatographic method for analysis of 2,4-D in wheat: interlaboratory study: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 4, 794-798.
- Specht, W. and Tillkes, M., 1981,** Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über Gel-chromatographie und Mini-kieselgel-säulen-chromatographie. 4. Mitteilung. Gas-chromatographische Bestimmung von 11 Herbiciden Phenoxyalkancarbonsäuren und ihren Estern in Pflanzenmaterial: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 307, 257-264.
- Specht, W. and Tillkes, M., 1985,** Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über Gel-chromatographie und Mini-kieselgel-säulen-chromatographie. 5. Mitteilung. Methode zur Aufarbeitung von Lebensmitteln und Futtermitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft für die Multi-rückstandsbestimmung lipoid- und wasserlöslicher Pflanzenbehandlungsmittel: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322, 443-455.
- Steinwandter, H., 1989,** Contributions to the analysis of chlorophenoxy acids. A simple method for the determination of five chlorophenoxyalkane carboxylic acids in cereals: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 334, 133-135.

DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam ediyor)

- Waliszewski, S. M. and Waliszewski, K. N., 1987, GC-determination of chlorophenoxy acetic herbicides (MCPA and 2,4-D) in water and soil. Reinvestigation of the technique: Fresenius Z. Anal. Chem., 329, 489.**
- Waliszewski, S. M. and Szymczyński, G. A., 1985, Modified method for the GC determination of chlorophenoxy acetic acid herbicides (MCPA and 2,4-D) in soil and water: Fresenius Z. Anal. Chem., 322, 510-511.**
- Wells, M. J. M. and Michael, J. L., 1987, Recovery of picloram and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous samples by reversed-phase extraction: Anal. Chem., 59, 1739-1742.**
- Wigfield, Y. Y. and Lanouette, M., 1988, Liquid chromatographic determination of phenolic impurities in technical MCPA using electrochemical detection (coulometric mode) : J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 2, 325-327.**
- Wong, Y. S., 1982, Gas-liquid chromatographic determination of 4-chloro-phenoxy acetic acid residues in mung bean sprouts: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65, 5, 1118-1121.**
- Yip, G., 1971, Improved method for determination of chlorophenoxy acid residues in total diet samples: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54, 4, 966-969.**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Vural Gökmen
Doğum Yeri : Karabük
Doğum Yılı : 01.03.1968
Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise 1982-1985 Karabük Demir-Çelik Lisesi
Lisans 1985-1990 H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü
Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi

1990-1993 H.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü