

**T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**KARBENDAZİM VE KLORPİRİFOS' UN  
MEYVE VE SEBZE ÖRNEKLERİNDE  
HPLC/FD İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

**Yasemin TURHAN**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER**

**Yozgat 2014**



**T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**KARBENDAZİM VE KLORPİRİFOS' UN  
MEYVE VE SEBZE ÖRNEKLERİNDE  
HPLC/FD İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

**Yasemin TURHAN**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER**

**Yozgat 2014**

T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Kimya Anabilim Dalı 70110111005 numaralı öğrencisi Yasemin TUHAN' ın hazırladığı "Karbendazim ve Klorpirifos'un Meyve ve Sebze Örneklerinde HPLC/FD ile Eş Zamanlı Tayini" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 20/08/2014 Çarşamba günü saat 10:00'da yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.


Başkan : Doç. Dr. İsmail AKDENİZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER (Danışman)



Üye : Yrd. Doç. Dr. İrfan KOCA



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28/08/2014 tarih ve 27 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

28/08/2014



Müdür

Yrd.Doç.Dr. Ramazan COŞKUN  
Bozok Üniversitesi  
Fen.Bil.Enst.Müd.V.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ .....	1
2. PESTİSİT.....	3
2.1. Pestisit Tanımı ve Tarihçesi .....	3
2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması .....	4
2.2.1. Formülasyon Şekillerine Göre Sınıflandırma .....	4
2.2.2. Kullanım Şekillerine Göre Sınıflandırma .....	5
2.2.3. Kökenlerine Göre Sınıflandırma .....	5
2.2.4. Kullanıldıkları Zararlı Grubuna Göre Sınıflandırma .....	6
2.2.4.1. İnsektisitler .....	7
2.2.4.2. Herbisitler.....	7
2.2.4.3. Fungusitler.....	7
2.3. Pestisitlerin Özellikleri .....	8
2.3.1. Aktif Bileşen .....	8
2.3.2. Toksikite.....	9
2.3.3. Formülasyon.....	9
2.3.4. Etkili Doz .....	10
2.3.5. Yarılanma Ömrü.....	10
2.4. Pestisit ve Çevre .....	10
2.4.1. Gıdalarda Pestisit Kalıntısı.....	12
2.4.2. Toprakta Pestisit Kalıntısı .....	15
2.4.3. Sularda Pestisit Kalıntısı .....	15
2.4.4. Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri ve Literatür Örnekleri .....	17
2.5. Türkiye’de ve Dünya’da Pestisit Kullanımı.....	19

2.6. Karbendazim ve Klorpirifos'un Temel Özellikleri .....	22
2.6.1. Karbendazim .....	22
2.6.2. Klorpirifos .....	23
<b>3. KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI (HPLC) .....</b>	<b>24</b>
3.1. Kromatografi Çeşitleri .....	24
3.1.1. Sıvı Kromatografi Çeşitleri .....	24
3.1.1.1. Adsorbsiyon (Katı-Sıvı) Kromatografisi .....	24
3.1.1.2. Dağılıma (Sıvı-Sıvı) Kromatografisi.....	25
3.1.1.3. İyon Değişirme Kromatografisi .....	26
3.1.1.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	26
3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	26
3.2.1. Mobil Faz .....	28
3.2.2. Degazör .....	28
3.2.3. Pompa.....	29
3.2.4. Örnekleyici (Autosampler).....	31
3.2.5. Kolon.....	32
3.2.6. Dedektör .....	35
3.2.7. Kaydedici .....	38
3.3. Kromatografik Ayırma İşleminin Grafikselsunumu .....	38
3.4. Kromatografi Parametreleri .....	39
3.4.1. Alıkonma Zamanı ( $t_R$ ) .....	40
3.4.2. Kapasite Faktörü ( $k'$ ).....	41
3.4.3. Seçicilik Faktörü .....	41
3.4.4. Kolon Ayırma Gücü.....	42
3.4.5. Kolon Verimliliği .....	43
3.5. Yöntem Validasyon Parametreleri .....	44
3.5.1. Doğruluk .....	44
3.5.1.1. Referans Bir Yöntemle Karşılaştırmak .....	44
3.5.1.2. Kör (Matriks) Ortamına Analizi Yapılan Maddeyi İlave Etmek .....	44
3.5.1.3. Standart Ekleme Yöntemi İle Saf Madde İlavesi.....	45
3.5.2. Kesinlik .....	45
3.5.3. Seçicilik.....	45
3.5.4. Teşhis Sınırı (LOD).....	46

3.5.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	46
3.5.6. Doğrusallık.....	46
3.5.6.1. Kalibrasyon Grafiği.....	47
3.5.6.2. Duyarlık.....	47
3.5.6.3. Çalışma Aralığı .....	47
3.5.6.4. Sağlamlık.....	47
3.5.6.5. Tutarlılık.....	48
<b>4. METARYAL VE METOT .....</b>	<b>49</b>
4.1. Kullanılan Bazı Kimyasallar ve Özellikleri .....	49
4.2. Kullanılan Cihazlar .....	49
4.2.1. Yüksel Performanslı Sıvı Kromatografisi .....	49
4.2.2. Ultrasonik Banyo .....	50
4.2.3. Teraziler.....	51
4.2.4. Ultra Saf Su Cihazı.....	51
4.2.5. Filtrasyon Düzenegi .....	52
4.2.6. Evaporatör .....	52
<b>5. DENEYSEL .....</b>	<b>54</b>
5.1. Karbendazim ve Klorpirifos İçin Optimum Koşulların Tayini.....	54
5.1.1. Karbendazim ve Klorpirifos İçin Optimum Mobil Faz Seçimi.....	55
5.1.2. Karbendazim ve Klorpirifos için Optimum Akış Hızının Belirlenmesi ....	61
5.1.3. Karbendazim ve Klorpirifos İçin Optimum Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi .....	64
5.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi .....	66
5.2.1. Karbendazimin Kalibrasyon Grafiği .....	67
5.2.2. Klorpirifosun Kalibrasyon Grafiği.....	68
5.3. Örneklerin Analize Hazırlanması.....	70
5.4. Optimum Şartlarda Elde Edilen Kromatogramlar.....	72
5.5. Kayseri İline ait Elma Örneği Ekstraksiyonuna Standart Çözelti Eklenmesi .....	77
<b>6. SONUÇ VE YORUM .....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>

# **KARBENDAZİM VE KLORPİRİFOS' UN MEYVE VE SEBZE ÖRNEKLERİNDE HPLC/FD İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

**Yasemin TURHAN**

**Bozok Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**2014; Sayfa:89**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER**

## **ÖZET**

Bu çalışmada karbendazim (mantar ilacı) ve klorpirifos'un (böcek ilacı) tayini için floresans dedektör ile yüksek basınçlı sıvı kromatografik (RP-HPLC-FD) metod geliştirildi. Bu çalışma eser miktardaki karbendazim ve klorpirifos'un sebze ve meyve örneklerinde düşük LOD ve LOQ ile kısa zamanlı (8 dakikadan az) RP-HPLC-FD ile eş zamanlı tayini için geliştirilen ilk çalışmadır. Optimum şartlar mobil faz için (metanol:su, 98:2,v/v) kullanılarak elde edildi ve floresans dedektör için ( $\lambda_{Ex}$  ve  $\lambda_{Em}$ , sırasıyla 280 ve 340 nm) olarak kullanıldı. Dinamik aralığı 0.100-100  $mgL^{-1}$  arasında, bağıl standart sapması ise 0.45%'den ( $n=4$ ) daha azdır. Karbendazim ve klorpirifosun gözlenebilir sınırları sırasıyla 0.073 ve 0.062  $mgL^{-1}$ , ortalama geri kazanım aralığı sırasıyla % 84.2-106.5 ve % 90.3-85.7 olarak saptandı. Yöntem elma, greyfurt, mandalina, ıspanak ve maydanoz örneklerine uygulandı. Bütün örneklerde klorpirifos kalıntısı konsantrasyon sınırlarını aştığı, örneklerin çoğunda ise karbendazim kalıntısı izin verilen sınırlar arasında olduğu görüldü. Hatta elma örneklerinin iç kısmına nüfuz ettiği ve yıkamayla ile de tamamen uzaklaşmadığı görüldü. Toplanan örneklerin çoğunda karbendazim kalıntısı izin verilen sınırlar içinde idi.

**Anahtar Kelimeler:** Karbendazim, Klorpirifos, Sebze, Meyve, RP-HPLC-FD.



# **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CARBENDAZIM AND CHLORPYRIFOS IN SELECTED FRUITS AND VEGETABLES SAMPLES BY HPLC WITH FLUORESCENCE DETECTION**

**Yasemin TURHAN**

**Bozok University  
Graduate School of Natural  
and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Master of Science Thesis**

**2014;Page:89**

**Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Orhan HAZER**

## **ABSTRACT**

In this study, a new method was developed to determination of carbendazim(fungasite) and chlorpyrifos(insecticide) by fluorescence detector High performance liquid chromatography (RP-HPLC-FD). This study is the first for simultaneous determination of trace Carbendazim and Chlorpyrifos in fruits and vegetables samples with low LOD and LOQ and short analysis time (less 8 min) by RP-HPLC-FD. Optimum conditions were achieved using binary mobile phase consisting of (methanol: water; 98:2, v/v) and fluorescence detection ( $\lambda_{Ex}$  and  $\lambda_{Em}$  set at 280 and 340 nm, respectively) was used. The dynamic range was between 0.100 to 100 mg/L with relative standard deviation less than 0.45%, (n=4).Limits of detection were founded 0.073 and 0.062 mg/L, respectively. The range of average recoveries for carbendazim and chlorpyrifos were founded 84.2-106.5% and 90.3-85.7%, respectively. The method was applied to apple, grapefruit, tangerines, spinach and parsley samples. The results revealed that the concentrations of chlorpyrifos residue in all collected samples was exceeded limits, even in the apple samples penetrates into the interior and its not remove all by washing. Carbendazim residue in most of collected samples was in the permissible limits.

**Key Words:** Carbendazim, Chlorpyrifos, Vegetable, Fruit, RP-HPLC-FD

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarının planlanması ve yürütülmesi aşamalarında bana her türlü desteği sağlayan, çalışmalarım sırasında değerli görüş ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilimsel çalışma anlayışını ve iş disiplini örnek aldığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER'e bana her alanda ışık tuttuğu için içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarıyla yanımda olan, bilgi birikimlerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yüksek Kimyager Dilara DEMİR, Kiraz GÜNGÖR, Merve PELTEK'e ve Tuğba KAHRAMAN'a, meslekdaşım Uzman Mohammed AKBİKK'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitim hayatımda üzerimde sayısız emeği olan değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan COŞKUN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali DELİBAŞ, Sayın Doç. Dr. İsmail AKDENİZ, Sayın Yrd. Doç. Dr. İrfan KOCA, Sayın Doç. Dr. Hakan ÜNGÖREN ve Sayın Prof. Dr. Mustafa SAÇMACI'ya,

Her koşulda yanımda ve bana destek olan Mustafa BAYRAMOĞLU'na tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, elde ettiğim başarılarıdaki en büyük paya sahip olan kıymetli aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

## TABLolar LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Pestisitlerin Önemli Sınıfları .....	4
<b>Tablo 2.2:</b> Türk Gıda Kodeksi'Ne Göre Pestisitlerin Bazı Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Miktarları .....	13
<b>Tablo 2.3:</b> Avrupa Direktiflerine Göre Pestisitlerin Bazı Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Miktarları .....	14
<b>Tablo 3.1:</b> Yaygın HPLC Dedektörleri Ve Özellikleri .....	37
<b>Tablo 4.1:</b> Kullanılan Kimyasallar Ve Özellikleri .....	49
<b>Tablo 5.1:</b> Dalga Boyu Ölçümü .....	54
<b>Tablo 5.2:</b> ACN - H <sub>2</sub> O Mobil Faz Karışımı Verileri.....	56
<b>Tablo 5.3:</b> ACN - H <sub>2</sub> O Mobil Faz Karışımı Verileri.....	57
<b>Tablo 5.4:</b> MeOH - H <sub>2</sub> O Mobil Faz Karışımı Verileri.....	58
<b>Tablo 5.5:</b> MeOH - H <sub>2</sub> O Mobil Faz Karışımı Verileri.....	59
<b>Tablo 5.6:</b> Akış Hızı Tarama Verileri .....	61
<b>Tablo 5.7:</b> Akış Hızı Tarama Verileri .....	63
<b>Tablo 5.8:</b> Kolon Sıcaklığı Taramasının Verileri.....	65
<b>Tablo 5.9:</b> Kolon Sıcaklığı Tarama Verileri.....	66
<b>Tablo 5.10:</b> Karbendazimin Kalibrasyon Verileri.....	67
<b>Tablo 5.11:</b> Klorpirifos Kalibrasyon Verileri.....	69
<b>Tablo 5.12:</b> Kayseri Elma Örneğinde Geri Kazanım Çalışması (µg/Kg, N=12). ....	77
<b>Tablo 6.1:</b> Geliştirilen Yöntem İçin Optimum Parametreler .....	79
<b>Tablo 6.2:</b> Karbendazim ve Klorpirifosa Ait Analitik Veriler .....	80
<b>Tablo 6.3:</b> Kayseri ve Yozgat İllerinde Farklı Tarım Alanlarından Toplanan Taze Meyve ve Sebze Örneklerinde Karbendazim Ve Klorpyrifos Kalıntılarının (µg/Kg) Konsantrasyon Verileri. ....	80
<b>Tablo 6.4:</b> Kayseri Elma Örneklerinde Yıkama Sonrası Analiz Sunuçları (µg/Kg). 81	
<b>Tablo 6.5:</b> Kayseri'den Alınan Elma Kabuk Ve Elma İçi Örneklerinde Analiz Sonuçları (µg/Kg) .....	82

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Pestisitlerin Farklı Taşınma Yolları .....	11
Şekil 2.2: Hidrolojik Döngü .....	16
Şekil 2.3: Sucul Çevrede Pestisitlerin Kaynakları Ve Geleceği .....	17
Şekil 2.4: Dünya’da Tarım İlacı Kullanımı .....	20
Şekil 2.5: Tarım İlacı Kullanımı Kg/Ha .....	20
Şekil 2.6: 2012 Yılı Sonu İtibariyle Türkiye Pestisit Kullanım Oranları .....	21
Şekil 2.7: Türkiye’de Bölgelere Göre Tarım İlacı Kullanım Oranları. ....	22
Şekil 2.8: Karbendazimin Kimyasal Yapısı.....	22
Şekil 2.9: Klorpirifosun Kimyasal Yapısı. ....	23
Şekil 3.1: HPLC Cihazının Diyagramı. ....	27
Şekil 3.2: Mobil Faz .....	28
Şekil 3.3: HPLC Degazörünün Diyagramı .....	29
Şekil 3.4: HPLC’si Pompası.....	31
Şekil 3.5: HPLC’si Örnekleyicisi .....	32
Şekil 3.6: Standart Kolon Donanımı.....	34
Şekil 3.7: HPLC Kolon Fırını Ve HPLC Kolonu .....	35
Şekil 3.8: Kolonda Analit Bileşenlerinin Ayrılması Ve Kromatogram.....	35
Şekil 3.9: Floresans Dedektör.....	38
Şekil 3.10: Ayırma İşleminin Grafıksel İfadesi. ....	39
Şekil 3.11: Kolon Ayırım Gücünün Gösterildiği Bir Kromatogram. ....	43
Şekil 4.1: Shimadzu Marka HPLC Cihazı.....	50
Şekil 4.2: Ultrasonik Banyo.....	51
Şekil 4.3: Shimadzu Marka Hassas Terazi .....	51
Şekil 4.4: Ultra Saf Su Cihazı.....	52
Şekil 4.5: Filtrasyon Düzeneği .....	52
Şekil 4.6: Rotary Evaporatör .....	53
Şekil 5.1: Dalga Boyu Taraması; ( A) 280-340 nm (B) 285-315nm, (C) 330-425nm, (D) 330-465, (E) 350-465nm Dalga Boyu Değerlerinde Yapılan Ölçümlere Ait Kromatogramlar .....	55
Şekil 5.2: ACN:H <sub>2</sub> O Mobil Faz Taraması.....	56
Şekil 5.3: ACN:H <sub>2</sub> O Mobil Faz Taraması.....	57

<b>Şekil 5.4:</b> Mobil Faz Olarak % 20 ACN:% 80 H <sub>2</sub> O Karışımı Kullanıldığında Elde Edilen Kromatogram .....	58
<b>Şekil 5.5:</b> Meoh:H <sub>2</sub> O Mobil Faz Taraması .....	59
<b>Şekil 5.6:</b> Meoh:H <sub>2</sub> O Mobil Faz Taraması .....	60
<b>Şekil 5.7:</b> Mobil Faz Olarak % 98 MeOH : %2 H <sub>2</sub> O Karışımı Kullanıldığında Elde Edilen Kromatogram .....	60
<b>Şekil 5.8:</b> Akış Hızı Taraması.....	62
<b>Şekil 5.9:</b> 0.8 Ml.dk <sup>-1</sup> Optimum Akış Hızına Ait Kromatogram .....	62
<b>Şekil 5.10:</b> Akış Hızı Tarama Verileri.....	63
<b>Şekil 5.11:</b> (A) 1ml.dk <sup>-1</sup> Akış Hızına Ait Kromatogram, (B) 1.2ml.dk <sup>-1</sup> Akış Hızına Ait Kromatogram .....	64
<b>Şekil 5.12:</b> Kolon Sıcaklığı Taraması.....	65
<b>Şekil 5.13:</b> Kolon Sıcaklığı Taraması.....	66
<b>Şekil 5.14:</b> Karbendazime Ait Kalibrasyon Grafiği .....	68
<b>Şekil 5.15:</b> Klorpirifosa Ait Kalibrasyon Grafiği .....	69
<b>Şekil 5.16:</b> Karbendazim Ve Klorpirifosa Ait Tipik Kromatogram .....	70
<b>Şekil 5.17:</b> Ispanak Örneğinin Ekstraksiyona Hazırlanması .....	70
<b>Şekil 5.18:</b> Homojenizasyon İşlemine Tabi Tutulan Ispanak Örneği.....	71
<b>Şekil 5.19:</b> Ayırma Hunisinde Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu .....	71
<b>Şekil 5.20:</b> Organik Fazın Sodyum Sülfattan Geçirilmesi.....	72
<b>Şekil 5.21:</b> Optimum Koşullarda Karbendazim Ve CPF'a Ait Kromatogram (A), Yıkama İşlemi Uygulanmamış Ekstraksiyon İşlemi Uygulanmış Kayseri'den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram (B), Yıkama İşlemi Uygulanmış Ekstrakte Edilmiş Kayseri'den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram (C).....	73
<b>Şekil 5.22:</b> Kayseri'den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram.....	74
<b>Şekil 5.23:</b> Yozgat'tan Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram.....	74
<b>Şekil 5.24:</b> Greyfurt Örneğine Ait Kromatogram.....	75
<b>Şekil 5.25:</b> Mandalina Örneğine Ait Kromatogram .....	75
<b>Şekil 5.26:</b> Ispanak Örneğine Ait Kromatogram .....	76
<b>Şekil 5. 27:</b> Maydonoz Örneğine Ait Kromatogram .....	76
<b>Şekil 5.28:</b> Kayseri'den Alınan Elma Örneği Ekstarksiyonuna Ait Kromatogram (C) 100 ppb Karbendazim (1) ve Klorpirifos (2) Eklenmiş Hali (B), 1000 ppb Karbendazim ve Klorpirifos Eklenmiş Hali (A).....	78

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>DDT</b>	: Dikoloro difenol trikloroetan
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
<b>RP-HPLC-FD</b>	: Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi floresans dedektörü
<b>GC</b>	: Gaz Kromatografi
<b>OPPs</b>	: Organofosfor pestisitler
<b>FAO</b>	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ADI</b>	: Kabul edilebilir günlük miktar (toksikite)
<b>MRL</b>	: Maksimum kalıntı limitleri (standart)
<b>CPF</b>	: Klorpirifos
<b>FD</b>	: Floresans
<b>VK</b>	: Varyasyon katsayısı
<b>µg</b>	: Mikro gram
<b>µL</b>	: Mikro litre
<b>SS</b>	: Standart Sapma
<b>BSS</b>	: Bağlı Standart Sapma
<b>N*</b>	: Teorik Tabaka Sayısı
<b>LD</b>	: Öldürücü doz
<b>LC<sub>50</sub></b>	: Öldürücü yoğunluk

## 1.GİRİŞ

Günümüz dünya nüfusu ile beslenme ihtiyacı doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Ancak, gıda ihtiyacını karşılamak için üretilen ürünlerin bazı hastalık, zararlı ve yabancı otlardan dolayı yaklaşık % 65'i zarar görmekteydi. İstatistiklere göre bu şekilde oluşan ürün kaybı 23 milyon ton olup 150 milyon insanın bir yıllık ihtiyacı kadardır. Bu sebeple insanlar tarımsal alanlardaki verimi arttırabilmek ve gıda maddelerinin dayanım sürelerini uzatabilmek için çok farklı yöntemler kullanmaktadır. Bu yöntemlerden birisi tarımsal alandaki ürün verimliliğini arttıran tarımsal mücadele adı altında yapılan kimyasal mücadele yöntemidir. Aslında bu yöntemin temelini kimyasal savaşımın ana maddesi olan pestisitler oluşturmaktadır. Pestisitler tarım ürünlerini zararlı böcekler, patojen organizmalar ve yabancı otlardan korumak, ürün kalitesini ve verimi arttırmak için kullanılırlar. 4500 yıl önce kullanılan ilk pestisit, elementel kükürt tozudur. 15. yüzyıla kadar haşerelere karşı arsenik, civa ve kurşun gibi son derece toksik olan inorganik yapıdaki pestisitler kullanılmıştır. 17. yüzyılda tütün yapraklarından, yabancı otları öldürmek amacıyla nikotin sülfat elde edilmiştir. 19. yüzyılda doğal bir pestisit olan rotenon kullanılmaya başlanmış ve 1939'da çok etkili olan dikloro difenol trikloroetan (DDT) yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak, 1960'larda DDT'nin ekosistem üzerine yapmış olduğu olumsuz etkiler nedeniyle birçok ülkede kullanımı yasaklanmıştır. Ülkemizde yılda ortalama 35.000 ton tarım ilacı kullanılmaktadır. Ülkemizde hektar başına kullanılan % 100 aktif madde olarak, sadece 600 g olsa da, Ege ve Akdeniz bölgelerinde kullanılan tarım ilacı miktarı birçok Avrupa ülkesinin üzerindedir [1].

Zararlılarla savaşım amacıyla kullanılan bu maddeler bilinçsiz kullanım sonucu meyve ve sebzelerde kalabilmektedir. Aşırı tarım ilacı kullanımı nedeniyle toprakta birikebilmekte, suya ve havaya karışmaktadır. Bu maddeler üstelik buldukları iki ortamlarda başka maddelere parçalanabilmekte veya dönüşebilmektedir. Bir pestisitinin çevredeki hareketliliğini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon ve uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir. Üstelik bu ortamlarda yaşayan bazı canlılara, buradan da besin

zinciriyle insanlara geçmektedir. Bazı pestisitler toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturuıcı etkiler gösterdiği bilinmektedir [2,3].

Pestisitlerin olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasıyla dünyadaki pek çok ülke ile birlikte Türkiye’de de pestisit kullanımıyla ilgili bazı sınırlamalar ve yeni düzenlemeler yapılmıştır.

Bu çevresel problemlerin boyutunun incelenmesi ve izlenmesine yönelik olarak pestisit kalıntı tayinlerine ilişkin çalışmalar da önem kazanmaktadır. Her zirai ürün sınıfına ait uygulanan pestisit grupları farklı olduğu için yapılan kalıntı tayinleri, o pestisit gruplarını kapsamaktadır. Toksikolojik risklerin ortaya çıkarılması, pestisit grubunun belirlenmesi ve kalıntı tayini için analitik metod geliştirme çalışmaları çok önemlidir. Bu amaçla, genelde pestisitlerin tayinlerine yönelik en çok tercih edilen teknikler arasında gaz kromatografisi (GC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gelmektedir [1].

Tarımda kullanılan pestisitlerin teknolojilerindeki gelişmeler, farklı özelliklere sahip pestisitlerin sentezlenmesi, var olan metotların ihtiyaca cevap verememesi veya daha az kimyasal kullanımı ile daha kısa sürede sonuç veren basit ve hızlı metot arayışları, metot geliştirme çalışmalarının sürekli olarak güncel kalmasını sağlamaktadır [4].

Bu çalışmada, Yozgat ve Kayseri illerine ait farklı tarım alanlarındaki sebze ve meyve örneklerinde karbendazim ve klorpirifosun eş zamanlı tayini için floresans dedektör (RP-HPLC-FD) ile yüksek basınçlı sıvı kromatografik metod geliştirilmiştir.



## 2. PESTİSİT

Tarım ve Köy işleri Bakanlığına göre pestisit, zirai mücadele araştırma ve uygulamalarında kullanılan her türlü kimyasal madde ve preparatları şeklinde tanımlanır. Tarımsal ürünlerin ve yiyeceklerin boyut, verim, depolama ve pazarlama kalitesini azaltan böcekler, halk sağlığı açısından da önemlidir. Bu böceklerin öldürülmesi açısından pestisit adını verdiğimiz kimyasallar geliştirilmiştir. Pestisit, insan ve hayvan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, depolanma ve tüketimi sırasında besin değerini düşüren ya da zarara uğratan böcek, kemirici, yabani ot, mantar gibi canlı formlarının yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak için kullanılan maddelerden oluşan karışımdır. Pestisit, kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, anti mikrobik, dezenfektan olabilir [5].

### 2.1. Pestisit Tanımı ve Tarihçesi

Pestisitler Roma ve eski Yunan'dan beri kullanılmaktadır. 19. yüzyılın son dönemlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı sonrasında hastalık, zararlı ve yabancı otların kimyasal savaşımı konusunda önemli ilerlemeler olmuştur. Pestisit olarak kullanılan ilk maddeler arsenik ve kükürttür. Daha sonra botanik kökenli maddeler (nikotin gibi) kullanılmaya başlanmıştır. Bunu takiben krizantemden elde edilen pyrethrum 19 yy.dan başlanarak kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda ise pestisit kullanımına civa ve kurşun metal bileşikleri de girdi. Böceklere karşı savaşta pestisitlerin yaygın kullanımı 1940 yıllarının ortalarında başladığı görülmüştür. 1939 yılında İsviçre'li kimyacı Paul Mueller diklorodifenil trikloroetanın (DDT) pestisit özelliklerini belirledi ve 1942 yılında bu ürün piyasaya çıkarak hızla yaygın kullanıma girmiştir. 2.nci dünya savaşında bu ürünün botanik kökenli pestisitlerin temin edilmesi güçleşmiş ve ABD ile diğer ülkeler organik kimyasallara yönelmişlerdir. Pestisitlerle ilgili Rachel Carson'un 1962 yılında DDT ve klorlu hidrokarbonların çevredeki dayanıklılığını, insan ve hayvanların yağ dokularında birikimini, hedef olmayan/olmaması gereken türler üzerindeki toksik etkilerini, ekolojik ve insan sağlığı ile ilgili yıkıcı etkilerini dile getirmiştir [5].

## 2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubuna göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre ve kullanım tekniğine göre farklı şekillerde sınıflandırılırlar [6].

**Tablo 2.1.** Pestisitlerin önemli sınıfları [7].

Pestisit Tipleri	Hedef Zararlı Grubu
Akarisit	Kene, örümcek
Bakterisit	Bakteriler, virüsler, diğer mikroplar
Avenisit	Kuşlar
Fungisit	Funguslar
Herbisit	Yabani otlar
İnsektisit	Böcekler
Mollusitler	Salyangoz, sümüklü böcek
Nematisit	Nematodlar
Predasit	Omurgalı yırtıcı hayvanlar
Rodentisit	Kemiriciler

### 2.2.1. Formülasyon Şekillerine Göre Sınıflandırma

Pestisitler, tarım sektöründe farklı şekillerde kullanılmaktadır. Bunlara örnek aşağıdaki gibidir;

- ✓ Toz ilaçlar
- ✓ Islanabilir toz ilaçlar (WP)
- ✓ Emülsiyon konsantre ilaçlar (EC veya EM),
- ✓ Solüsyon konsantre ilaçlar (SC),

- ✓ Suda çözünebilir toz ilaçlar (SP)
- ✓ Yazlık ve kışlık yağlar
- ✓ Granüller (G)
- ✓ Peletler
- ✓ Tabletler
- ✓ Toz tohum ilaçları
- ✓ Sıvı tohum ilaçları
- ✓ Aerosoller
- ✓ Zehirli yemler
- ✓ Kapsül şekli verilmiş formülasyonlar
- ✓ Akıcı konsantreler (FC)
- ✓ Kuru akışkanlar

### **2.2.2. Kullanım Şekillerine Göre Sınıflandırma**

Pestisitler hedef organizmalara farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Bunlara örnek şöyledir;

- ✓ Gaz
- ✓ Toz
- ✓ Püskürtme

### **2.2.3. Kökenlerine Göre Sınıflandırma**

Pestisitler kökenlerine göre üçe ayrılırlar. Bu formlar aşağıdaki gibidir;

- ✓ İnorganik maddeler

- ✓ Doğal organik maddeler
  - Bitkisel maddeler
  - Petrol yağları, vb.
- ✓ Sentetik organik maddeler
  - Klorlu hidrokarbonlar
  - Organik fosforular

Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler).

#### **2.2.4. Kullanıldıkları Zararlı Grubuna Göre Sınıflandırma**

Kültür bitkilerine zarar veren hastalık etmenleri, zararlılar ve yabancı otlar gibi organizmaları öldüren pestisitler, kullanıldıkları zararlı grubuna göre sınıflandırılmaktadırlar. Zararlı grubuna göre pestisit türleri şunlardır;

- ✓ Böcekleri öldürenler (insektisit)
- ✓ Fungusları öldürenler (Fungusit)
- ✓ Fungusların faaliyetini durduranlar (Fungustatik)
- ✓ Yabancı otları öldürenler (Herbisit)
- ✓ Örümcekleri öldürenler ( Akarisit)
- ✓ Bakterileri öldürenler (Bakterisit)
- ✓ Yaprak bitlerini öldürenler (Afisit)
- ✓ Kemirgenleri öldürenler (Rodentisit)
- ✓ Nematodları öldürenler (Nematosit)
- ✓ Salyangozları öldürenler (Mollusisit)

- ✓ Algleri öldürenler (Algisit)
- ✓ Kuşları öldüren veya kaçıranlar (Auensit)
- ✓ Kaçırıcılar (Repellent)
- ✓ Çekiciler (Atrakant) [8].

#### **2.2.4.1. İnsektisitler**

Bu grupta yer alan organofosfor pestisitler (OPPs) genellikle kolinesteraz inhibitörü olarak da sınıflandırılırlar. Organofosfor pestisitler pamuk, tütün, şeker kamışı, bağcılıkta ve sebzeler gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır. Bağcılıktaki uygulaması son yıllarda son bulmuştur. Organofosfor pestisitler tüm hayvanlar ve insanlar için toksik özellik göstermektedir. Bu bakımdan çevre örneklerinden, toprak ve sularda OPPs içeriklerinin ölçülmeside önemlidir. Organofosfor pestisitler sinir gazına benzemektedir. Toksik etkisi inhalasyon sonucu sinir sisteminde asetilkolinesteraz (kolinesteraz) enziminin inhibisyonuna dayanmaktadır. Kolinesteraz sinaptik uçlarda asetilkolinip parçalar ve sinir uyarılarının iletimi açısından çok büyük önem taşımaktadır [1].

#### **2.2.4.2. Herbisitler**

Pestisitlerden olan herbisitlerin dünyadaki kullanımının %50'sini teşkil etmesi, herbisitler üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur. Topraktan herbisitler bitkiler (birincil üretici), otçul hayvanlar yoluyla daha üst seviyeye transfer edilir (birincil tüketici), daha sonra etçil hayvan (ikincil tüketici) ve üçüncül tüketiciler tarafından alınırlar. Çeşitli besin zincirlerinde herbisitlein transferi herbisitlerin tipine, ortam pH'sına, sıcaklık ve nem miktarına, toprağın organik madde içeriğine, büyümenin evresine ve hayvan türlerine bağlıdır [1].

#### **2.2.4.3. Fungusitler**

Fungusitler dünyada yaygın olarak kullanılan diğer bir pestisit grubudur. Özellikle şarap yapımında kullanılan bağ üzümünde ve şarapçılıkta çok kullanılırlar. Sentetik organik fungusitler diğer kimyasal sınıflardan şarabın korunumu için yaygın

kullanılır. Kimyasal fungusitler şarapçılıktaki problemlerle mücadelede kullanılmalarına rağmen, hedef funguslardan başka hedef olmayan diğer organizmaları da (doğal olarak oluşmuş faydalı ve patojenik organizmalar) etkileyebilirler. Fungusitler doğal kimyasal yapılarından dolayı toksik olabilirler ve biyolojik olarak parçalanamayabilirler. Kimyasal kalıntıları toprakta ortaya çıkabilir ve gıda zincirine girer. Bu nedenle sağlık ve potansiyel çevrelerde olabilecek problemler için fungusitlerin bilinçli kullanımı artış göstermektedir [1].

### **2.3. Pestisitlerin Özellikleri**

Pestisitlerin görevi haşereleri öldürmektir, ancak bu özellikleri sebebiyle diğer hayvanlara ve insanlara karşı da tehlike oluşturabilmektedirler. Birçok pestisit (özellikle insektisit, nematisit ve rodentisit gibi) yalnızca hedef haşerelerde yoğunlaşmakla kalmayıp diğer hayvanların hayatı için de tehlikeli olabilmektedirler. Pestisitlerin etkileri içerdikleri etken madde miktarındaki farklılıklara göre değişmektedir. Belli bir miktarda uygulanan pestisit hedef haşereyi öldürür ancak insanlar için tolerans limitleri içerisinde olabilir. Bununla birlikte, akut bir etki göstermeleri beklenmese de ciddi kronik problemlere sebep olabilmektedirler. Hatta insanlar haşereleri öldüren seviyeleri tolare edebilseler dahi bu maddeler hala ev hayvanları ve çiftlik hayvanları gibi hedef olmayan hayvanların sağlıkları açısından zararlı etkilere sahip olabilirler. Asıl tehlike ise pestisit uygulanan alanda kalmaması bunun yerine diğer organizmalara karşı etkili olabilecek kaynak haline geldiği su ortamı gibi diğer alanlara taşınmasıyla başlamaktadır. Alıcı ortamlar pestisitler sebebiyle kirlendiğinde temizlenmeleri oldukça zor ve pahalıdır [9].

Pestisitlerin ne içerdiğini ve insanlar için ne kadar tehlikeli olduğunun anlaşılabilmesi amacıyla birçok kavram tanımlanmıştır. Bu kavramlar bu bölümün geri kalan kısmında açıklanmıştır.

#### **2.3.1. Aktif Bileşen**

Aktif bileşen, pestisit gibi birçok kimyasaldan oluşabilen bir karışımda kastedilen amacı yerine getiren kimyasaldır. Pestisitlerde, aktif bileşen hedef haşerenin öldürülmesini sağlayan maddedir ve haserelere karşı toksik etki göstermesinin

yanında diğerk hayvanlara karşı da tehlike potansiyeline sahiptir. Pestisit içindeki diğerk maddeler genellikle inerttir (reaktif olmayan) ve uygulama sırasında aktif bileşenin taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Aktif bileşen genellikle pestisit içerisindeki tüm bileşenlerin çok küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır. Borik asit ve şekerli sudan yapılan ve birçok böceğin öldürülmesinde kullanılan basit bir böcek yemi bu kavrama örnek olarak verilebilir. Borik asitin (aktif bileşen) gerçek miktarı %1'den daha düşük olabilir. Diğerk % 99'luk kısmı ise hedef haşere için taşıyıcıdır. Şekerli su hedef zararlıyı öldürme fonksiyonuna sahip değildir fakat az miktarda etkili aktif bileşenin ulaşımını sağlamaktadır [10].

### **2.3.2. Toksikite**

Pestisitlerin toksisiteleri ile ilgili birçok tanım mevcuttur. Bu tanımlar belirli hayvanların pestisite belirli bir süre maruz kalmasından sonra hayvanda oluşan toksisite içindir. Bu tanımlar hedef haşerelere ya da insanlar ile hedef olmayan hayvanlara uygulanabilir [10].

**Akut toksisite**, bir toksinin (zehir) deney hayvanlarının %50'sini öldürmek için gerekli olan miktarı ile ölçülür. Genelde bu LD<sub>50</sub> (lethal dose 50-öldürücü doz-) ve LC<sub>50</sub> (lethal concentration 50- öldürücü yoğunluk) olarak ifade edilir. Bunlarla birlikte LD<sub>50</sub>-LC<sub>50</sub>değerleri tek bir doza dayanır ve test hayvanın vücut ağırlığının her bir kilosuna karşılık gelen pestisit miligramı olarak kaydedilir (mg/kg). LD<sub>50</sub>-LC<sub>50</sub> değerleri, farklı etken maddelerin ve aynı etken maddeyi içeren farklı formülasyonların toksisitesini karşılaştırmak açısından çok faydalıdır. Bir pestisitinin LD<sub>50</sub>-LC<sub>50</sub> değerleri ne kadar düşükse insanlar ve hayvanlar için toksisitesi ve tehlikesi o kadar yüksektir. Aynı miktarda kullanıldığında LD<sub>50</sub> değeri en yüksek olan pestisit en az tehlikeli olanıdır [11].

### **2.3.3. Formülasyon**

Pestisitler birçok fiziksel form ya da formülasyonda olabilirler. Suda dağılabilen tanecikler, tozlar, aerosoller, çözeltiler, katı yemler ya da sıvı yemler gibi formlarda olabilirler. Uygulamada sağladıkları avantajları bakımından bu formlarda satılmaktadırlar. Formülasyonlar bitki yüzeyindeki veya topraktaki tortulaşmayı

etkilerler. Bitki tarafından alınımını ya da toprağın üst yüzeyine doğru hareketi etkileyebilir veya kontrol altına alabilmektedirler. Ayrıca formülasyonlar yağmur sularına karışmış olan ya da sulama sularındaki pestisitlerin erozyon veya akış karakteristiklerini de kontrol etmektedir [9].

#### **2.3.4. Etkili Doz**

Etkili doz hedef haşerenin öldürülebilmesi için gerekli olan miktardır. Etkili dozdan daha az olan miktarlarda hedef zararlı çoğunlukla ölmemektedir. Bu durumda pestisit çevre açısından kazanç sağlamak yerine istenen sonuçlara ulaşamayacak ya da zararlıyı elimine edemeyecek şekilde uygulanmış olmaktadır. Etkili dozdan büyük miktarlar ise hedef zararlının ölümünü daha iyi gerçekleştirmiş olmamaktadır. Aksine bu yüksek dozaj, daha fazla hedef olmayan canlının ölmesine, uygulama için daha fazla para harcanmasına ve doğanın kirlenmesine sebep olmaktadır [10].

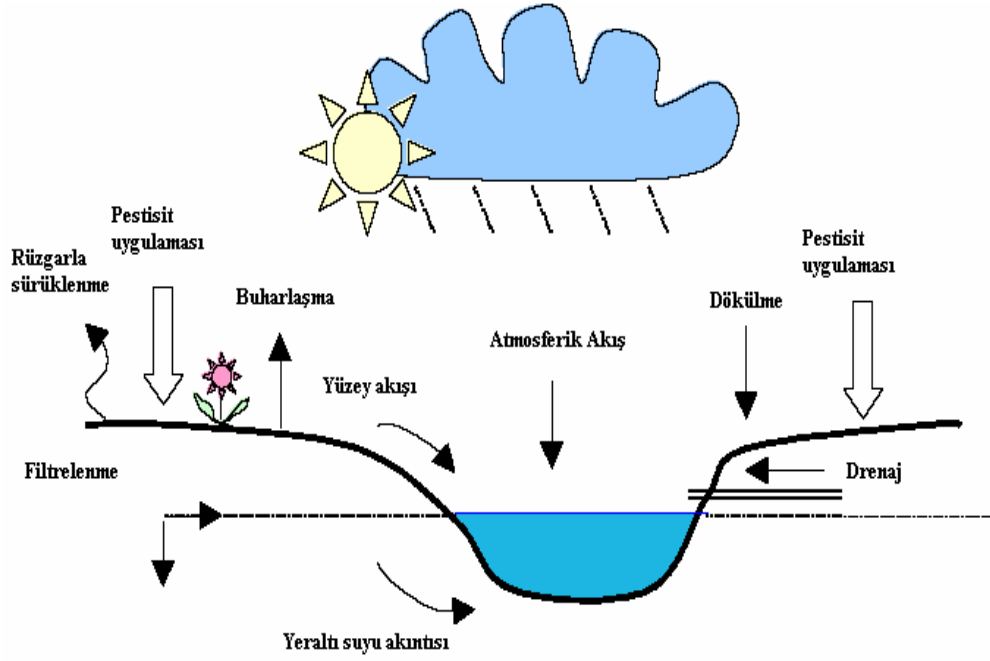
#### **2.3.5. Yarılanma Ömrü**

Yarılanma ömrü ( $T_{1/2}$ ) kimyasalın kalıcılığının bir ölçütüdür. Bir maddenin yarılanma ömrü o maddenin konsantrasyonunun yarısının bozunması için gerekli olan zamanı ifade etmektedir. Diğer bir deyişle, eğer bir pestisit 10 günlük yarılanma ömrüne sahipse, normal koşullarda uygulamadan 10 gün sonra pestisitinin yarısının bozunması gerekmektedir. Bu sürenin sonunda, pestisitler aynı anlamda aynı bozulma hızı sabiti ile parçalanmaya devam etmektedirler [9].

#### **2.4. Pestisit ve Çevre**

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı buharlaşma ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgarlarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bu türler üzerinde kalıntı ve toksisiteye neden olabilir [12].





**Şekil 2.1.** Pestisitlerin Farklı Taşınma Yolları [13].

Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da parçalanma ürünleri kalabilmektedir. Bunun sonucunda da hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır.

Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkileri saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO "Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi"ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir [8].

### **2.4.1. Gıdalarda Pestisit Kalıntısı**

Gelişmiş ülkelerde gıdalardaki pestisit kalıntıları önemli ölçüde akut hastalıklara neden olmaktadır. Pestisit kalıntı seviyeleri çok düşük ve bağıl olarak her zaman olmayabilir. Gıdalardaki pestisit kalıntılarının toksikolojik etkiye katkısı ve sinerjileri hakkında çok az bilgi bilinmektedir. Ancak, yediğimiz her gıdada çok düşük derişimde de olsa bir ya da daha çok pestisit bulunabilir.

Toksik kimyasal alımında, farklı kimyasallar (pestisitler gibi), diyetler ve ülkeler arasında karşılaştırma yapılabilmesi için miktarın belirlenmesi zorunludur. Gelişmiş birçok ülkedeki pestisit kalıntı değerleri, gıda analizlerinin gerekli olduğunu göstermektedir. Bu kalıntı değerleri toksisite kriterleri (kabul edilebilir günlük miktar-ADI) ya da ticari standartlar (maksimum kalıntı limitleri-MRL) ile kıyaslanır. Ülkemizde tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin bazı gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum miktarlar, ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir.

ADI toksisitenin bir ölçüsüyken, MRL değeri ise toksikolojik bir değişken değildir. MRL sadece ulusal ve uluslararası otoriterler tarafından (Codex Alimentarius gibi) dünyadaki gıda ticaretinin kontrolünün sağlıklı yapılabilmesi için oluşturulmuş standarttır [14].

**Tablo 2.2.** Türk Gıda Kodeksi'ne Göre Pestisitlerin Bazı Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Miktarları [1].

Ürünler	Bazı Pestisit Türleri ve Derişimleri (mg/kg)												
	Paration	Fention	Siromazin	Kloropirifos	DDT ve türevleri	Aldrin	Endosulfan	Klordan	Ometoat	Malation	Mono krotofos	Diazinon	Atrazin
Turunçgiller	-	-	-	-	0.05*	-	0.5	-	-	2.00	-	1.00	0.1*
Üzümsü ve Küçük meyveler	-	0.2	-	0.05*-0.5	0.05*	-	0.05*	-	-	0.5	-	0.02*	0.1*
Köklü ve yumrulu sebzeler	-	-	-	0.05*-0.2	0.05*	-	0.05*	0.02	0.1	0.5	-	0.2	0.1*
Yapraklı sebzeler ve taze otlar	-	-	0.5	0.05*	0.05*	-	0.05*	0.02	0.1-0.4(?)	0.5	-	0.02*	0.1*
Baklagiller	-	-	0.5	0.05*	0.05*	-	0.05*	0.02	-	3.00	-	0.02*	0.1*
Mantarlar	-	-	-	0.05*	0.05*	-	0.05*	-	-	0.5	-	0.02*	0.1*
Tahıllar	0.05*	0.1 (?)	-	0.05*-0.2	0.1	0.01	0.05*	0.02	-	8.00	-	0.05	-
Hayvansal ürünler (et ve yağ üzerinden)	0.05* (?)	0.05-2.0	-	0.01*-0.05*	0.04-1.0	0.006-0.2	0.004-0.1	0.002-0.05	-	-	-	0.01*-0.05*	-

\* Analitik tespit edilebilir daha düşük limit. (?) Belli ürünler için geçerlidir. Tüm ürün grubunu kapsamaz.

**Tablo 2.3.** Avrupa Direktiflerine Göre Pestisitlerin Bazı Gıdalarda Bulunmasına İzin Verilen Maksimum Miktarları [1].

Ürünler	Bazı Pestisit Türleri ve Derişimleri (mg/kg)												
	<i>Paration</i>	<i>Fention</i>	<i>Sikromazi n</i>	<i>Kloropirifos</i>	<i>DDT ve türevleri</i>	<i>Aldrin</i>	<i>Endosulfan</i>	<i>Klordan</i>	<i>Ometoat</i>	<i>Malation</i>	<i>Mono krotofos</i>	<i>Diazinon</i>	<i>Atrazin</i>
Turunçgiller Üzümsü ve Küçük meyveler	0.05* **	3.0 0.01*	0.05* **	0.2-0.2-2.0 0.05*	0.05* -	0.01* **	0.05 0.05*-0.5*	0.01* **	- -	- -	- **	0.01 0.01*	0.05* **
Köklü ve yumrulu sebzeler	0.05*	0.01*	0.05*-1.00	0.05*	0.05*	0.01*	0.05*	0.01*	-	-	0.2	0.01*	0.05*
Yapraklı sebzeler ve taze otlar	-	-	0.05*	0.05*	-	-	0.05*	-	-	-	-	0.01*	0.05*
Baklagiller	-	-	0.05-5.00	0.05*	-	-	0.05*	-	-	-	-	0.01*	0.05*
Mantarlar	-	-	0.05-5.00	0.05*	-	-	0.05*	-	-	-	-	0.01*	0.05*
Tahıllar	0.05*	0.01*	0.05*	0.05*-0.2	0.05*	0.01*	0.05*	-	-	8.00	-	0.02*	0.1 (1)
Hayvansal ürünler	0.05*	0.05*	0.05*	-	1.00	0.2	0.05*	0.05*	-	-	-	0.05*	-

\* Analitik belirlemenin en düşük limit değerler. \*\* Pestisit-şifre kombinasyonları MRL olarak verilmiştir. 1 şubat 2008'e kadar geçici MRL değeridir. Direktif ya da düzenlemelerle değiştirilebilir.

### **2.4.2. Toprakta Pestisit Kalıntısı**

Tarım topraklarının ve yer altı su kaynaklarının, kullanılan tarım ilaçları tarafından kirletilmesi önemli bir çevre sorununa neden olmaktadır. Tarım toprakları üzerinde biriken pestisitlerin (insektisit, herbisit, fungusit v.d.) artışı, bu çalışmaların önemini göstermektedir. Tarım toprakları içindeki organik bileşiklerin taşınımı ve kimyasal değişimleri oldukça kompleks mekanizmalarla olmaktadır. Bunlar adsorpsiyon, liçinç, buharlaşma veya uçma gibi fiziksel mekanizmaların yanısıra biyolojik ve kimyasal yıkım mekanizmaları olabilir. Bu prosesler bu maddelerin biyoyararlılığını etkilemektedir. Bu yüzden bu maddelerin topraktaki davranışmaları ve dönüşümleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [15].

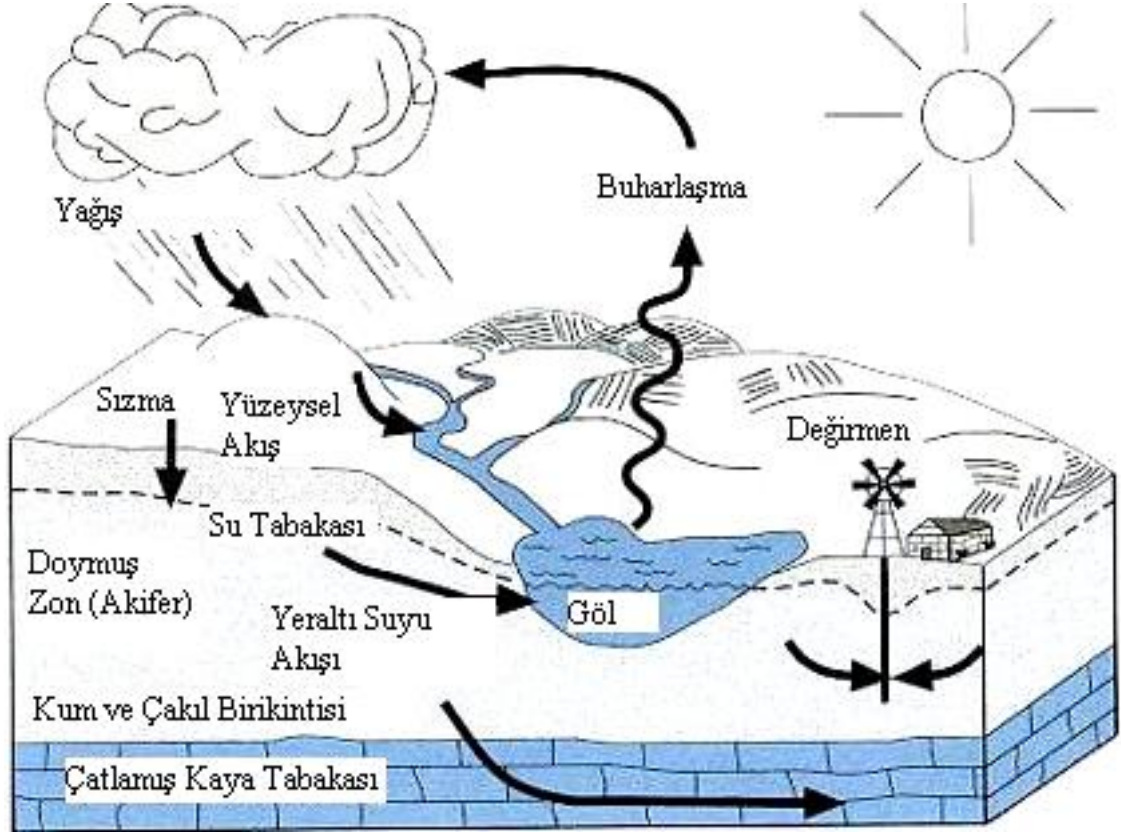
Pestisitlerin bağcılıkta kullanımı tüm ülkelerde oldukça yaygındır. Bu açıdan bağ topraklarında olabilecek pestisit hareketliliğinin belirlenmesi de önem kazanmaktadır. Bağcılıkta pestisitler doğrudan toprak yüzeyine, üzüm salkımlarına ve yapraklarına uygulanır. Bitki yüzeyine yapılan ilaçlamalarda pestisitlerin bir kısmı toprağa düşer. Bu bağlarda organik ve inorganik pestisitlerin uzun süre kullanımı topraklarda ve çevrenin diğer kısımlarında organik ve inorganik pestisitlerin kirlilik derişimlerinin artışına neden olur. Organik kirleticiler ve metallerle kirlenme toksikolojik tehditler, önemli çevresel sorunlar ile toprakların kalitesini de düşürmektedirler. Son on yıl içinde, Avrupa'daki bazı dik yamaçtaki bağlar çevre için kirleticilerin dispersiyon sonrasını ve yoğun bir şekilde toprak erozyonuna neden olduklarından terk edilmişlerdir [16].

### **2.4.3. Sularda Pestisit Kalıntısı**

Pestisitler sucul ortama girdiklerinde, dünya nüfusunun büyük bir kısmı için önemli içme suyu kaynaklarını oluşturan yer altı sularını ve yüzey sularının kalitesini sürekli olarak düşürürler. Pestisitler mahsullere püskürtüldüğünde, sularda en yüksek derişim seviyeleri, baharda karlar tamamen eridiğinde elde edilmiştir. Şekil 2.2'de sulu çevrede pestisitlerin dönüşümü ve ana taşınım geçiş yolları gösterilmiştir.

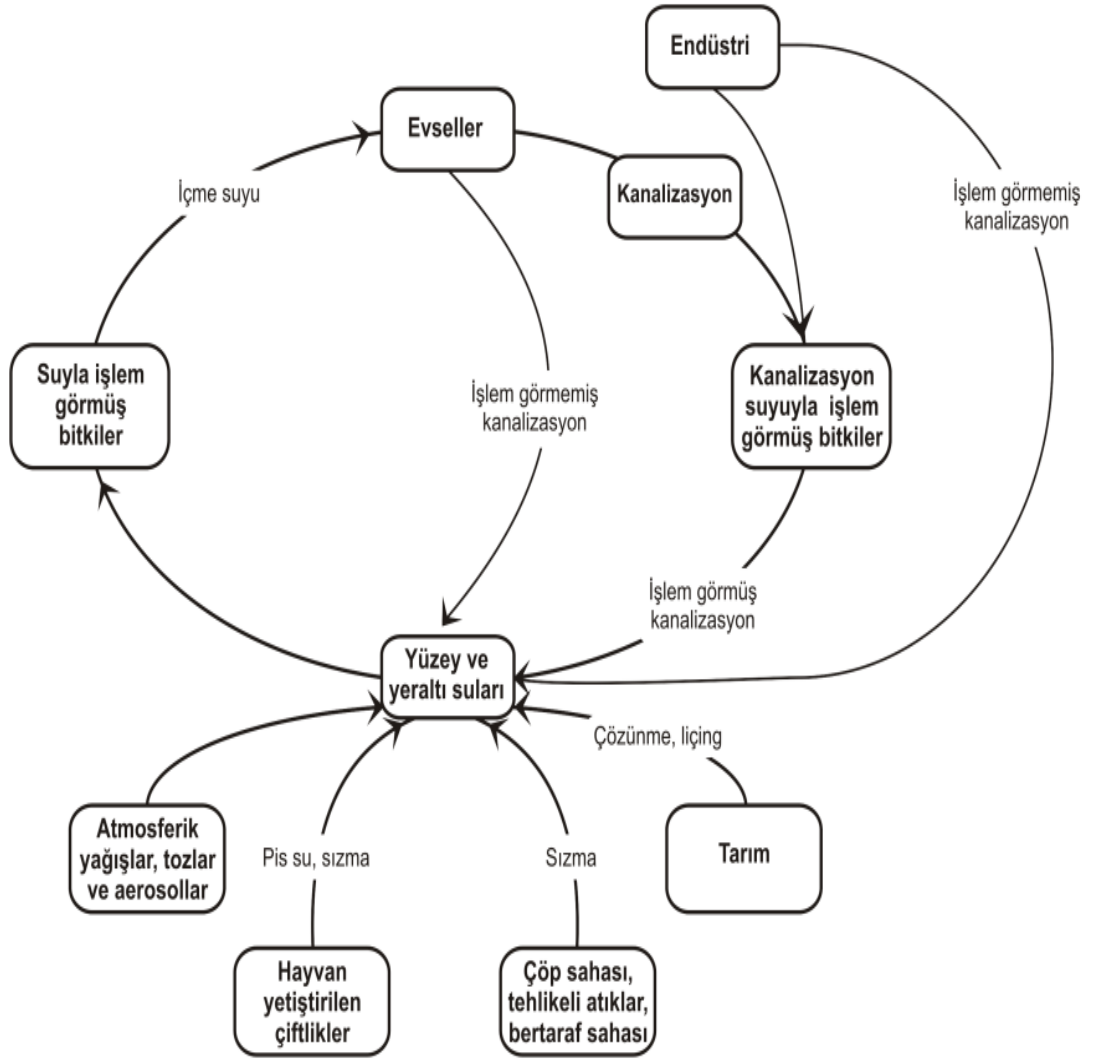
Pestisitlerin sucul ortama geçilerinin birçok kaynağı vardır. Pestisitler hem alan kaynakları (atmosferik yağışlar, çiftlik alanları gibi) hem de nokta kaynaklardan

(çeşitli merkezlerdeki pis sular ya da tehlikeli-atık-bertaraf edilmiş pis sular gibi) gelebilirler. Hatta hava yoluyla uzun mesafeler boyunca bile taşınabilirler [17].



Şekil 2.2. Hidrolojik Döngü [18].

Pestisitlerin sucul çevrede olduklarında çeşitli proseslere maruz kalırlar. Fiziksel (birikme, seyrelme, tortu ve difüzyon), kimyasal (hidroliz ve oksitlenme) ve biyokimyasal (biyolojik bozunma, biyolojik taşınma ve biyolojik birikme) olabilen bu prosesler, oldukça büyük toksisiteye sahip maddelerin artışına neden olurlar. Şayet pestisitler sucul organizmalarda birikirse geri döşdürülemez değişiklikler ile birçok tehlikeye yol açabilir [17].



**Şekil 2.3.** Sucul Çevrede Pestisitlerin Kaynakları ve Geleceği [17].

Son zamanlarda, insanlar herhangi diğer kimyasal bileşikler ve endüstriyel kirliliklerden çok daha sık pestisitlerle temas etmektedirler. Bu yüzden pestisitlerin özelliklerinin bilinmesi önemli olmakla birlikte, çevrede bu bileşiklerin nerelerde biriktiği özellikle doğal sular bakımından öne çıkmaktadır [17].

#### 2.4.4. Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri ve Literatür

##### Örnekleri

Pestisitler kullanıldığı zaman etkisini bir süre sonra yitirir ve tekrar ilaçlama yapılır. Bu işlem bir iki defa tekrarlanınca ürün üzerinde bir kısım kalıntı kalır. Bu insan ve çevre sağlığı bakımından problem oluşturmaktadır.

Pestisitler vücutta birikim yaparak toksisite göstermektedirler. Vücuda alındıklarında enzimler etkisiyle bozularak bir kısmı vücuttan atılmaktadır [19].

Pestisitler insan vücudunda 3 *değişik yolla* zehirli olmaktadır.

Bu zehirlenme *ağız yoluyla* (oral) olabilmektedir. Ağız ve sindirim kanalı ile olmaktadır. Bu tip zehirlenme kaza ile ortaya çıkmaktadır. Tıkanmış pülverizatörün memelerin üflenmesi, ilaçlama yapılırken sigara içilmesi vb. nedenlerle meydana gelmektedir [20, 21].

Zehirlenme *deri yoluyla* (dermal) da olabilmektedir. Derinin bulaşması kolay olmakta ancak çoğu kez belirti meydana gelinceye kadar fark edilememektedir. Deri yoluyla alım, hava sıcaklığının fazla ve derinin terleme nedeniyle ıslak olduğu koşullarda çok tehlikelidir. Bunun yanında kaşıntı, yara, kesik veya egzama gibi durumlar ilacın deriden alımını artırır [22].

*Solunum yoluyla* (inhalasyon) da olabilmektedir. Solunum yoluyla pestisit alımı, püskürtülen sıvı ya da toz ilaçların uygulanışı sırasında önemlidir. İlaçların hazırlanışı, karıştırılışı sırasında da bu durum önemli olup ilaçların hazırlanma işleminin kapalı yerlerde yapılmasından kaçınmak gerekir [23].

Teratojen (ana karnında bebekte deformasyon), mutajen (genetik bozukluklar) ve allerjen etki gösteren pestisitler de vardır. Koruyucu elbise ve maske giymeden bazı organik fosforlu bileşiklerin kullanılması ani ölümlere neden olabilmektedir.

Pestisitlerle ilgili zehirlenmeler genellikle pestisit üretim tesislerinde, ilaç hazırlama ve ilaçlama sırasında ve ilaçlı besinlerin yenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. İlaçlı gıdaların yenmesi ile ortaya çıkanlar en yaygın olanlardır. Pestisitlere uzun süre maruz kalındığında, sinir, solunum, kalp damar, mide, bağırsak ve dolaşım sistemlerinde, karaciğer, böbrek gibi iç organlarda deri ve gözlerde çeşitli hasarlar meydana gelmektedir.

Pestisitlerin kullanımının getirdiği çevresel sorunları ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini yapılan çalışmalar ile belirtmekle konunun önemini kavramak açısından oldukça önemlidir.



Literatür araştırmaları sonucunda Türkiye’de gıdalarda pestisit kalıntıları üzerindeki saptanan ilk eser Öden ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [24].

Bitkilerin doğrudan veya toprakta kalan pestisiti kendi bünyesine alması ve bunların insan gıdası veya hayvan yemi olarak kullanılması sonucunda bu kimyasal maddeler besin zincirine girmektedirler [25].

MRL tarımsal ürünlerde, hayvansal yemlerde ve insan kanında bulunması kabul edilmiş, iyi bir tarımsal uygulama sonucu kalan pestisit kalıntısının maksimum konsantrasyonudur. Konsantrasyon da ppm (mg/kg) olarak gösterilir. Günlük alınabilecek miktar (ADI) ise insan sağlığına zarar vermeden her kg vücut ağırlığı için bir günde en fazla alınabilecek pestisit miktarıdır [26].

Türkiye’de Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü’nce (KKGM) 2004 yılında denetim ve izleme çalışmalarını başlatılmıştır. 2004 yılında 1500, 2005 yılında da 2000 örnek denetim ve izleme programını kapsamında çalışılmıştır. Ancak ülkemiz tarımsal üretim miktarları göz önünde bulundurulduğunda, bu rakamların oldukça küçük kaldığı düşünülmektedir [27].

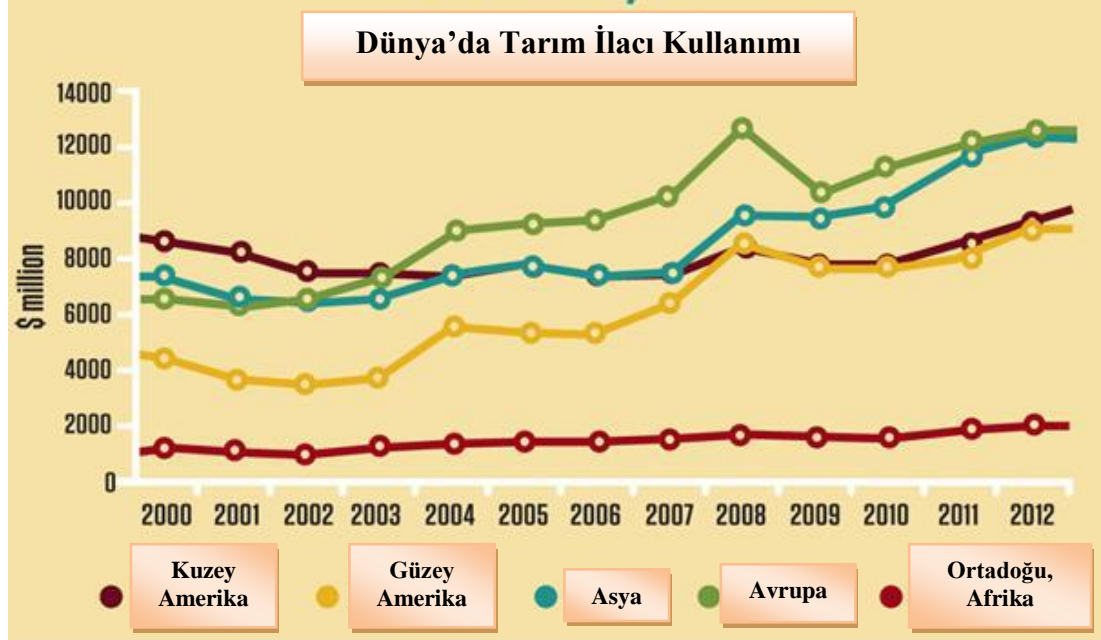
Pestisitler uygun bir şekilde kullanıldığında ve yeterli kontrol sağlandığında, tüketici sağlığı açısından önemsiz hale gelirler [28].

## **2.5. Türkiye’de ve Dünya’da Pestisit Kullanımı**

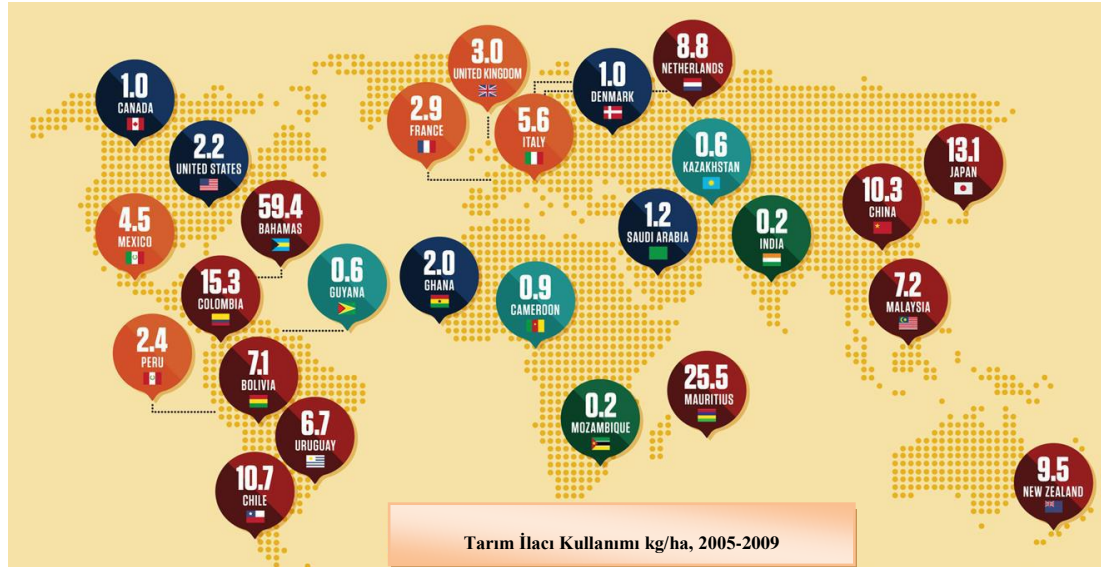
Dünya toplam pestisit üretimi yıllık 3 milyon ton civarındadır. Pestisit pazarının değeri ise yaklaşık 30 milyon Euroluk bir pazardır [29].

Herbisitler ve insektisitler en yaygın kullanılan formülasyonlardır. Kullanılan pestisitlerin % 60’dan fazlası sebzeler, hububat ekme alanlarında kullanılmaktadır. Dünyada kullanılan pestisitlerin % 55’i Kuzey Amerika ve Batı Avrupa’da kullanılmaktadır. Doğu Avrupa’da dikkate değer bir artış gözlenmektedir (CPA 2000a). Batı Avrupa’da 80 milyon hektarda tarımsal üretim yapılmaktadır. Bu alanın 550’den fazlasında hububat üretimi yapılmaktadır ve tüm alanlarda herbisit kullanılırken, % 60 – 80’inde fungusit, % 15- 98’de ise insektisit kullanılmaktadır. İngiltere’de hububat ekilen alanlarda hektar başına 3.8 kg pestisit ve 10 farklı aktif

madde kullanılmaktadır. Batı Avrupa’da hektara düşen pestisit miktarı en yüksek olan ülkeler Hollanda ve Yunanistan’dır. Yıllık pestisit kullanımı iklim koşullarına bağlı olarak sürekli değişmektedir [7].



Şekil 2.4. Dünya’da Tarım İlacı Kullanımı [30].



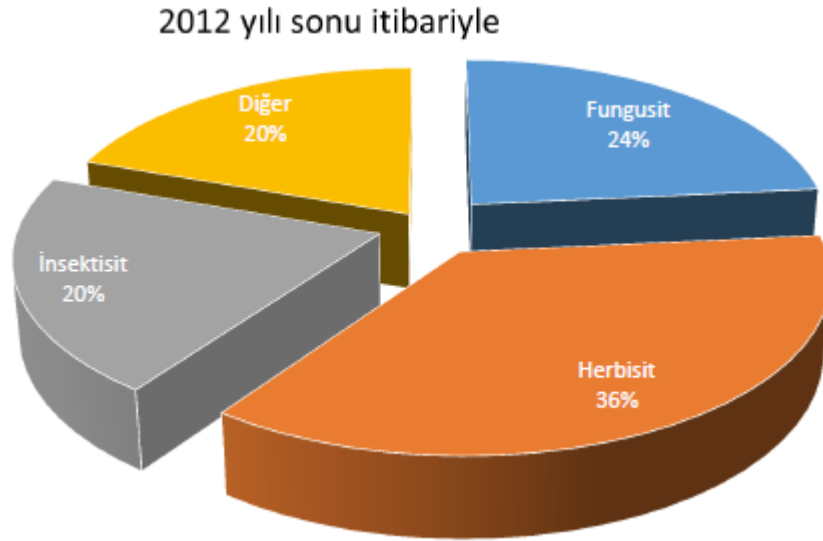
Şekil 2.5. Tarım İlacı Kullanımı kg/ha [30].

Türkiye’de pestisit sanayisinin kurulması 1951 yılında başlamıştır. 1957 yılında yayımlanan 6968 sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu ile 1958 yılında

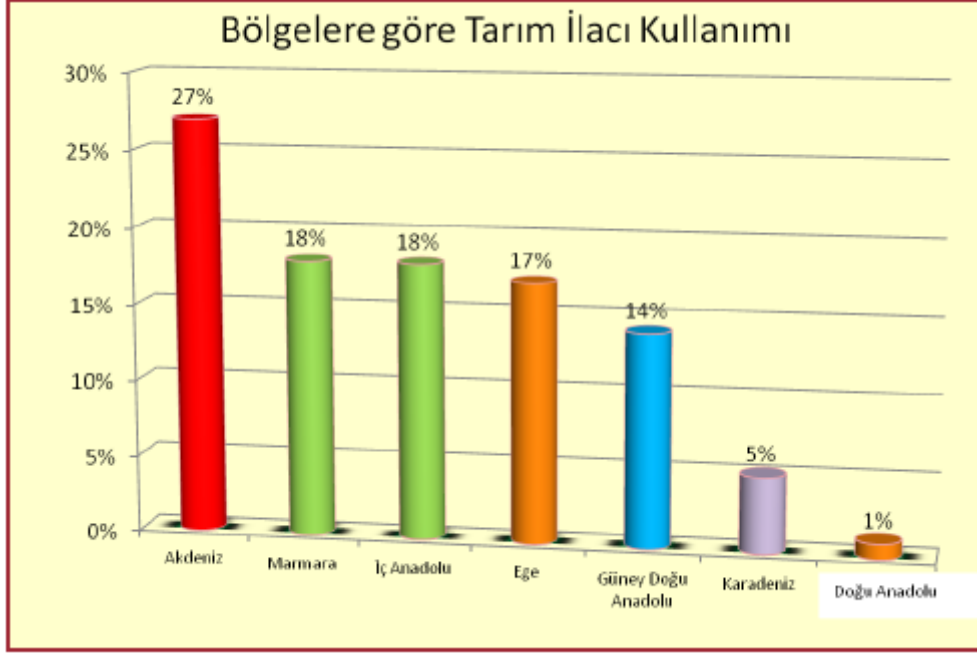
uygulamaya konulan tüzüklerle ülkemizde kullanılacak yerli ve ithal ilac kalitelerine Uluslararası standartta olma zorunluluğu getirilmiştir.

Farklı agroekolojik bölgelere ve buna bağlı olarak çok zengin bir bitki çeşidine sahip olan ülkemizde 60'ın üzerinde kültür bitkisi yetiştirilmektedir. Bu kültür bitkilerinde ekonomik önemde zarar yapan 451'in üzerinde hastalık, zararlı ve yabancı ot türü bulunmaktadır.

Ülkemizde hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı daha çok kimyasal mücadele uygulanmakta ve yılda ortalama 30-35 bin ton tarım ilacı kullanılmaktadır. Türkiye'de Tarım ve Köy işleri Bakanlığı'na ruhsat verilmiş ilac sayısı 2008 yılı itibariyle 4654 adet olmakla birlikte bu sayının yaklaşık %70'i piyasada bulunmaktadır. Ruhsatlı aktif madde sayısı ise yaklaşık 417'dir. Türkiye'deki ruhsatlı ilacların %47'si insektisit, %24'u herbisit ve %16'sı fungusittir [4].



**Şekil 2.6.** 2012 Yılı Sonu İtibariyle Türkiye Pestisit Kullanım Oranları [30].

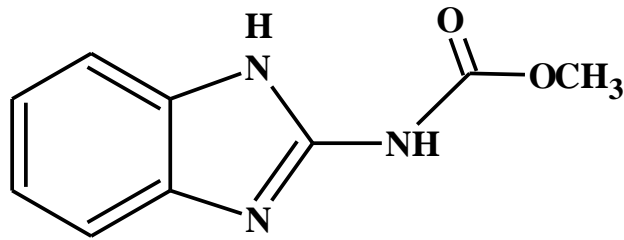


**Şekil 2.7.** Türkiye’de Bölgelere Göre Tarım İlacı Kullanım Oranları [30].

## 2.6. Karbendazim Ve Klorpirifos’un Temel Özellikleri

### 2.6.1. Karbendazim

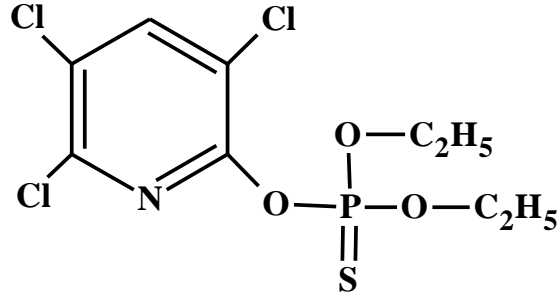
Karbendazim (Metil-2-benzimidazolkarbammat) yaklaşık 50 ülkede 70 ürün üzerinde hasat öncesi sera ve süs bitkilerinde meydana gelen botritis sinera gibi patojenik fungal enfeksiyonların tedavisinde geniş kullanıma sahip benzimidazol grubuna ait kristalize katı sistemik fungusitdir. Molekül ağırlığı 191.2 g/moldur. Karbendazim pH 7 ve 20 °C’de 8 mg/litre gibi çok düşük suda çözünürlük özelliklerine sahiptir. USA ve Hollanda’da yapılan maruziyet analizlerinde ortalama günlük alımın karbendazim için 0.01 mg/kg olan günlük kabul edilebilir. Karbendazim suda 2-25 ayda ve toprakta 6-12 ayda genellikle mikroorganizmalar tarafından parçalanır [31].



**Şekil 2.8.** Karbendazimin Kimyasal Yapısı

### 2.6.2. Klorpirifos

Klorpirifos (CPF) (IUPAC adı: O,O-dietil O-3,5,6-trikloropiridin-2-il fosforotioat) sinir sistemi üzerinde önemli bir görevi olan Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden, kristal yapılı bir pestisitdir. CPF organofosfor pestisitleri arasında tarımda, ev zararlılarının bertarafında en çok kullanılan geniş spektrumlu bir organofosfor pestisitidir. Bu maddenin aşırı kullanımı sonucunda toprakta, suda ve gıdalarda birikmeye sebep olmaktadır. CPF'ye toksik ve kronik olarak maruz kalınması sonucunda, sinirsel aktivite üzerinde, hastalıkların ve otoimmün hastalıkların gözlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden, CPF ve diğer pestisit türlerinin analizi çevre, gıda, insan sağlığı ve hayvancılık açısından oldukça önemlidir. Bu bağlamda CPF tayini için kromatografik, spektrofotometrik, kemilüminesans, Enzim/Antibadi İmmunoassay (ELISA) ve elektrokimyasal metotlar geliştirilmiştir.



Şekil 2.9. Klorpirifosun Kimyasal Yapısı [32].

### **3. KROMATOGRFİK YÖNTEMLER VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRFİ (HPLC)**

Kromatografi, bir karışımdaki kimyasal bileşenlerin bir sabit faz ve bir hareketli faz yardımıyla ayrılması, tanınması ve tayini ile kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır ve analitik bir metottur.

Karışımda bulunan maddelerin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanmaktadır. Hareketli faz gaz veya sıvı; sabit faz da sıvı veya katı olabilmektedir [33].

1930'lu yıllardan itibaren kromatografi teknikleri gelişmeye başlamıştır. İnce Tabaka Kromatografisinin temelleri 1938'de İzmailov ve Schraiber tarafından atılmıştır. Stahl da 1958'de bu yöntemi geliştirmiştir. 1941'de Martin ve Synge'nin çalışması sıvı kromatografisinde köklü değişiklikler yapmıştır [34].

Sıvı kromatografisi, başlarda geniş çaplı cam kolonlarda ve ortam şartlarında yapılmıştır. Analiz süreleri uzun ve prosedürleri ise yorucudur. 1960'lı yılların sonlarından itibaren sıvı kromatografisi geliştirilerek gaz kromatografisini tamamlayıcı bir teknik halini almıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'de bu ilerlemelerin bir sonucu olarak geliştirilmiştir [34,35].

#### **3.1. Kromatografi Çeşitleri**

Kromatografi hareketli faz tiplerine göre gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisi şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Sıvı kromatografisi de kendi içerisinde adsorbsiyon kromatografisi, dağılma kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, dışlama (jel filtrasyon) kromatografisi olarak 4 gruba ayrılmaktadır [34,36]. Gaz kromatografisinde kendi içerisinde gaz-katı kromatografisi ve gaz-sıvı kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.

##### **3.1.1. Sıvı Kromatografi Çeşitleri**

###### **3.1.1.1. Adsorbsiyon (Katı-Sıvı) Kromatografisi**

Katı-sıvı kromatografisi, çözünen maddelerin silika jel ve alümina gibi polar adsorbanlara tutunması esasına dayanan bir tekniktir. İnce Tabaka Kromatografisi de

katı-sıvı kromatografisinin bir türüdür. Bu teknik organik çözücülerde çözünen ve iyonize olmayan bileşenler için uygundur [34].

### 3.1.1.2. Dağılma (Sıvı-Sıvı) Kromatografisi

Dağılma kromatografisi, çözünen maddelerin birbirine karışmayan iki çözücü arasındaki dağılımı esasına dayanan bir tekniktir. Bu çözücülerden biri sabit diğeri ise mobil fazdır.

Dağılma kromatografisi eğer sabit faz mobil fazdan daha polar ise *normal faz* olarak adlandırılır. Eğer mobil faz sabit fazdan daha polar ise de *ters faz* olarak adlandırılmaktadır [36].

Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözünmüş maddenin ayırımı sıvı kromatografik teknikler içinde ters faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C<sub>8</sub> ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla -CN, -NO<sub>2</sub> veya -NH<sub>2</sub> gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal fazlar elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk etmektedir [37].

Sabit fazın kimyasal olarak etkisiz bir desteğe bağlanmasıyla daha sağlam kolonlar elde edilmiştir. Bu tür kolonlar ise, partiyon kromatografisinin bağlı faz kromatografisi denilen türü ortaya çıkmıştır [34].

### **3.1.1.3. İyon Değiştirme Kromatografisi**

İyon değiştirme kromatografisi, dolgu maddesinin iyonik kısımlarıyla mobil faz arasında meydana gelen iyon değişimleri esasına dayanan bir tekniktir. İyon değiştirici maddeler olarak stirendivinilbenzen kopolimerlerine fonksiyonel grupların eklenmesiyle elde edilen reçineler kullanılmaktadır. Sulfonik asit ya da kuarterner amin türü reçineler uygulamalarda çoğunlukla tercih edilmektedir [34,38].

Bu kromatografi türü sağlık bilimlerinde aminoasitlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. İyon değiştirme kromatografisi hem katyonlara hem de anyonlara uygulanabilmektedir [35].

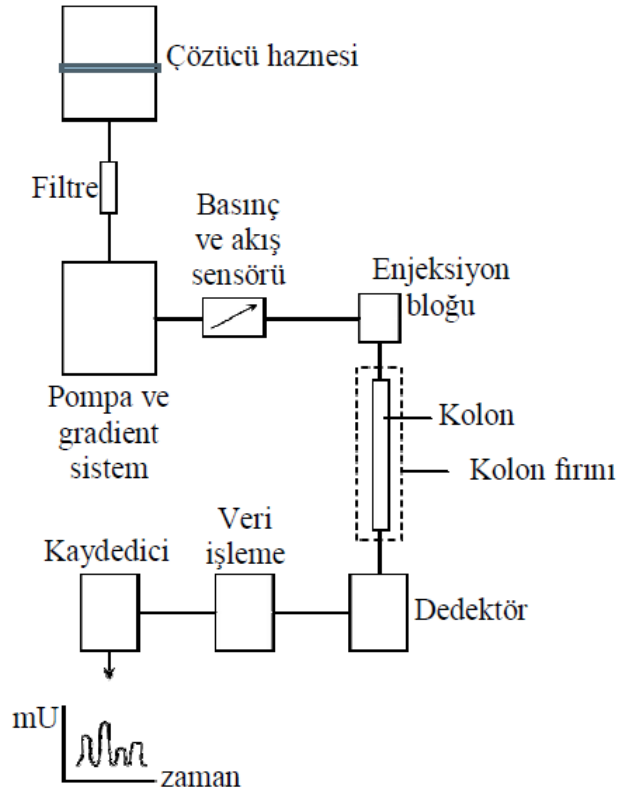
### **3.1.1.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Jel filtrasyonkromatografisi, karışımın içerisindeki bileşenlerin moleköl büyüklüklerine göre ayrılmasına özğü bir tekniktir. Jel filtrasyon kromatografisinin biręok adı vardır. Bunların en yaygın olanları *jel geğirim kromatografisi* ve *dışlama kromatografisidir*. Bu teknikte kullanılan dolgu maddesi, gözenekli inert bir yüzeye sahip bir jeldir. Küçük moleküller bu gözenekli aę yapısına girmekte ve durgun haldeki mobil fazda tutulmaktadırlar. Büyük moleküller ise gözenekli yapıya giremeyip kolonu tutulmadan terk etmektedirler [34-36].

### **3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı kromatografi tekniğinin özel bir uygulamasıdır ve HPLC olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemde sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültölmesi sonucu, hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyümektedir. Böylece kolonun etkinliği arttırılmış olmaktadır. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geğebilmesi için basınę uygulanması gerekmektedir [33,34].





**Şekil 3.1.** HPLC Cihazının Diyagramı [38].

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- ✓ HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- ✓ Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- ✓ Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.
- ✓ Analiz süresi oldukça kısadır.
- ✓ Duyarlık çok yüksektir. 10 µg'lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama detektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemi 6 ana kısımdan oluşmaktadır. Bunlar mobil faz, degazör, pompa, örnekleyici (autosampler), kolon ve detektördür. Ayrıca dataların işlendiği bir bilgisayar sistemi de mevcuttur.

### 3.2.1. Mobil Faz

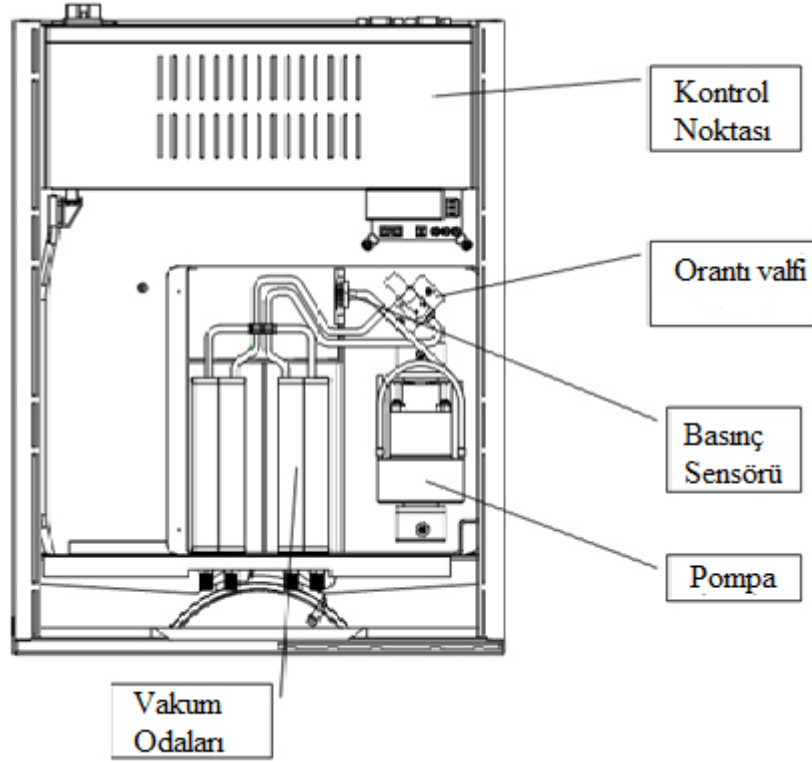
Numunelerin kolon içinde hareket etmesini sağlayan çözücü ya da çözücü karışımlarıdır. Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe *gradient elüsyon* adı verilir. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.



Şekil 3.2. Mobil Faz

### 3.2.2. Degazör

Mobil faz haznelerinde bulunabilecek tozları, kolon ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için kullanılan cihazlar vardır. Bu çözülmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, detektörle girişim yaparak performansında azalmaya sebep olurlar. Bu etkileri yok etmek için kullanılan bir cihazdır. Kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır. Şekil 3.3'de şematik olarak bir degazör gösterilmektedir.



Şekil 3.3. HPLC Degazörünün Diyagramı

### 3.2.3. Pompa

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

- 400 atm'ye kadar basınç üretimi
- 0,1-10 mL.dk<sup>-1</sup> aralığında akış hızları
- % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikte akış kontrolü
- Korozyona dayanıklı parçalar.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmaz. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ama sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

**Pistonlu Pompalar:** HPLC sistemlerinin % 90'ında pistonlu pompalar kullanılmıştır. Pistonlu pompalar genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketleriyle

çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.

Pistonlu pompaların üstünlükleri;

- ✓ Küçük iç hacimleri (35-400 µL)
- ✓ Yüksek çıkış basıncı (700 atm'ye kadar)
- ✓ Gradient elüsyona uygun oluşları
- ✓ Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

**Sürgülü Pompalar:** Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kontrol edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşur. Sürgülü pompalarda çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları ise sınırlı çözücü kapasitesi (~ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

**Pinömatik Pompalar:** En basit pnömatik pompalarda sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş bir kap içine konur. Pnömatik pompalarda çıkış basıncı düşüktür ve akış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca pnömatik pompalar, gradient elüsyona uygun değildir. Ve basınçları genellikle 135 atm'den daha düşüktür [39].

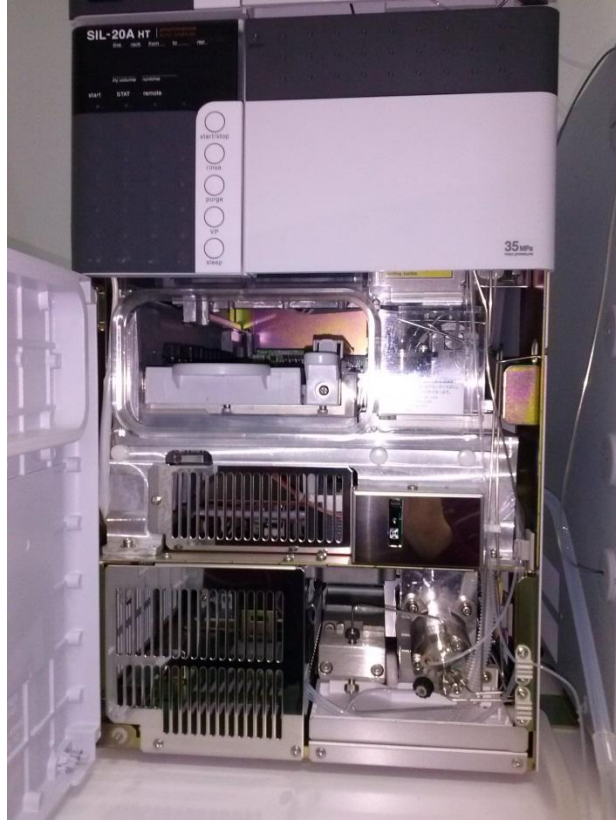
Şekil 3.4'de bir HPLC pompası gösterilmektedir.



**Şekil 3.4.** HPLC'si Pompası

### **3.2.4. Örnekleyici (Autosampler)**

Örnekleyici; analitlerin (numunelerin) kolon ve dedektöre gönderilmesini sağlar. Örnekleyici temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Oto örnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Oto örnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Oto örnekleyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sistem çabuk kirlenir veya tıkanır. Numuneleri cihaza göndermeden önce muhakkak şırınga filtresinden veya kartuştan geçirmek gerekir, numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olmasını tercih edilmelidir. Şekil 3.5'de bir örnekleyici görülmektedir.



**Şekil 3.5.** HPLC'si Örnekleyicisi

### **3.2.5. Kolon**

Sıvı kromatografi kolonları bir HPLC cihazının en önemli parçasıdır ve genellikle paslanmaz çelikten imal edilir. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 2-10  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur.

Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerin parçacık boyutları 2-5  $\mu\text{m}$  ve tabaka sayısı 10000 tabaka. $\text{m}^{-1}$ 'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikrokolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapabilmektedir. Sıvı kromatografisinde kullanılan çözücülerin saflıkları yüksek olmasından dolayı pahalıdır. Çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için mikro kolon kullanımı çok önemli bir üstünlük sağlamaktadır. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden yapılıdır. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan, parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla reaksiyonları sonucu elde edilir.

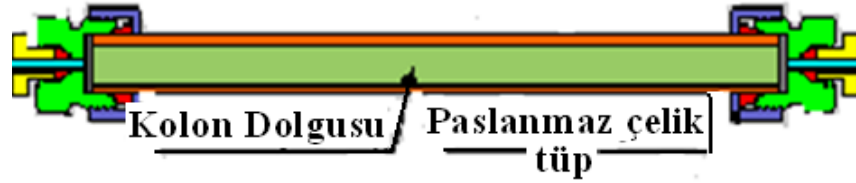
En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve süstitüe alkil silikalar bu yolla elde edilir. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reçineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Anyonları ve kationları tutan iyon reçinelerin dolgu maddesi olarak kullanılması halinde, numunede iyon halinde bulunan türler birbirinden ayrılır.

İyonların bu reçinelere olan ilgilerine etki eden faktörler;

- ✓ İyonun yükü,
- ✓ İyonun büyüklüğü,
- ✓ pH,
- ✓ İyon şiddeti,
- ✓ Kullanılan reçinelerin gözenek büyüklüğü,
- ✓ Çözücü cinsi,
- ✓ Çözücü derişimi,
- ✓ Çalışma sıcaklığıdır.

Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yzeyine kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. Katyon değiştirici reçinelerin ortak zelliği, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grupları ile zayıf bir asit olan karboksilikasit gruplarını iğermeleridir. Anyon değiştirici reçineler ise, kuvvetli baz olan kuarterner amin grupları ile zayıf baz olan primer amin grupları iğerirler.

Sıvı kromatografisinde kolon verimliliği, bir bileşiğin kolondan geğişi sırasında meydana gelen bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çzzenen bileşenlerin kolondan aşağıya gçleri sırasında yer alan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler kontrol edilebilir ve ayırmalar için kullanılabilir [37].



Şekil 3.6. Standart Kolon Donanımı [40].

Kolon Verimliliğine Etkiyen Değişkenler;

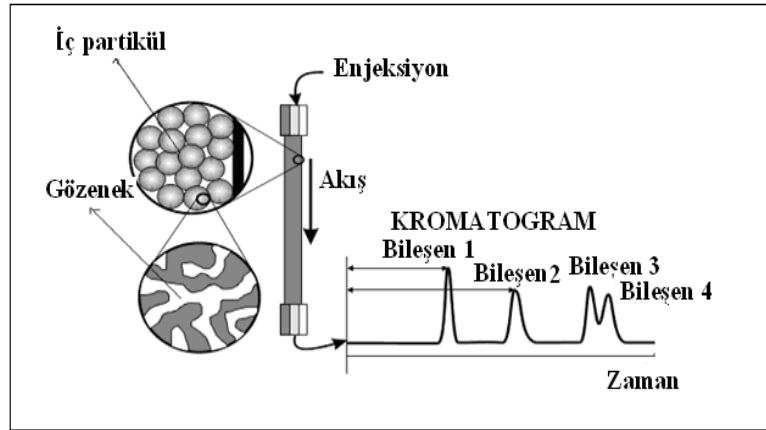
- ✓ Hareketli fazın doğrusal hızı,
- ✓ Hareketli fazda difüzyon katsayısı,
- ✓ Durgun fazda difüzyon katsayısı,
- ✓ Kapasite faktörü,
- ✓ Dolgu parçacık çapı,
- ✓ Durgun fazda sıvı kaplamanın kalınlığıdır [37].

Şekil 3.8'de kolon ve kolon fırını gösterilmektedir.





Şekil 3.7. HPLC Kolon Fırını ve HPLC Kolonu



Şekil 3.8. Kolonda Analit Bileşenlerinin Ayrılması ve Kromatogram [40].

### 3.2.6. Dedektör

Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da vardır.

Dedektörde bulunması gereken önemli özellikler şunlardır;

- ✓ Yüksek duyarlılık,

- ✓ İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- ✓ Geniş ve doğrusal bir çalışma aralığı,
- ✓ Akış hızından bağımsız bir cevap verme süresi,
- ✓ Bütün bileşenler için benzer cevaplar vermeli,
- ✓ Numuneyi bozmamalı,
- ✓ Ucuz ve kullanım kolaylığı olmalıdır.

Dedektörler iki grup altında toplanırlar. Bunlar *maddeye yönelik dedektörler* ve *çözeltiye yönelik dedektörler*dir.

***Maddeye Yönelik Dedektörler:*** Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared),
2. Elektrokimyasal dedektörler,
3. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri,
4. Radyoaktivite dedektörleri,
5. Kütle spektrometreleri.

***Çözeltiye Yönelik Dedektörler:*** Örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. İletkenlik dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleridir [32].

**Tablo 3.1.** Yaygın HPLC Dedektörleri ve Özellikleri [38].

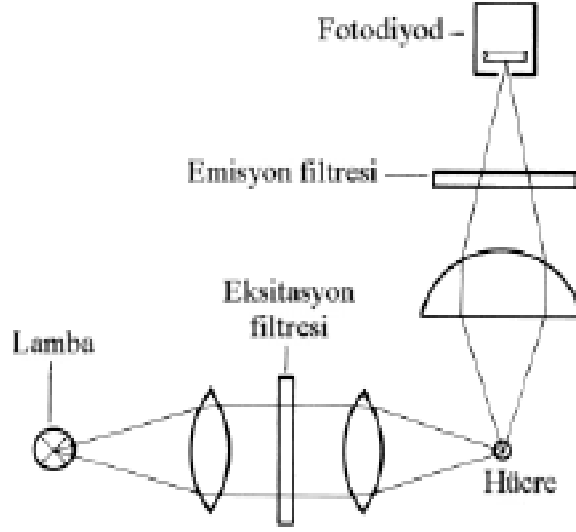
Dedektör	Analit/Özellikler	Duyarlılık
UV/GB absorbans	Spesifik: UV kromofor gruplu bileşikler	Ng
Diyot dizisi	Diyot dizisi Spesifik: UV/GB dedektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar	Ng
Floresans	Spesifik: Doğal floresans maddeler veya floresan etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indisi	Genel: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler, ekspiyanlar.	0.1-10 µg
Evaporatif ışık-saçma	Genel: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradiente uyumludur	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Spesifik: Elektro-aktif bileşikler	Pg
İletkenlik	Spesifik: Anyonlar ve katyonlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radyoaktivite	Spesifik: Radyoaktif-etiketlenmiş bileşikler	Düşük Düzeyler
Kütle spektrometre	Hem genel hem spesifik: Kesin tespit	fg-pg-ng

Bu çalışmada sadece FD dedektörü kullanıldığı için sadece FD dedektörü anlatılmaktadır.

#### ➤ **FD DEDEKTÖRÜ**

Fluoresans yeteneğine sahip veya türevleriyle floresans yapabilen bileşikler bu dedektörlerle çok rahat tespit edilebilir (Şekil 3.10). Bu yüksek seçicilik bazen UV dedektörlere oranla 1000 kat fazla olabilir.

Uygun dalga boyundaki ışın hücreden geçer ve daha yüksek dalga boylu ışığa doğru konuma yerleştirilmiş dedektörce tespit edilir. Işık yoğunluğu ve seçicilik hassasiyeti daha büyük bir hücre kullanılarak artırılabilir [41].



**Şekil 3.9.** Floresans Dedektör [41].

Gelişmiş sistemlerde eksitasyon dalga boyu ayarlanabilmekte ve böylece spesifitesi artırılmaktadır. Ancak bu durum hassasiyeti düşürmektedir. Sistemde floresans bozunmaya yol açan bileşikler veya oksijenin bulunmamasına dikkat edilmelidir [37].

### 3.2.7. Kaydedici

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır [33].

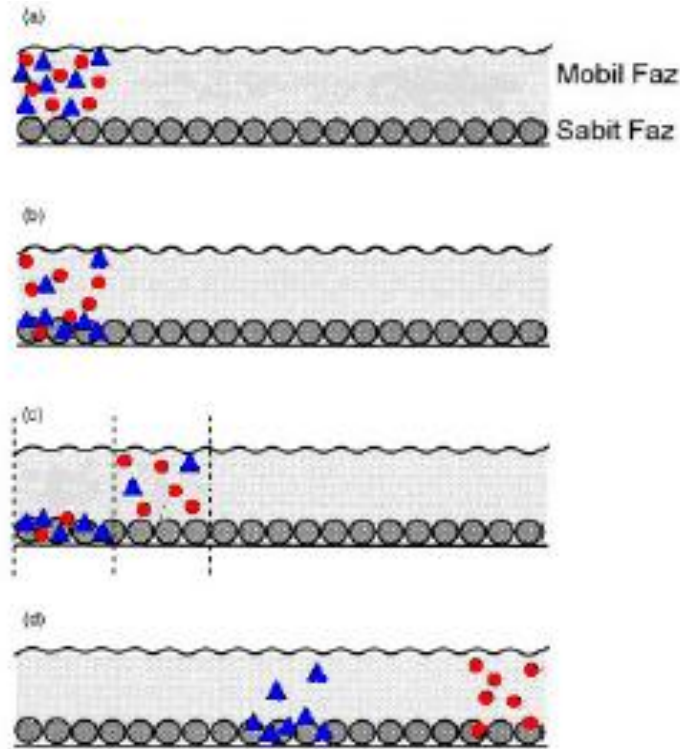
### 3.3. Kromatografik Ayırma İşleminin Grafikselleştirilmesi

a- ● ve ▲ gibi iki bileşik karışımı kromatografik sisteme verilir (a).

b- ▲ bileşiği sabit fazda kalma eğiliminde olmasına rağmen ● bileşiği daha çok hareketli fazı tercih eder ( b ).

c- Karışım ilavesi devam ederken yeni bir denge oluşmaya başlayacaktır. Mobil faz içindeki örnek molekülleri dağılma katsayılarına göre sabit fazdaki açık uçlara bağlanma eğilimi göstereceklerdir. Yeni moleküllerin dağılma katsayıları yüksek olduğu için sabit faza tutunmuş olan moleküllerin tekrar mobil faz içersine geçmesine sebep olacaktır. Ve bu süreç yeni ve eski moleküller arasında işlem boyunca devam edecektir ( c ).

d- İşlem defalarca tekrarlandığında iki bileşik sonunda birbirinden ayrılır. ● bileşiği mobil fazı tercih ettiği için hızla kolon içersinden geçecektir. ▲ bileşiği ise sabit faza daha fazla eğilim içinde olduğundan kolonu geç terk edecektir ( d ) [42].



Şekil 3.10. Ayırma İşleminin Grafıksel İfadesi [41].

### 3.4. Kromatografi Parametreleri

Kromatografik yöntemlerde etkili bir ayırım gerçekleştirebilmek için dikkat edilmesi gereken üç nokta vardır.

1. Numune bileşenleri kolonda tutunabilmelidir.
2. Numune bileşenleri diğerlerinden ayrılabilirdir.

3. Numune bileşenlerinin bant genişlikleri nispeten dar olmalıdır.

Kimyasal ve fiziksel etkileşimler sonucu oluşan bu koşullarsağlanmazsa, uygun bir çalışma süresinde ayırım gerçekleşmez. Ayırımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise kromatogramlar yorumlanarak kontrol edilir.

Kromatogram; kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar aldığı yol veya zamana karşı, dedektör tarafından elektronik olarak verilen sinyalle oluşturulan grafiktir.

Bir kromatogramı yorumlamak için gerekli parametreler;

- ✓ Alıkonma zamanı,  $t_R$
- ✓ Kapasite faktörü,  $k'$
- ✓ Seçicilik faktörü,  $\alpha$
- ✓ Kolon ayırma gücü,  $R_s$
- ✓ Kolon verimliliği,  $N$  ve  $L$  olarak verilmiştir [33].

#### **3.4.1. Alıkonma Zamanı ( $t_R$ )**

Alıkonma zamanı ( $t_R$ ), numunenin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma davranışı numune bileşenlerinin hareketli faz ile sabit faz arasındaki dağılımını gösterir. Alıkonmayı zaman olarak da hacim olarak da ifade edebiliriz.

*Alıkonma hacmi*; numune bileşenlerinin kolona verildikten sonra kolon boyunca ilerlemesi ve dedektöre ulaşabilmesi için gerekli olan mobil faz hacmidir.  $t_R$  alıkonma zamanı ve  $F_c$  volumetrik akış hızının çarpımı ile hesaplanır.

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (3.1)$$

Fakat GC ve HPLC gibi kromatografik sistemlerde hareketli fazın volumetrik akış hızını doğru olarak ölçmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle alıkonma zamanı ifadesini kullanmak doğru olur.

Numune veya hareketli faz genellikle kolonda alıkonmayanbilir madde içerir. Olmadığı durumlarda da pik tanımlanmasına yardımcı olması için kolonda tutulmayan bir madde analiz örneğine ilave edilebilir.

Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşma süresi ölü zaman ( $t_M$ ) olarak ifade edilir ve kolonda ilerleme hızı hareketli faz moleküllerinin dedektöre ulaşması için gereken süreye eşittir [43,44].

### 3.4.2. Kapasite Faktörü ( $k'$ )

Kapasite faktörü, kolonda çözünen numune bileşenlerinin göç hızlarını açıklamak için kullanılan bir ifadedir. Bir diğer adı ise alıkonma faktörüdür.

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3.2)$$

eşitliği ile ifade edilir.

Burada  $k'_A$ 'numune bileşenlerinden herhangi birinin kapasite faktörüdür.  $t_M$ ; ölü zaman,  $t_R$  ise analitin alıkonma süresidir.

Bir analit için alıkonma faktörünün 1'den küçük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok hızlı olduğunu gösterir ve bu durum alıkonma zamanının doğru tayinini zorlaştırır. Alıkonma faktörünün 20-30 birimden büyük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok uzun olduğunu gösterir.

İdeal ayırmalar ise alıkonma faktörünün 2 ile 10 arasında olduğu koşullarda sağlanır [33,34].

### 3.4.3. Seçicilik Faktörü

İki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneği ve onların hassas olarak kolonda alıkonulması kolon seçiciliği olarak adlandırılır. Buseçicilik ayırma faktörü ( $\alpha$ )

olarak ifade edilir. A ve B gibi iki tür için birkolonun seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) eşitlikte görüldüğü gibi tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (3.3)$$

$k_2'$  kolonda daha kuvvetli tutulan analit için kapasite faktörüdür.  $k_1'$  ise kolondan hızla ayrılan analit için kapasite faktörüdür. Buyüzden  $\alpha$  daima 1'den büyüktür.

$k'$  değerleri  $t_R$  ve  $t_M$  cinsinden yazılarak  $\alpha$ 'nın deneysel kromatogramdan hesaplanabileceği bir bağıntı elde edilir.

$$\alpha = \frac{(t_R)_2 - t_M}{(t_R)_1 - t_M} \quad (3.4)$$

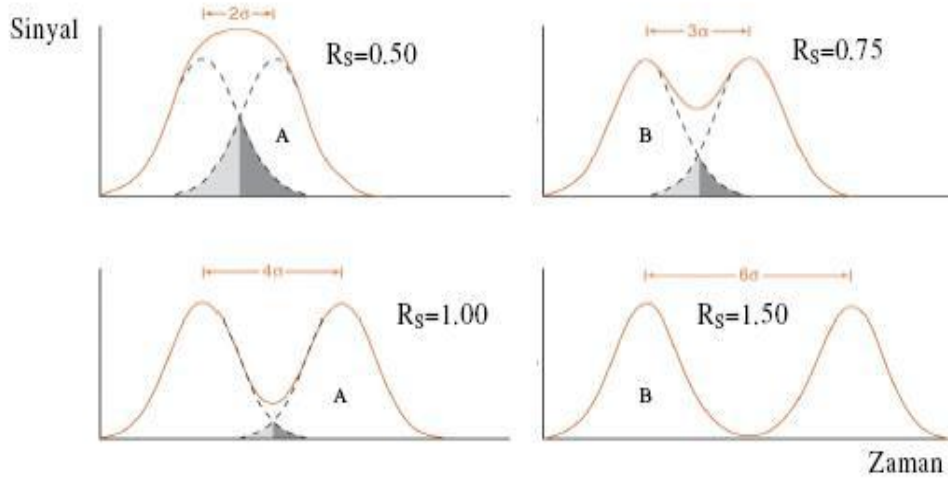
#### 3.4.4. Kolon Ayırma Gücü

Kolon ayırma gücü ( $R_s$ ), kolonun iki analiti birbirinden ayrabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolon ayırma gücü, pik genişliklerinin orta noktaları açısından komşu iki pik arasındaki mesafeyi ifade eder. Ayırma gücü eşitlikte verildiği gibi hesaplanır.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (3.5)$$

Burada  $W$ , pik genişliğini ifade eder.  $R_s=1$  olduğu zaman neredeyse %2'lik çakışmayla ayırım sağlandığı anlamına gelir. Şekil 3.12'de bu kromatogram gösterilmiştir [45].





**Şekil 3.11.** Kolon ayırma gücünün gösterildiği bir kromatogram [37].

Ayırma gücünün en az 1.5 olduğu durumlarda ideal ayırma gerçekleşir.

### 3.4.5. Kolon Verimliliği

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğine işaret eder. Pik genişliği ne kadar küçükse o kadar yüksek verimle çalışılmıştır. Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak genellikle birbirleri ile ilgili iki terim kullanılmaktadır: Tabaka yüksekliği (H), ve Tabaka sayısı (N)'dir. Bu iki terim arasındaki ilişki eşitlikte verilmiştir.

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.6)$$

Bu ilişkide L, kolonun uzunluğudur (cm). Kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar.

Kromatografik kolon, teorik tabaka olarak adlandırılan, birbirini izleyen, fakat ayrı ince tabakalardan oluşmuş bir damıtma kolonuna benzermiş gibi düşünülür. Her bir tabakada, analitin sabit ve hareketli fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (3.7)$$

Bu eşitlik kullanılarak N, iki zaman ölçümü ( $t_R$  ve W) ile hesaplanabilir.

### **3.5. Yöntem Validasyon Parametreleri**

#### **3.5.1. Doğruluk**

Analiz sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir [46].

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

##### **3.5.1.1. Referans bir yöntemle karşılaştırmak**

Geliştirilen analiz yöntemi ile, 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir (3.8, 3.9) [47].

$$\%BSS = \frac{SS}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\%BH = \frac{GD - x}{GD} \times 100 \quad (3.9)$$

##### **3.5.1.2. Kör (matriks) ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek**

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimler de eklenir. Boş matriks, ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyeden az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

### **3.5.1.3. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi**

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları, matris içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi, deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar, ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

### **3.5.2. Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya %VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan herbir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun %BSS'ı, teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Kesinliğin en yaygın kullanılan ölçüsü standart sapmadır [48-50].

### **3.5.3. Seçicilik**

Analizi yapılacak maddenin, numunede mevcut girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Özellikle kararlılık tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe oluşur [49].

#### **3.5.4. Teşhis Sınırı (LOD)**

Analitin belirlenebildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Teşhis Sınırı (3.10) kullanılarak hesaplanır.

$$LOD= 3,3 \times SS / m \quad (3.10)$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS, kör çözeltilerinde ( en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

#### **3.5.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)**

Analizi yapılan maddenin miktarının kabul edilebilir düzeyde kesinlikte ve doğrulukta tayin edilebileceği kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Tayin Alt Sınırı (3.11) kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m \quad (3.11)$$

Burada SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Bir yöntemde SS ve m değerleri, LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

#### **3.5.6. Doğrusallık**

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon katsayısı (r), doğrusallığı veren parametredir. Doğrusallık, korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  ise sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltilerden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50'sinden düşük ve üst sınır da % 150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğitim ve kesim değerlerinin %BSS'ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

#### **3.5.6.1. Kalibrasyon Grafiği**

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için cihazdan ölçülen değerler kullanılarak hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.

#### **3.5.6.2. Duyarlık**

Duyarlık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak da tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

#### **3.5.6.3. Çalışma Aralığı**

Yeterli doğruluk ve duyarlıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50'sinden düşük ve %150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

#### **3.5.6.4. Sağlamlık**

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi

etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

### **3.5.6.5. Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışma, aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi gerekir. Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir [51].

## 4. METARYAL VE METOT

### 4.1. Kullanılan Bazı Kimyasallar Ve Özellikleri

Tez çalışması sırasında mobil faz karışımlarının hazırlanmasında ve optimizasyonun parametrelerinin taranmasında kullanılan standart çözeltiler ve özellikleri Tablo 4.1’de verildi.

**Tablo 4.1.** Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri

KİMYASALIN ADI	KULLANIM AMACI	AÇIKLAMA
Metil alkol (MeOH)	Mobil faz standardizasyonunda	HPLC saflığında Merck
Karbendazim	Standart olarak	HPLC saflığında Agilent lab.
Klorpirifos	Standart olarak	HPLC saflığında Agilent lab.
Sodyum asetat	Ekstraksiyon yöntemi kimyasalı	HPLC saflığında Merck
Sodyum sülfat	Ekstraksiyon yöntemi kimyasalı	HPLC saflığında Merck
Etil asetat	Ekstraksiyon yöntemi kimyasalı	HPLC saflığında Merck
n- Butanol	Ekstraksiyon yöntemi kimyasalı	HPLC saflığında Merck
Sülfirik asit	Ekstraksiyon yöntemi kimyasalı	HPLC saflığında Merck

### 4.2. Kullanılan Cihazlar

#### 4.2.1. Yüksel Performanslı Sıvı Kromatografisi

Karbendazim ve klorpirifosun kalitatif ve kantitatif analizi Shimadzu HPLC LC-20AT model autosampler ekipmanı bulunan dört pompa ile Shimadzu RF-20A floresans dedektör kullanıldı. Sistemde pompa ünitesi (LC 20AT), örnekleyici (SIL 20 AHT), degazör ( DGU 20A5R ), kolon fırını ( CTO 10AS ) ve dedektör (RF-20A) kısımları bulunmaktadır.

10 µL örnekler enjekte edilerek 4.6 mm×250 mm çapında RP-C<sub>18</sub> Inertsil ODS-3 (5µm) kolon üzerinde kromatografik ayırma gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, inertsil ODS – 3.5 µm 4.6 x 250 mm kolonu kullanıldı. Bu kolonda farklı mobil faz karışımlarında alıkonma süreleri incelendi ve akış hızı ve kolon sıcaklığı taramaları sonucunda en uygun kolon sıcaklığı ve akış hızı belirlendi. Akış hızı; 0.8 mL.dk<sup>-1</sup>, kolon sıcaklığı olarak 40°C olduğuna karar verildi.



**Şekil 4.1.** Shimadzu Marka HPLC Cihazı

#### **4.2.2. Ultrasonik Banyo**

Hazırlanan mobil fazlardaki çözünmeyen gazların giderilmesi için Şekil 4.2’de görülmekte olan ultrasonik banyo kullanıldı.





**Şekil 4.2.** Ultrasonik Banyo

#### **4.2.3. Terazi**

Tartım işlemleri Şekil 5.3’de görülmekte olan Shimadzu AUX 320 marka terazi kullanılarak gerçekleştirildi.



**Şekil 4.3.** Shimadzu Marka Hassas Terazi

#### **4.2.4. Ultra Saf Su Cihazı**

HPLC de çalışılan çözeltilerin tamamında Şekil 4.4’de görülmekte olan ultra saf su cihazından elde edildi. 18.2  $\mu\Omega$  dirence sahip ultra saf su kullanıldı.



**Şekil 4.4.** Ultra Saf Su Cihazı

#### **4.2.5. Filtrasyon Düzeneğ**

Hazırlanan çözeltiler HPLC cihazında kullanılmadan önce Şekil 4.5’da görölmekte olan filtrasyon düzeneğinden filtre edildi.



**Şekil 4.5.** Filtrasyon Düzeneği

#### **4.2.6. Evaporatör**

Hazırlanan ekstraksiyon çözeltilerinin buharlaştırılıp, ekstrat elde edilmesinde şekil 4.6’de görölmekte olan rotary evaporatör kullanıldı.



**Şekil 4.6.** Rotary Evaporatör

## 5. DENEYSEL

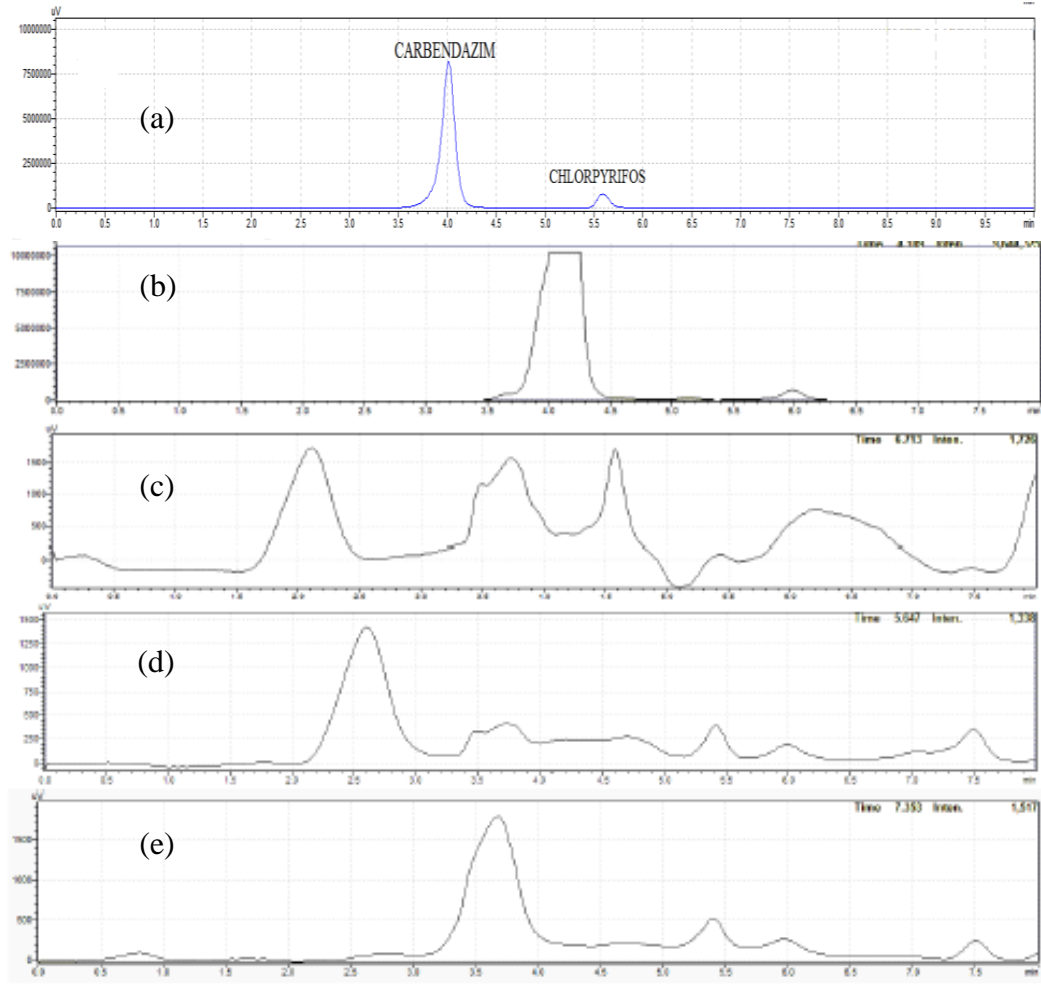
### 5.1. Karbendazim ve Klorpirifos İçin Optimum Koşulların Tayini

Standart olarak hazırlanan karbendazim ve klorpirifos çözeltileri RP-HPLC-FD kullanılarak 280-340, 285-315, 330-425, 330-460, 350-465 nm değerlerinde dalga boyu taramaları yapıldı. Şekil 5.1’de görüldüğü gibi sadece 280-340 nm değerinde her iki standarta ait kuyruklanma faktörünün düşük, ayırım faktörünün yüksek olduğu pikler elde edilmiştir. Floresans dedektörde (RP-HPLC-FD) dalga boyu ölçümü ile elde edilen veriler Tablo 5.1 ve Şekil 5.1 ’de verilmektedir. Bu veriler ve literatürde dikkate alınarak optimum dalga boyunun 280-340 nm olmasına karar verildi [52, 53]. Optimum dalga boyunun belirlenmesinin ardından uygun mobil faz seçimi, akış hızı ve kolon sıcaklığının etkisi incelenerek optimum koşullar belirlendi.

**Tablo 5.1.** Dalga Boyu Ölçümü

	Karbendazim	Klorpirifos
<b>Dalga Boyu (nm)</b>		
$\lambda_{Ex} - \lambda_{Em}$	$t_R$	$t_R$
<b>(Uyarma-Yayılma)</b>		
280 – 340	4.02	5.56

$t_R$ : Alıkonma zamanı



**Şekil 5.1.** (a) 280-340 nm, (b) 285-315, (c) 330-425, (d) 330-460, (e) 350-465 nm Dalga Boyu Değerlerinde Yapılan Ölçümlere ait kromatogramlar

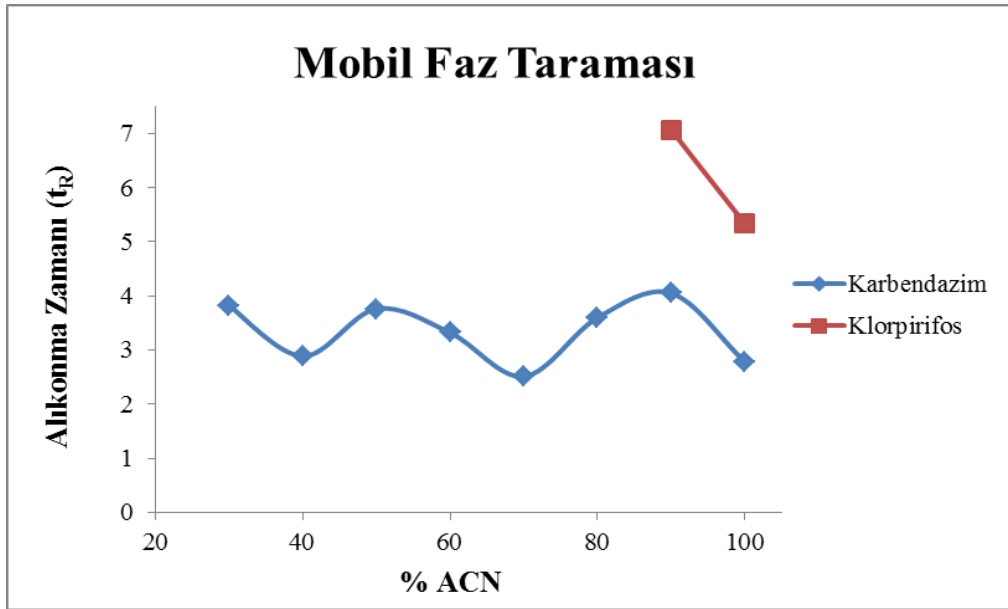
### 5.1.1. Karbendazim ve Klorprifos İçin Optimum Mobil Faz Seçimi

Mobil faz seçiminde metanol:su (MeOH:H<sub>2</sub>O) ve asetonitril:su (ACN:H<sub>2</sub>O) olmak üzere iki farklı mobil faz karışımlarında ayrı ayrı analizler yapılarak alıkonma zamanları, analiz süreleri ve teorik tabaka sayıları incelendi. Analizler ve literatür taraması sonucunda pestisitlerin tayininde kullanılan en uygun mobil fazın MeOH:H<sub>2</sub>O karışımı olduğuna karar verildi [54-57]. Analiz sonucunda denemesi yapılan 2 farklı mobil faz karışımları için elde edilen veriler Tablo 5.2, 3, 4, 5 ve Şekil 5. 2, 3, 4, 5, 6, 7’de verildi.

**Tablo 5.2.** ACN:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Karışımı Verileri

ACN	Karbendazim	Klorpirifos
%	$t_R$	
100	2.786	5.336
90	4.05	7.072
80	3.597	-
70	2.511	-
60	3.321	-
50	3.762	-
40	2.887	-
30	3.822	-
20	-	-
10	-	-
0	-	-

$t_R$ : Alikonma zamanı

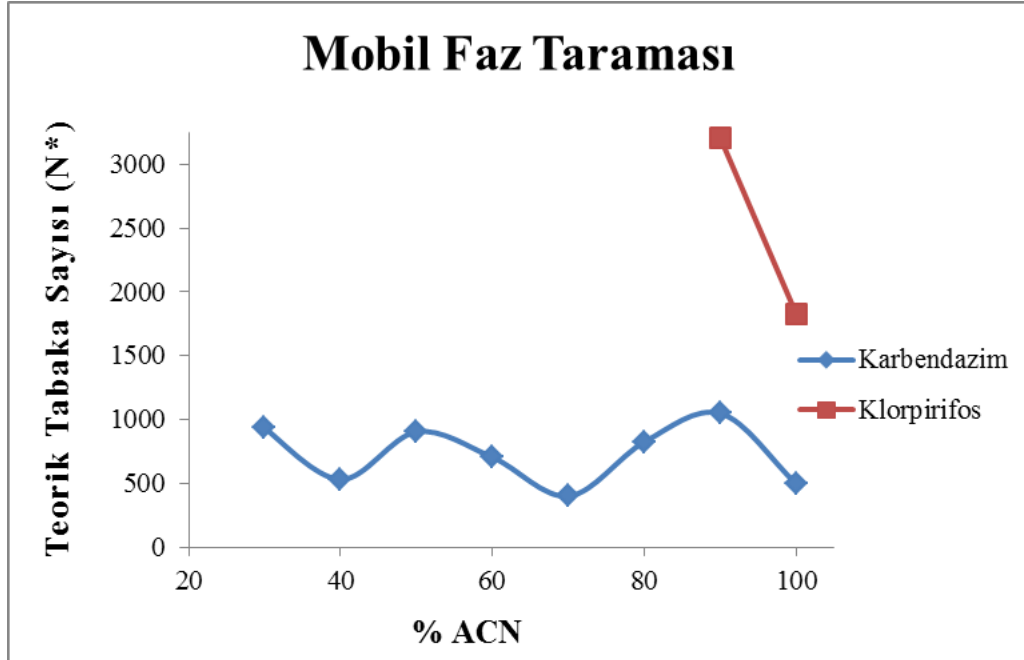


**Şekil 5.2.** ACN:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Taraması

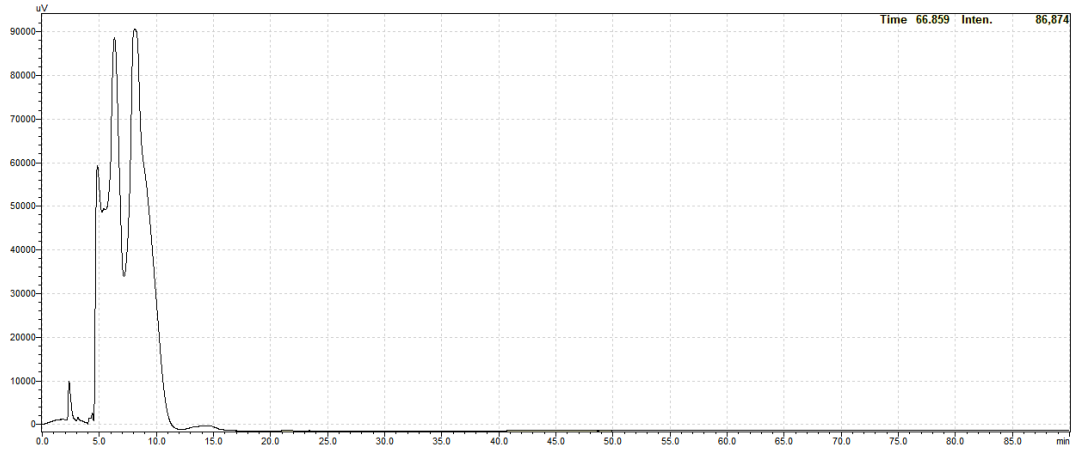
**Tablo 5.3.** ACN:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Karışımı Verileri

ACN	Karbendazim	Klorpirifos
%	N*	
100	496.754944	1822.265344
90	1049.76	3200.843776
80	828.058176	-
70	403.527744	-
60	705.858624	-
50	905.769216	-
40	533.425216	-
30	934.891776	-
20	-	-
10	-	-
0	-	-

N\* : Teorik Tabaka Sayısı



**Şekil 5.3.** ACN:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Taraması



**Şekil 5.4.** Mobil Faz Olarak % 20 ACN:% 80 H<sub>2</sub>O Karışımı Kullanıldığında Elde Edilen Kromatogram

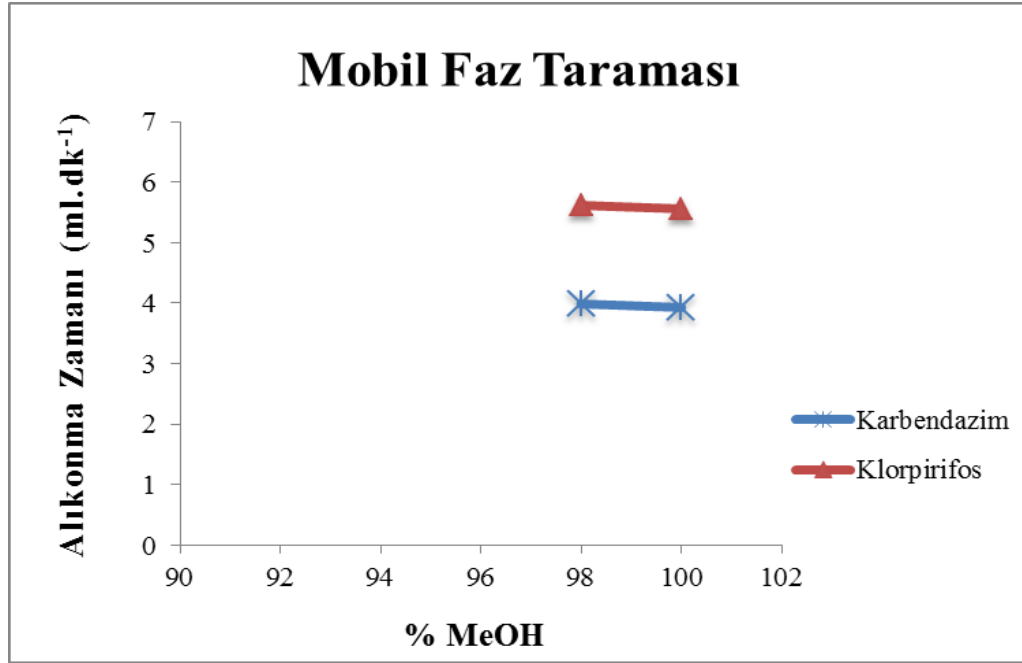
Tablo 5.2,3 de verilen oranlardaki asetonitril:su (ACN:H<sub>2</sub>O) karışımının farklı analiz sürelerinde (15-30-60-90-180 dk) mobil faz taraması gerçekleştirildi. Elde edilen veriler incelendiğinde asetonitril oranı % 90'nın altına düştüğünde klorpirifosun, % 30'un altına düştüğünde ise karbendazimin piklerinde yayvanlaşma olduğu görüldü ve düzgün bir kromatogram elde edilemedi (Şekil 5.4). Diğer ACN:H<sub>2</sub>O karışım oranları incelendiğinde ise karbendazim ve klorpirifosa ait piklerde kuyruklanma ve genişleme görüldü. Bu sebeplerden dolayı ACN:H<sub>2</sub>O karışımı mobil faz olarak tercih edilmedi.

**Tablo 5.4.** MeOH:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Karışımı Verileri

MeOH	Karbendazim	Klorpirifos
%	$t_R$	
100	3.93	5.56
98	3.99	5.618
80	-	-
60	-	-
20	-	-

$t_R$ : Alıkonma zamanı



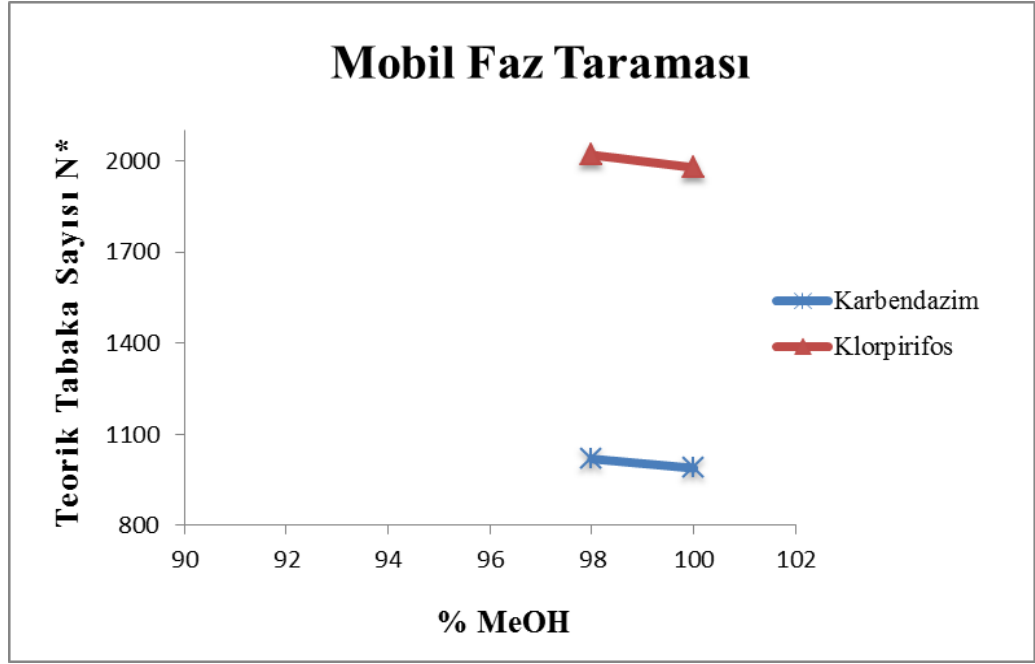


Şekil 5.5. MeOH:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Taraması

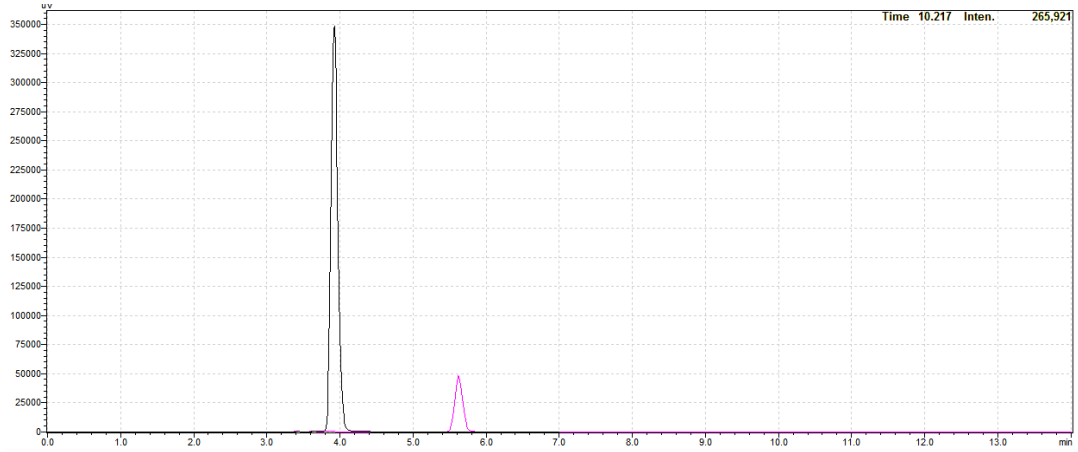
Tablo 5.5. MeOH:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Karışımı Verileri

MeOH	Karbendazim	Klorpirifos
%	N*	
100	988.4736	1978.4704
98	1018.8864	2019.963136
80	-	-
60	-	-
20	-	-

N\* : Teorik Tabaka Sayısı



Şekil 5.6. MeOH:H<sub>2</sub>O Mobil Faz Taraması



Şekil 5.7. Mobil Faz Olarak % 98 MeOH : % 2 H<sub>2</sub>O Karışımı Kullanıldığında Elde Edilen Kromatogram

Çalışılan % 20-60-80'lik MeOH:H<sub>2</sub>O karışımlarında net bir kromatogram elde edilmedi. % 98'lik MeOH - H<sub>2</sub>O karışımı ve % 100'lük MeOH çözeltisi sonuçlarında ise her iki pestisit için ayırım gücü iyi, istenilen alıkonma zamanına sahip ve net pik alanları elde edildi. Bu nedenle % 98'lik MeOH:H<sub>2</sub>O oranındaki karışımı mobil faz olarak seçildi.

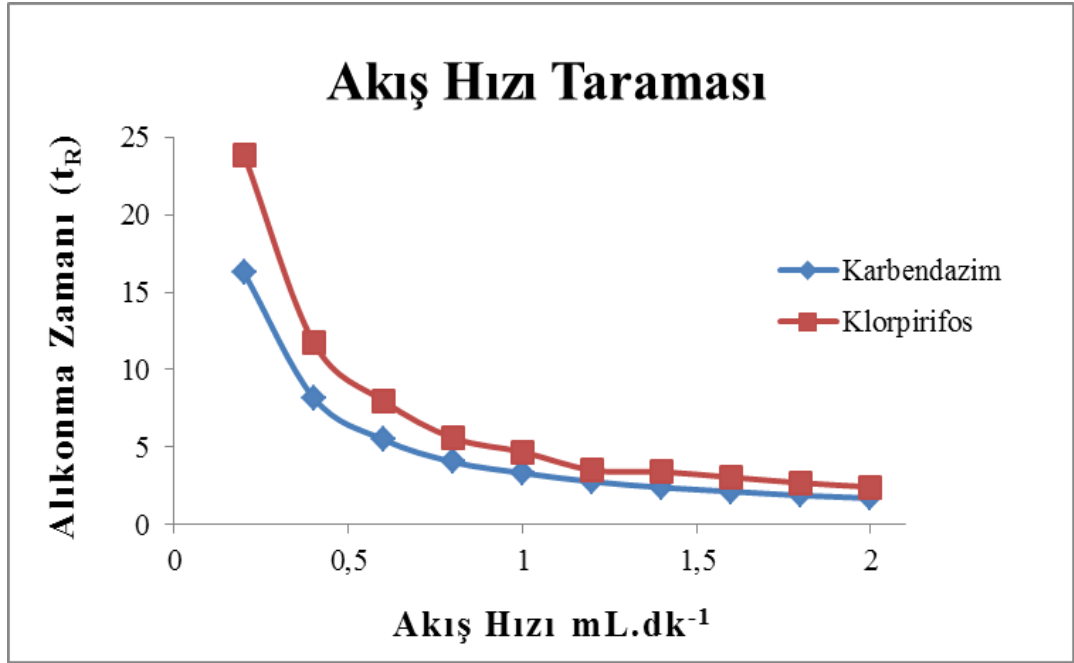
### 5.1.2. Karbendazim ve Klorpirifos için Optimum Akış Hızının Belirlenmesi

Karbendazim ve klorpirifos için optimum mobil fazın belirlenmesinin ardından optimum akış hızını belirlemek amacıyla 0.2 – 2.0 ml.dk<sup>-1</sup> aralığında akış hızı taraması yapıldı. Yapılan analizler sonucunda her iki pestisit için analiz süresi, alıkonma süreleri, teorik tabaka sayıları, kolon basıncı, piklerin kuyruklanma ve ayırım faktörleri incelenerek optimum akış hızınının 0.8 ml.dk<sup>-1</sup> olduğuna karar verildi. Tablo 5.6 ve Şekil 5.8’de akış hızınının alıkonma zamanına etkisi görülmektedir.

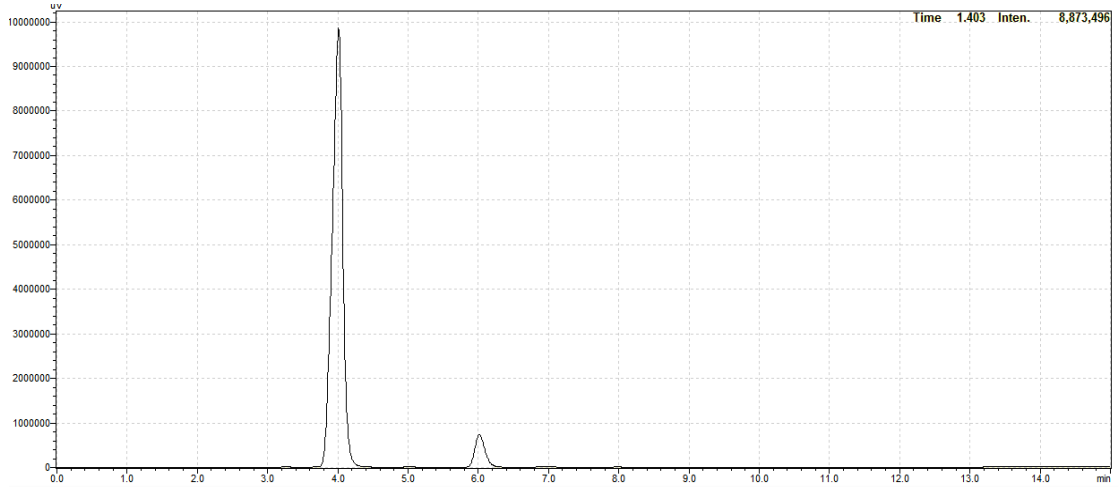
**Tablo 5.6.** Akış Hızı Tarama Verileri

	Karbendazim	Klorpirifos
ml.dk <sup>-1</sup>	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>
0.2	16.267	23.886
0.4	8.181	11.752
0.6	5.487	7.985
0.8	4.042	5.594
1.0	3.323	4.684
1.2	2.77	3.513
1.8	2.395	3.401
2.0	2.135	3.048

t<sub>R</sub>: Alıkonma süresi



Şekil 5.8. Akış Hızı Taraması



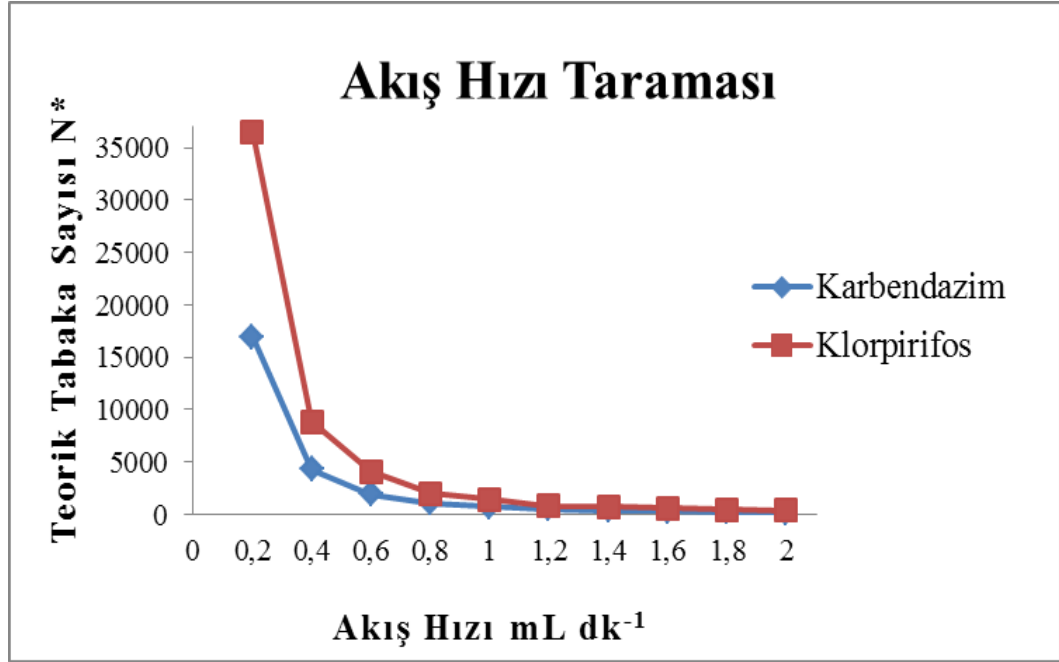
Şekil 5.9. 0.8 mL.dk<sup>-1</sup> Optimum Akış Hızına Ait Kromatogram

Tablo 5.7 ve Şekil 5.10 'de akış hızının teorik tabaka sayısına etkisi görülmektedir.

**Tablo 5.7.** Akış Hızı Tarama Verileri

ml.dk <sup>-1</sup>	Karbendazim	Klorpirifos
%	N*	
0,2	16935.3785	36514.62374
0,4	4283.440704	8839.008256
0,6	1926.858816	4080.6544
0,8	1045.616896	2002.741504
1	706.709056	1404.150784
1,2	491.0656	789.834816
1,4	367.1056	740.275264
1,6	291.7264	594.579456
1,8	225.961024	463.454784
2	184.42464	377.291776

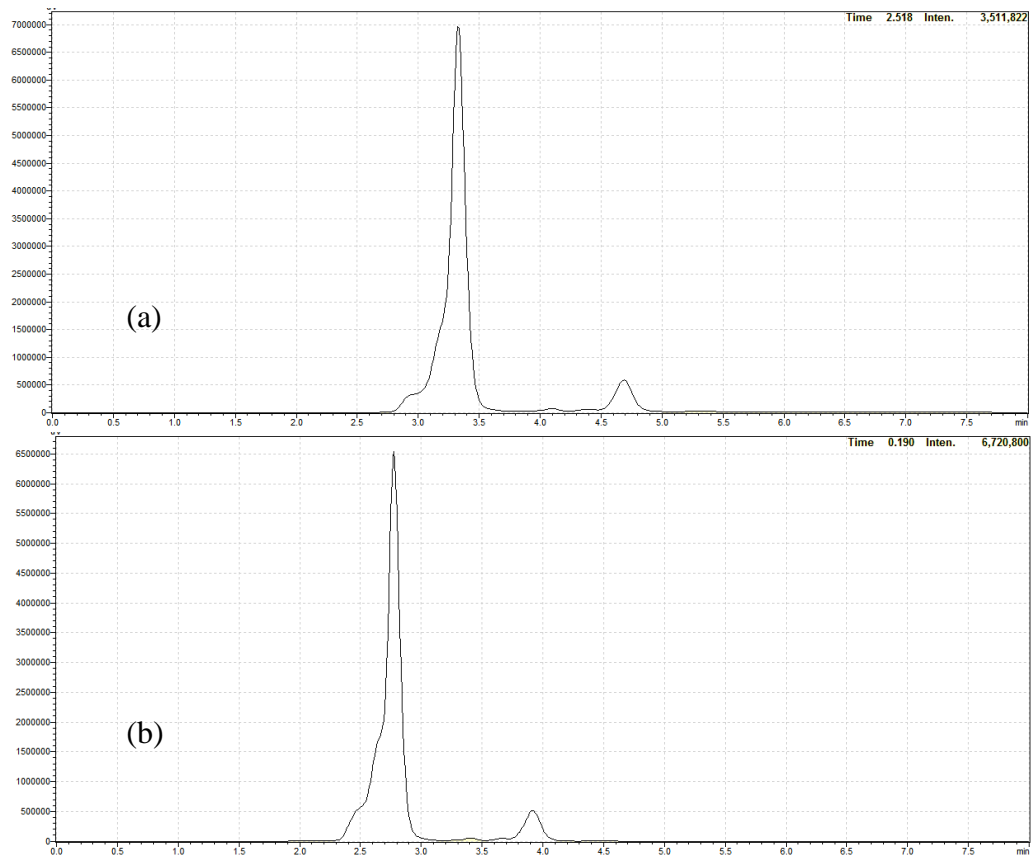
N\* : Terik Tabaka Sayısı



**Şekil 5.10.** Akış Hızı Tarama Verileri

Tablo 5.7 ve Şekil 5.10’da verilen veriler incelendiğinde 0.2 – 0.8 mL.dk<sup>-1</sup>’lık akış hızı aralığına ait piklerde teorik tabaka sayılarının yüksek, elde edilen piklerin net olduğu görüldü. Analizde kullanılan mobil faz ve zamandan tasarruf için optimum akış hızı 0.8 mL.dk<sup>-1</sup> seçildi.

Akış hızı taramasında 1.0 mL.dk<sup>-1</sup> ve üzeri değerlerde kolon basıncı 1atm’ye yükseldi ve piklerde Şekil 5.11’de görüldüğü gibi kuyruklanma meydana geldiğinden dolayı tercih edilen bir akış hızı olmadı.



**Şekil 5.11.** (a) 1mL.dk<sup>-1</sup> Akış Hızına Ait Kromatogram, (b) 1.2mL.dk<sup>-1</sup> Akış Hızına Ait Kromatogram

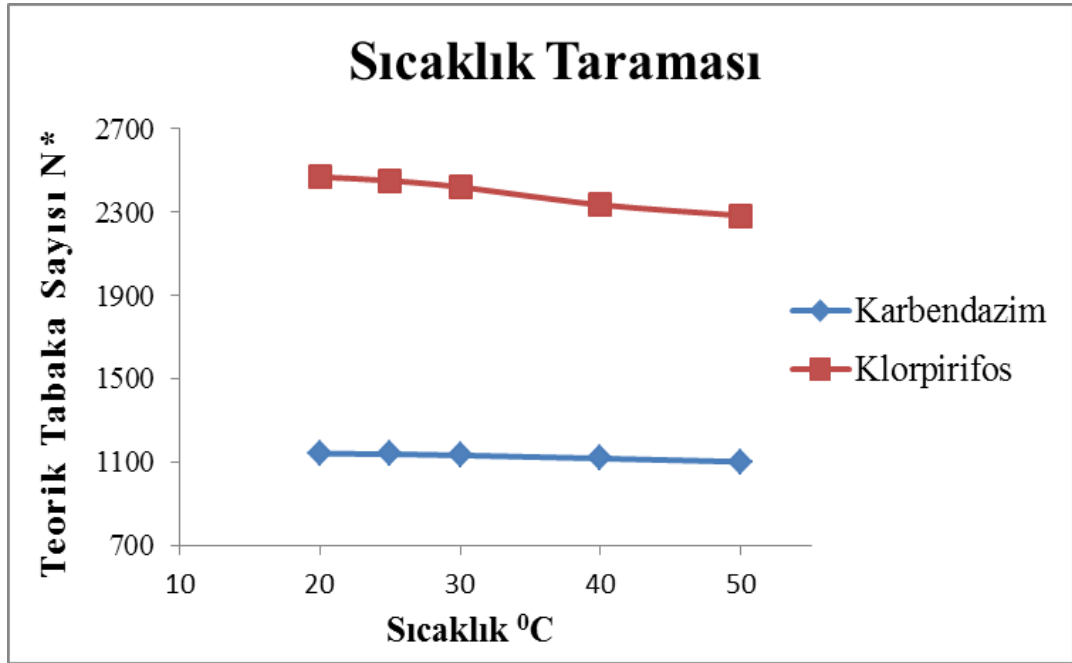
### 5.1.3. Karbendazim ve Klorpirifos İçin Optimum Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Karbendazim ve klorpirifosun tayini için optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20-50°C aralığında analizler yapıldı ve optimum sıcaklık olarak 40°C belirlendi. Tablo 5.8 ve Şekil 5.12’de verilen verilerde kolon sıcaklığının teorik tabaka sayısına etkisi gösterilmektedir.

**Tablo 5.8.** Kolon Sıcaklığı Taramasının Verileri

T	Karbendazim	Klorpirifos
°C	N*	
20	1140,277824	2468,897344
25	1137,0384	2450,646016
30	1131,111424	2419,852864
40	1116,094464	2334,8224
50	1100,116224	2283,310656

N\*: Teorik Tabaka Sayısı



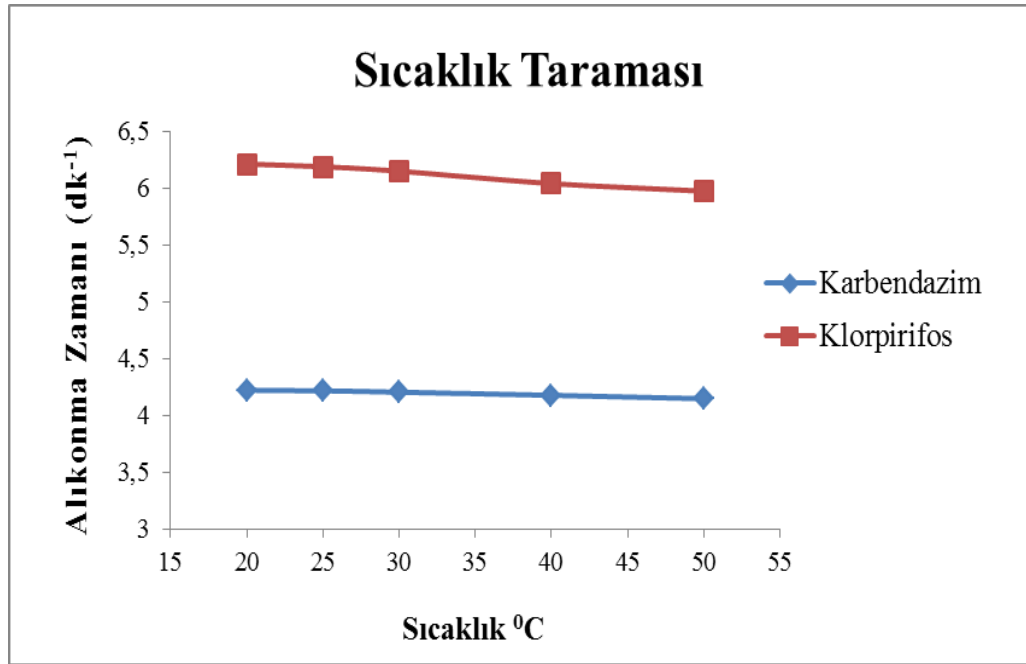
**Şekil 5.12.** Kolon Sıcaklığı Taraması

Tablo 5.9 ve Şekil 5.13’da verilen verilerde kolon sıcaklığının alıkonma zamanına etkisi gösterilmektedir.

**Tablo 5.9.** Kolon Sıcaklığı Tarama Verileri

T	Karbendazim	Klorpirifos
<sup>0</sup> C	t <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>
20	4,221	6,211
25	4,215	6,188
30	4,204	6,149
40	4,176	6,04
50	4,146	5,973

t<sub>R</sub>: Alıkonma zamanı



**Şekil 5.13.** Kolon Sıcaklığı Taraması

Şekil 5.12,13 ve Tablo 5.8,9 incelendiğinde analize kolon sıcaklığının ciddi bir etkisi olmadığı görüldü. Optimizasyonu tamamlamak adına kolon sıcaklığı literatür dikkate alınarak 40 °C seçildi [48,49].

## 5.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi

Kalibrasyon grafikleri optimum koşullarda (Dalga boyu 280 – 340 nm, akış hızı 0.8 mL.dk<sup>-1</sup>, mobil faz % 98'lik metanol ve kolon sıcaklığı 40 °C'dir.) iki standardın



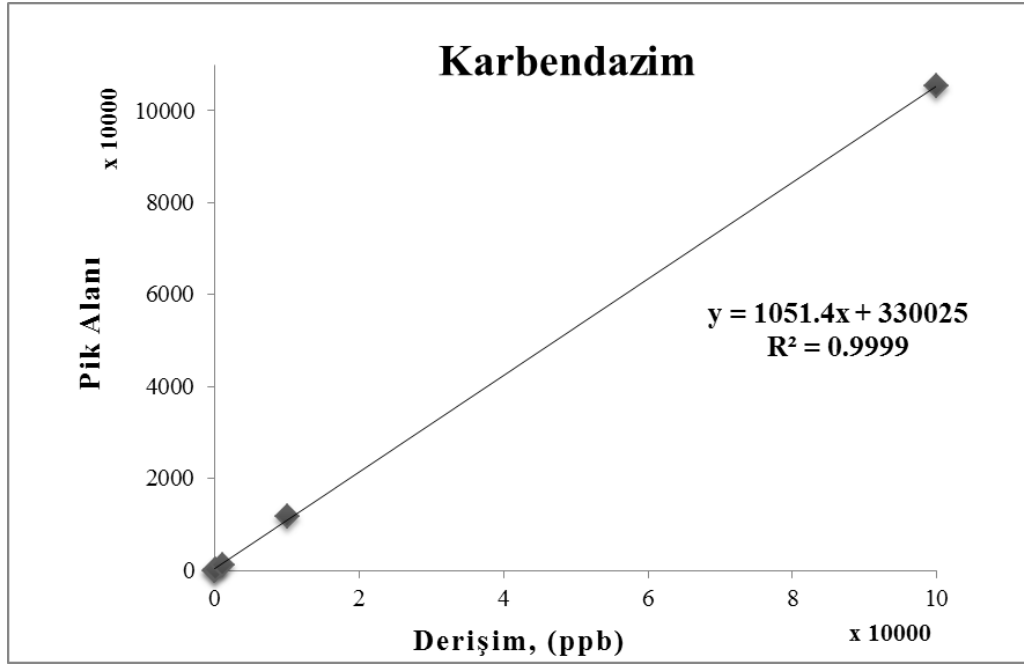
farklı derişimlerdeki çözeltilerinin analizlerinden elde edilen sonuçlara göre çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak örneklerdeki karbendazim ve klorpirifos pestisit miktarları belirlendi.

### 5.2.1. Karbendazimin Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğini çizmek için 2000 ppm'lik karbendazim standardından ara stok standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçları Tablo 5.10'da görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 5.14'de görülen grafik elde edildi.

**Tablo 5.10.** Karbendazimin Kalibrasyon Verileri

<b>Karbendazim</b>				
<b>ppb</b>	<b>Pik Alanı 1</b>	<b>Pik Alanı 2</b>	<b>Pik Alanı 3</b>	<b>Ortalama</b>
10	25103	25095	25354	25184
100	129731,9	130882	130092,7	130235,53
1000	1271119,3	1270839,2	1279276,5	1273745
10000	11687162	11625153	11643091	11651802
100000	105306563	105418495	105460329	105395129



**Şekil 5.14.** Karbendazime Ait Kalibrasyon Grafiği

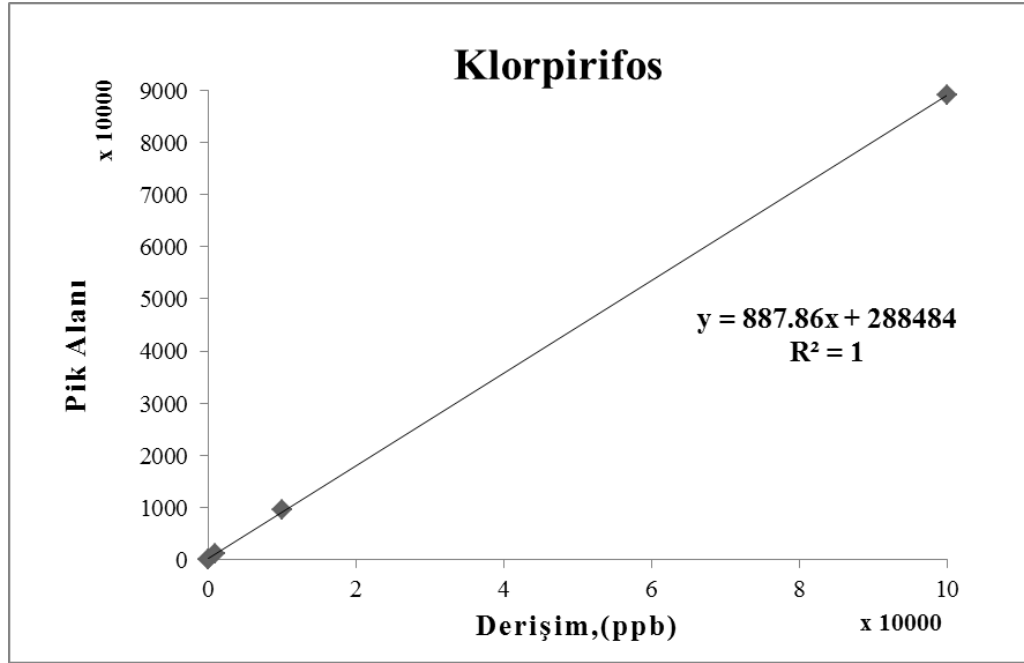
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanıldı.

### 5.2.2. Klorpirifosun Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğini çizmek için 1000 ppm'lik klorpirifos standardından ara stok standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçları Tablo 5.11'de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 5.15'de görülen grafik elde edildi.

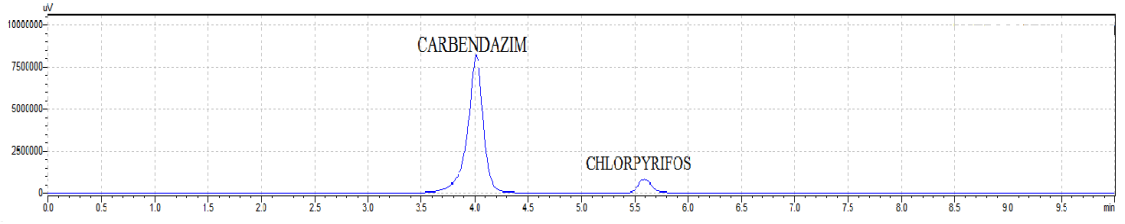
**Tablo 5.11.** Klorpirifos Kalibrasyon Verileri

ppb	Pik alanı 1	Pik alanı 2	Pik alanı 3	Ortalama
10	21088	20792	19808	20562,67
100	150175	148922	149231	149442,7
1000	1097336	1099890	1093526	1096917
10000	9503846	9521616	9496471	9507311
100000	89075883	88984259	89063511	89041218



**Şekil 5.15.** Klorpirifosa Ait Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanıldı.



**Şekil 5.16.** Karbendazim ve Klorpirifosa Ait Tipik Kromatogram

### 5.3. Örneklerin Analize Hazırlanması

Yozgat ve Kayseri'de farklı tarım alanlarından elma, greyfurt, mandalina, ıspanak ve maydanoz örnekleri alındı. Her bir meyve ve sebze örneği; yüzeylerinde geri kazanım ve yıkama işlemi yapılmadan (Kayseri ilinden alınan elma örneğine ayrıca geri kazanım ve yıkama işlemi uygulandı) yukarıdan aşağıya 8 parça halinde dilimlendi, öğütüldü. Toplanmış meyve veya sebze örneklerinin her birinden bir homojen dilim 25 g alındı.



**Şekil 5.17.** Ispanak Örneğinin Ekstraksiyona Hazırlanması

Ekstarksiyon işlemi literature göre yapıldı [58, 59]. 5 g sodyum asetat, 20 g sodyum sülfat ve 40 mL etilasetat ilave edilerek Şekil 5.18'da görüldüğü gibi porselen havanda 1 dk süresince ezme işlemi uygulanarak homojenize edildi.



**Şekil 5.18.** Homojenizasyon İşlemine Tabi Tutulan Ispanak Örneği

Şekil 5.19’de görüldüğü gibi bu karışım ayırma hunisine dekante edilerek, örnekler sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu.



**Şekil 5.19.** Ayırma Hunisinde Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Örnek üzerine tekrar 2 kez etil asetat ilave edilerek ikinci kez homojenize etmeye devam edildi. İkinci uygulamadan elde edilen karışımda ayırma hunisine dekante edilerek alındı. Havanda kalan örneğe iki kez 1 M, 40 mL sülfirik asit ilavesi yapılarak ayırma hunisine alındı ve 3 dk kadar çalkalanarak tabakaların ayrılması sağlandı. Daha sonra etil asetat kısmı filtre edilerek alındı.

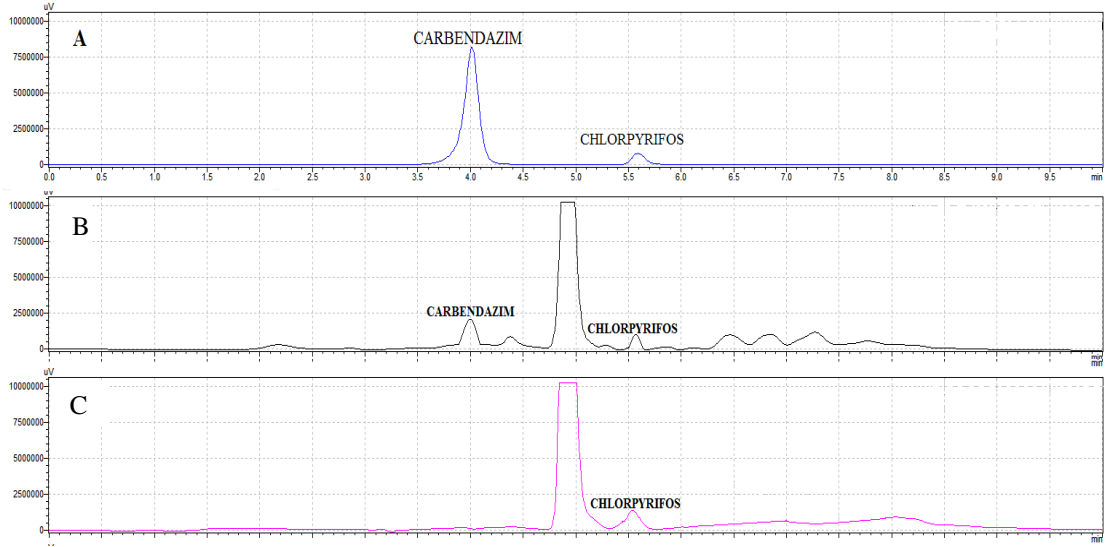


**Şekil 5.20.** Organik Fazın Sodyum Sülfattan Geçirilmesi

Şekil 5.20’de görüldüğü gibi organik faz sodyum sülfattan geçirildi ve sonra süzülerek özütü elde edildi. Özüt  $45^{\circ}\text{C}$  evaporatörde 3 ml’ye buharlaştırıldı. Elde edilen konsantre 10mL’ye metanol ile tamamlandı. Daha sonra 0,48  $\mu$  filtre ile süzüldü, 1ml alınıp viallere konularak 10  $\mu\text{L}$  lik hacimler halinde HPLC’de analliz edildi.

#### **5.4. Optimum Şartlarda Elde Edilen Kromatogramlar**

Optimum koşullarda 280-340 nm,  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$  mobil faz akış hızında, kolon sıcaklığı  $40^{\circ}\text{C}$ ’de elde edilen 10 ppm’lik standart karbendazim ve klorpirifos karışımlarına ait kromatogram (A), yıkama işlemi uygulanmadan ekstrakte edilmiş Kayseri elma örneğinde karbendazim ve klorpirifos (B), yıkama işlemi uygulandıktan sonra ekstrakte edilmiş Kayseri elma örneğinde karbendazim ve klorpirifos (C)’a ait kromatogramlar Şekil 5.21’de verilmektedir.



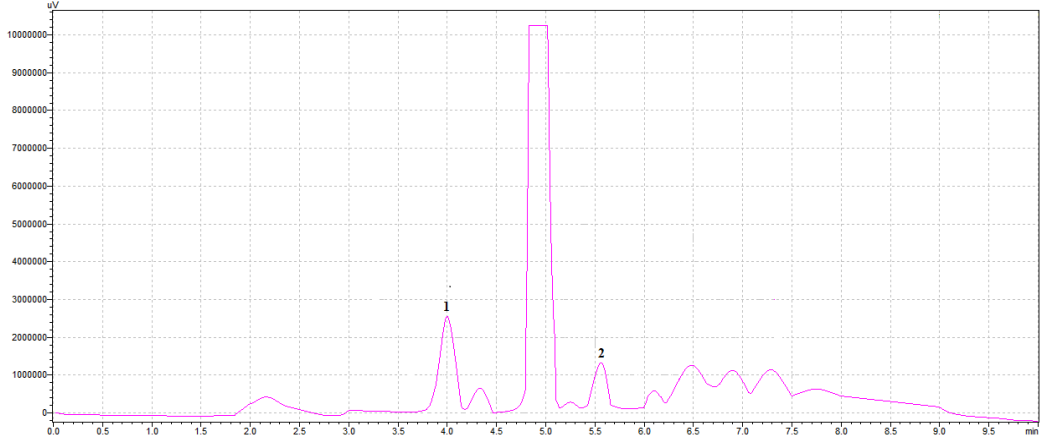
**Şekil 5.21.** Optimum Koşullarda Karbendazim Ve CPF'a Ait Kromatogram (A), Yıkama İşlemi Uygulanmamış Ekstraksiyon İşlemi Uygulanmış Kayseri'den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram (B), Yıkama İşlemi Uygulanmış Ekstrakte Edilmiş Kayseri'den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram (C)

Şekil 5.21'de (A) kromatogramda görüldüğü gibi karbendazim  $3.98 \pm 0.01$ , klorpirifos  $5.56 \pm 0.01$  alıkonma sürelerinde optimum şartlarda eş zamanlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır.

Çalışılan taze sebze ve meyve örneklerinden Kayseri iline ait elma örneği seçilerek direk ekstraksiyona tabi tutulmasının yanında yıkama, kabuk soyma ve geri kazanım işlemlerine tabi tutuldu.

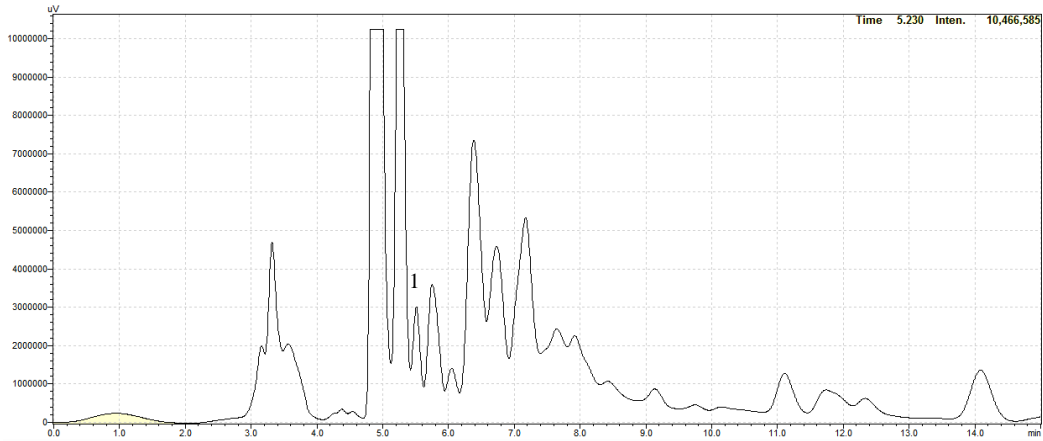
Kayseri'den alınan elma örneğinde yıkama öncesi ve yıkama sonrası ekstraksiyon işlemlerinin ardından alınan kromatogramda ( Şekil 5.21 ) da görüldüğü gibi yıkama sonrası dahi klorpirifos pestisitinin uzaklaşmadığı hala varlığını sürdürdüğü görülmektedir.

Optimum koşullarda elde edilen diğer sebze ve meyve örneklerine ait kromatogramlar aşağıdaki gibidir.



**Şekil 5.22.** Kayseri’den Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram

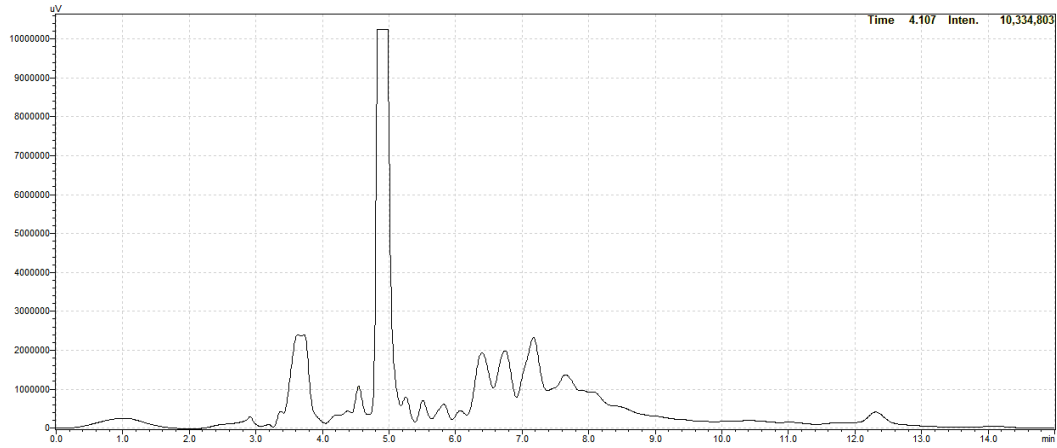
Şekil 5.22 Kayseri elma kromatogramında da görüldüğü gibi 4.0 ve 5.59 alıkonma sürelerine sahip karbendazim (1) ve klorpirifos (2) pestisitleri gözlenilmiş, optimum şartlarda eş zamanlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır.



**Şekil 5.23.** Yozgat’tan Alınan Elma Örneğine Ait Kromatogram

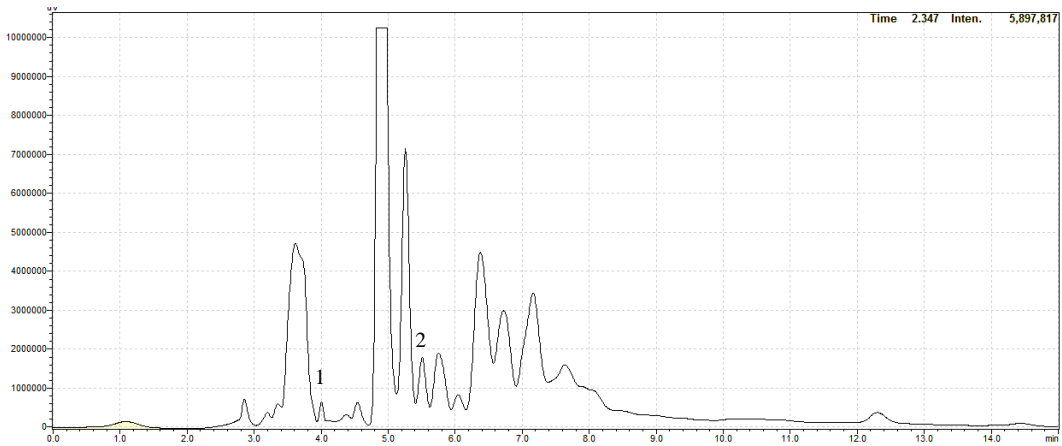
Şekil 5.23 Yozgat elma örneğine ait kromatogramda da görüldüğü gibi 4.0 alıkonma süresinde karbendazim piki gözlenmemiş, 5.5 alıkonma süresine sahip klorpirifos (1) piki gözlenilmiştir.





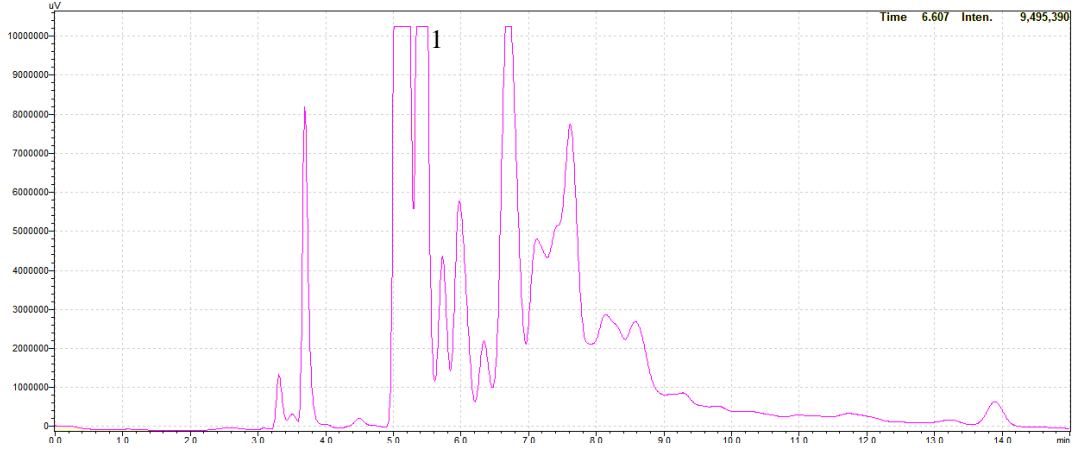
**Şekil 5.24.** Greyfurt Örneğine Ait Kromatogram

Şekil 5.24 Greyfurt örneğine ait kromatogramda da görüldüğü gibi 4.0 alıkonma süresinde karbendazim piki gözlenmemiş, 5.57 alıkonma süresine sahip klorpirifos piki gözlenilmiştir.



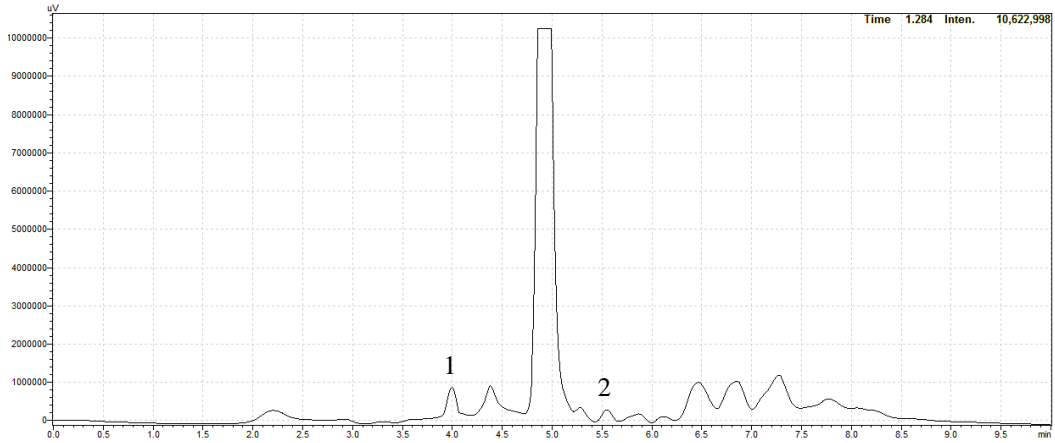
**Şekil 5.25.** Mandalina Örneğine Ait Kromatogram

Şekil 5.25 Mandalina örneğine ait kromatogramında da görüldüğü gibi 3.99 ve 5.56 alıkonma sürelerine sahip karbendazim (1) ve klorpirifos (2) pestisitleri gözlenilmiş, optimum şartlarda eş zamanlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır.



**Şekil 5.26.** Ispanak Örneğine Ait Kromatogram

Şekil 5.26 Ispanak örneğine ait kromatogramda da görüldüğü gibi 4.0 alıkonma süresinde karbendazim piki gözlenmemiş, 5.59 alıkonma süresine sahip şiddetli ve geniş klorpirifos (1) piki gözlenilmiştir.



**Şekil 5. 27.** Maydonoz Örneğine Ait Kromatogram

Şekil 5.27 Maydonoz örneğine ait kromatogramda da görüldüğü gibi 4.0 ve 5.57 alıkonma sürelerine sahip karbendazim (1) ve klorpirifos (2) pestisitleri gözlenilmiş, optimum şartlarda eş zamanlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır.

Çalışılan taze sebze ve meyve örneklerinde elde edilen karbendazim ve klorpirifos pestisit miktarları Tablo 6.2’de verilmektedir. Karbendazim ve klorpirifosun gözlenebilme sınırları sırasıyla 0.073 ve 0.062 mgL<sup>-1</sup>’dir.

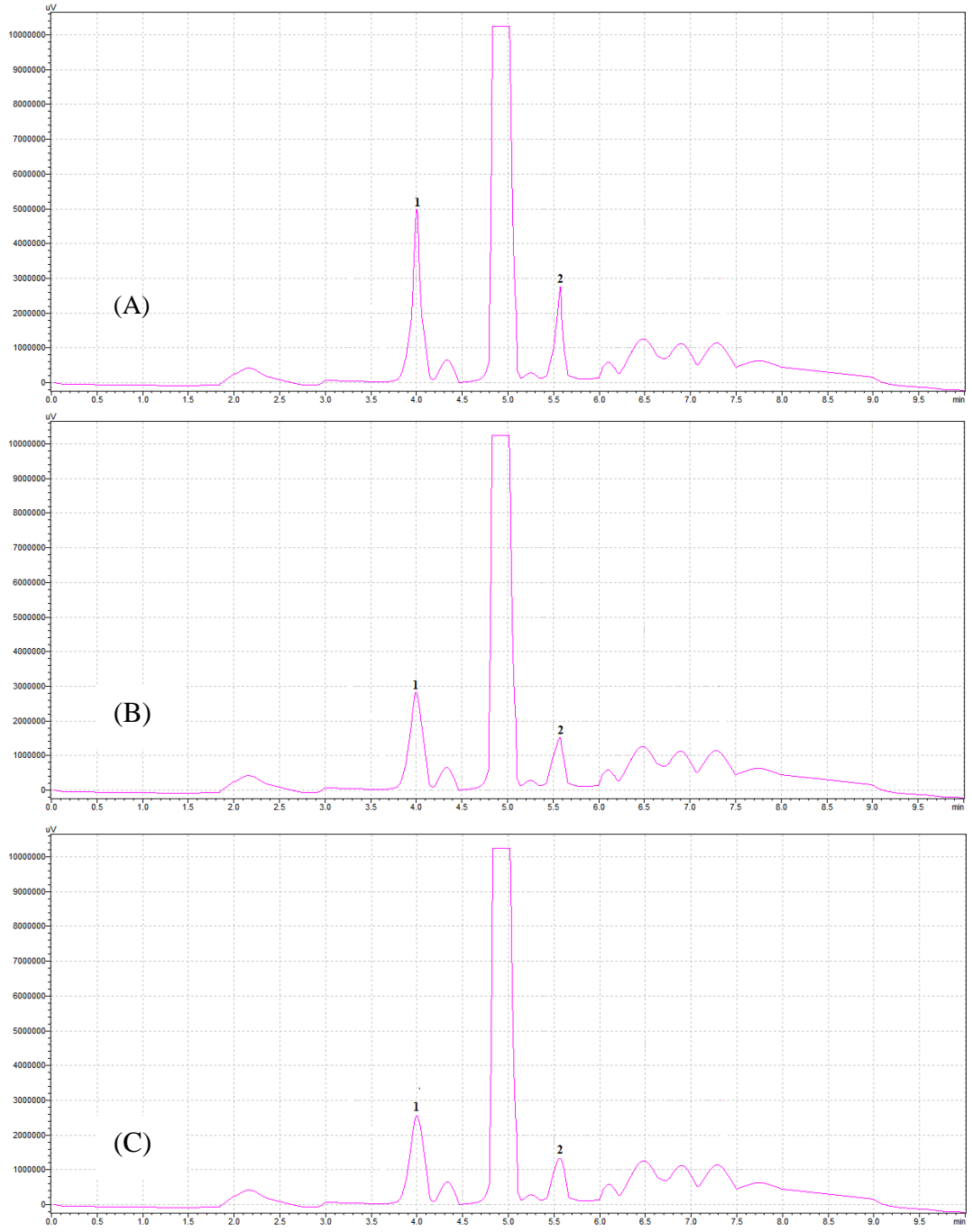
### 5.5. Kayseri İline ait Elma Örneği Ekstraksiyonuna Standart Çözelti Eklenmesi

Yapılan çalışmadaki ekstraksiyon etkinliğini değerlendirmek için standart çözelti ekleme yöntemi kullanıldı. Bunun için Kayseri iline ait elma örneği seçildi. Örnek yıkama işlemi uygulanmadan ekstraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakta gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanan 100 ppb ve 1000 ppb derişimlerinde karbendazim ve klorpirifos standart çözeltileri eklendi. Her bir ekleme çalışması 12 kez tekrar edildi. Elde edilen veriler Şekil 5.28 ve Tablo 5.12’de görülmektedir.

**Tablo 5.12.** Kayseri’den Alınan Elma Örneğinde Geri Kazanım Çalışması ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n=12$ ).

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Eklenen ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	Bulunan $\pm$ SD ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	Geri Kazanım %
Karbendazim	0	490.77 $\pm$ 1.64	-
	100	574.97 $\pm$ 1.67	84.20
	1000	1555.77 $\pm$ 4.94	106.50
Klorpirifos	0	3470.74 $\pm$ 4.62	-
	100	3561.04 $\pm$ 5.33	90.30
	1000	4328.18 $\pm$ 6.42	85.74

Karbendazim ve klorpirifosun ortalama geri kazanım aralığı sırasıyla % 84.2-106.5 ve % 90.3-85.7 olarak saptandı.



**Şekil 5.28.** Kayseri'den Alınan Elma Örneği Ekstarksiyonuna Ait Kromatogram (C), 100 ppb Karbendazim (1) Ve Klorpirifos (2) Eklenmiş Hali (B), 1000 ppb Karbendazim ve Klorpirifos Eklenmiş Hali (A)

## 6. SONUÇ VE YORUM

Bu çalışmada karbendazim (mantar ilacı) ve klorpirifos'un (böcek ilacı) tayini için floresans dedektör (RP-HPLC-FD) ile yüksek basınçlı sıvı kromatografik metod geliştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda MeOH:H<sub>2</sub>O karışımının mobil faz olarak kullanılması kararlaştırıldı. Kromatogramlar için optimum şartlar Tablo 6.1 'de gösterilmektedir.

**Tablo 6.1.** Geliştirilen Yöntem İçin Optimum Parametreler

Parametreler	
Mobil faz	metanol:su, 98:2, v/v
Dalga boyu	$\lambda_{Ex}$ ve $\lambda_{Em}$ , sırasıyla 280 ve 340 nm
Akış hızı	0.8 mL.dk <sup>-1</sup>
Kolon Sıcaklığı	40°C

Belirlenen optimum şartlarda karbendazim ve klorpirifos pestisitleri sırasıyla  $3.98 \pm 0.01$ ,  $5.56 \pm 0.01$  alıkonma zamanlarında 8 dakikadan az bir sürede eş zamanlı (simültane) olarak birbirlerinden ayrılmaktadır.

Mobil faz seçimi için iki farklı (ACN;H<sub>2</sub>O ve MeOH;H<sub>2</sub>O) mobil faz karışımı denendi ve MeOH;H<sub>2</sub>O karışımı mobil faz olarak seçildi.

Mobil faz akış hızı; 0.2 – 2.0 mL.dk<sup>-1</sup> aralığı 0.2 mL arttırılarak çalışıldı ve 0.8 mL.dk<sup>-1</sup> mobil faz akış hızı olarak belirlendi.

Kolon sıcaklığının belirlenmesi için 20 – 50°C'de çalışıldı ve 40°C kolon sıcaklığı olarak belirlendi.

Kalibrasyon grafikleri; karbendazim ve klorpirifos çözeltileri için 5 farklı konsantrasyonda çalışılarak belirlendi. Her bir standart pestisit çözeltisi üç kez tekrar edildi. Her bir pestisit kalibrasyon grafiği konsantrasyona karşı pik alanı olarak

grafiğe geçirildi. Pestisitler için çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 5.14,15'da verilmektedir.

Karbendazim ve klorpirifosun dinamik aralığı 0.100-100 mg.L<sup>-1</sup> arasında, bağıl standart sapması % 0.45'den (n=4) daha az, gözlenebilme sınırları sırasıyla 0.073 ve 0.062 mg.L<sup>-1</sup>'dir (Tablo 6.2).

**Tablo 6.2.** Karbendazim ve Klorpirifosa Ait Analitik Veriler

Analit	t <sub>R</sub>	RSD (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
<b>Karbendazim</b>	3.98 ± 0.01	0.45	0.073	0.222
<b>Klorpirifos</b>	5.56 ± 0.01	0.43	0.062	0.187

t<sub>R</sub>: Alıkonma zamanı

Yozgat ve Kayseri'de farklı tarım alanlarından toplanan ve çalışılan elma, greyfurt, mandalina, ıspanak ve maydanoz örneklerine ait analiz sonuçları Tablo 6.3.'de verilmektedir.

**Tablo 6.3.** Kayseri ve Yozgat İllerinde Farklı Tarım Alanlarından Toplanan Taze Meyve Ve Sebze Örneklerinde Karbendazim ve Klorpyrifos Kalıntılarının (µg / Kg) Konsantrasyon Verileri.

Analit (µg/kg)	Kayseri'den Alınan Elma	Yozgat'tan Alınan Elma	Greyfurt	Mandalina	Ispanak	Maydanoz
<b>Karbendazim</b>	474 ± 1	-	-	1964 ± 44	-	3071 ± 56
<b>Klorpyrifos</b>	3593 ± 31	4603 ± 79	1828 ± 16	1359 ± 12	5638 ± 51	1364 ± 20

Avrupa Birliği (AB) direktifleri ve Türkiye’de kabul edilen pestisit kullanım oranları dikkate alındığında sebze ve meyvelerde izin verilen maksimum kalıntı miktarları klorpirifos için 0,5 mg.kg<sup>-1</sup>, karbendazim için 2,0 mg.kg<sup>-1</sup>’dir [23.30]. Karbendazim; ağız yoluyla alındığında LD<sub>50</sub> değeri (tavşanlarda) > 15,000mg/kg, deri yoluyla alındığında (tavşanlarda) > 2,000mg/kg, değerlerinde toksiktir [60]. Klorpirifos; tavşanlarda ağız yoluyla alındığında LD<sub>50</sub> değeri 1000 ile 2000 mg / kg arasında, tavuklarda ağız yoluyla alındığında 32-102 mg / kg arasında toksiktir[61].

Toplanan 6 örnekte kloroprifos kalıntısının kabul edilebilen konsantrasyon sınırlarını aştığı, maydonoz hariç diğer örneklerde ise karbendazim kalıntısının izin verilen sınırlar içinde olduğu görüldü. Klorpirifos kalıntısının kirlilik seviyesi AB direktiflerine ve Türkiye’ye göre sınır değerlerinin üzerinde olduğu görüldü.

Kayseri iline ait elma örneğinde ekstraksiyon, yıkama, kabuk soyma ve geri kazanım işlemleri sonucunda elde edilen veriler sırasıyla Tablo 6.4,5’de verilmektedir. Yıkama işlemi sonrası elma ekstraktına ait kromatogram tezin deneysel bölümünde Tablo 5.22’de verilmektedir.

**Tablo 6.4.** Kayseri’den Alınan Elma Örneklerinde Yıkama Sonrası Analiz Sunuçları  
(µg/kg)

Su ile Yıkama Sonrası Analizleri (n=4)				
Analit (µg/kg)	Yıkama öncesi ekstraksiyon verileri	500mL su ile yıkama sonrası	1000mL su ile yıkama sonrası	2000mLile yıkama sonrası
<i>Karbendazim</i>	473 ± 5	362 ± 9	149 ± 5	-
<i>Klorpirifos</i>	3709 ± 79	3387 ± 3	1702 ± 10	968 ± 7

Tablo 6.4’de ki verilerde Kayseri’den alınan elma örneğinde karbendazimin kabul edilen sınırlar arasında olduğu ve 2000 mL su ile yıkama işleminden sonra uzaklaştığı, klorpirifosun ise kabul edilen sınırları aştığı ve 2000 mL su ile yıkama işleminden sonra bile uzaklaştırılmadığı görüldü.

Pestisit kalıntısının örnek yüzeyindeki değerlerinde klorpirifostan kurtulamadığı görüldü. Devamında elma kabuğu ve elma iç kısmında pestisit analizleri yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları Tablo 6.5’de verilmektedir.

**Tablo 6.5.** Kayseri’den Alınan Elma Kabuk ve Elma İçi Örneklerinde Analiz Sonuçları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

<b>Meyva Kabuğunda Analizler (n_4)</b>		
<b>Analit (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Elma kabuğu</b>	<b>Elma içi</b>
<b><i>Karbendazim</i></b>	451 $\pm$ 5	-
<b><i>Klorpirifos</i></b>	2288 $\pm$ 21	1073 $\pm$ 12

Tablo 6.5’de ki verilerde elma kabuğunda karbendazimin kabul edilebilen sınırlar arasında olduğu ve kabuğun soyulması ile iç kısmında gözlenebilen bir değerde olmadığı görüldü. Klorpirifosun ise elma kabuğunda kabul edilebilen sınırları aştığı ve kabuğun soyulması ile uzaklaşmadığı, elmanın iç kısmına dahi işlediği görüldü.

Klorpirifos yaygın kullanılan böcek ilaçlarından olması dolayısıyla pek çok sebze ve meyvede pestisit kalıntısı olarak kirlilik meydana getirmektedir. Yıkama işlemleri ile tamamen uzaklaştırılmadığı gibi meyve-sebze iç kısımlarına da nüfuz ederek sağlık açısından risk oluşturmaktadır.

Karbendazim ve klorpirifosun geri kazanımı için Kayseri elma örneği yıkama işlemi uygulanmadan ekstaraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakta gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanan 100 ppb ve 1000 ppb derişimlerinde karbendazim ve klorpirifos standart çözeltileri eklendi. Her bir ekleme çalışması 12 kez tekrar edildi. Karbendazim ve klorpirifosun ortalama geri kazanım aralığı sırasıyla % 84.2-106.5 ve % 90.3-85.7 olarak saptandı (Tablo 5.12).

Çözelti sarfiyatının az, çevreyi kirletme faktörünün düşük olduğu ve HPLC kullanımı ile analiz kolaylığının sağlandığı görülmüştür. Bu çalışma eser miktardaki karbendazim ve klorpirifos’un simültane tayini için RP-HPLC-FD kullanılarak sebze ve meyvelerde düşük LOD ve LOQ ile kısa zamanlı (8 dakikadan az) analiz olarak ilk çalışma olmuştur.



## KAYNAKLAR

1. Akdoğan, A., Bazı Pestisitlerin Kromatografik Ayrılmaları Ve Tayinleri, Doktora Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2011.
2. Sanz, P. C., Halko, R., Ferrera, S. Z., and Santana-Rodrigues, J. J., Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples, *Journal of Chromatography A*, 1078, 13-21, 2005.
3. Acero, L. J. Benitez, J. F., Real, J. F., and Gonzales, M., Chlorination of organophosphorus pesticides in natural waters, *Journal of Hazardous Materials*, 153 (1-2), 320-328, 2007.
4. Yiğit, N., Bazı Meyve Ve Sebzelerde Pestisit Kalıntılarının Analizinde Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Çoklu Kalıntı Analiz Metodunun Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.
5. Özmen, Y., Aygören, E., Dursun H. Y., Karaca, S., Kismir, A. ve Türkmen, Z., (2006), İSO Dokuzuncu Kalkınma Planı, Tarım İlaçları Çalışma Grubu Raporu, Ankara, 2007-2013.
6. Çeşmeli, Ç., Sentetik Kaynaklı Aktif Karbon ile Pestisit Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011.
7. Delaplane, K., S., 'Pesticide usage in the United States: Benefits, Risks and Trends', Cooperative Extension Service, The University of Georgia, Athens, Georgia, 1996.
8. Yücel, Ü., Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri, Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ders notları, Ankara, 2007.
9. Güvensoy, G., Fate of Pesticides on Soil and Their Impact on Water Environment, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 2000.
10. Cook, J. L., Baumann, P., Jackman, A. J. and Stevenson, D., Pesticide Characteristics that Affect Water Quality, Texas University- Texas Agricultural Extension Service, USA,(URL: [www.co.denton.tx.us/dept/aes.htm](http://www.co.denton.tx.us/dept/aes.htm)), 1993.
11. <http://www.isguvenligi.net/yararli-bilgiler/pestisitlerin-saglik-etkileri/> , 2014.
12. Kiziewicz, B., and Czezuga, B.,: Bioaccumulation of organochlorine pesticides in the trophic chain alga-freshwater fish, *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 32(1), 41-51, 2002.

13. Ögüt, S., Isparta Yöresinde Kullanılan Bazı Pestisitlerin Elma-Kirazlardaki Pestisit Kalıntıları ve Bu Ürünlerin Tarımında Çalışan Tarım İşçilerinin Kan Parametrelerinde Etkilerin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2012.
14. Watson H. D. Food Chemical Safety, Volume 1: Contaminants, First Edition, CRC Press LLC, New York, NY, USA, 2001.
15. Yu, L. Y., Wu, M. X., Li, N. S., Fang, H., Zhan, Y. H., and Yu, Q. J., An exploration of the relationship between adsorption and bioavailability of pesticides in soil to earthworm, *Environmental Pollution*, 141, 428-433, 2006.
16. Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., and Bollinger, J.,: Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects, *Environment International*, 36,138–151, 2010.
17. Tankiewicz, M., Fenik, J., and Biziuk, M., Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1050-1063, 2010.
18. Sağlam, H., Melen Havzasında Pestisit Uygulamaları Ve Pestisitlerin Biyolojik Bozunma, Yüzeysel Akış ve Sızma Yüzdelerinin Tahmini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2008.
19. Gürcan, T., Tarımsal İlaç Kalıntıları ve Önemi, *Dünya Gıda Dergisi*, Mayıs, 67-72, 2001.
20. Williams, P.L., James, R.C., Roberts, S.M., *Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications*. Second ed., A Wiley-Interscience Publication, U.S.A, 345–366, 2000.
21. Prakasam, A., Sethupathy, S., Lalitha, S., Plasma ans RBCs antiooxidant status in occupational male pesticide sprayers, *Clinia Chimca Acta*, 310, 107-112, 2001.
22. Ögüt, S., Küçüköner, E., Isparta ve Çevresinde Tarımsal Üretiminde Kullanılan Önemli Tarım İlaçları (Pestisitler). 10. Gıda kongresi, Kongre Kitapçığı, 369, Erzurum. 2008.
23. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Kayıtları, Ankara, 2000.
24. Öden, T., Şentürk, İ., Genç B., Memleketimizde mikrobioassay ile kirazlarda DDT tayini üzerinde bir çalışma. *Bitki Koruma Bülteni*, 1(1), 17–19, 1959.
25. Albero, B., Sánchez, B,C., Tadeo, J. L., Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid – phase dispersion and gas chromatography. *Journal Chromatography A*, 1007, 137–143, 2003.

26. Neely, B.W., Introduction to Chemical Exposure and Risk Assessment. CRC Press. Boca Raton. FL., 1994.
27. Çiftçi, H., Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Ek-17, [http://www.kkgm.gov.tr/TGK/ekler/Gida\\_Kodex\\_ek17.htm](http://www.kkgm.gov.tr/TGK/ekler/Gida_Kodex_ek17.htm) , 2007.
28. Tatlı, Ö., Ege Bölgesine Özgü Bazı Yaş Meyve, Sebze ve Kurutulmuş Gıda Ürünlerinde Pestisit Kalıntı Düzeylerinin Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2006.
29. Durmuşoğlu, E., Tirkaki, O. ve Canhilal, R., ‘Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları’, TMMOB-Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara, Bildiriler Kitabı-2, 589-607, 2010.
30. Tarım ilaçları (Pestisit)’ nın Kalıntıları ve Çevreye Olan Etkileri [www.tarim.gov.tr](http://www.tarim.gov.tr) , 2014.
31. Çatalgöl, S., Benzimidazol Grubu Pestisidlerden Benomyl Ve Carbendazimin Lipid Peroksidasyonu Ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , İstanbul, 2008.
32. Uygun, Z.O., Organofosfat Türü Pestisitlerin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Temelli Sensör Geliştirilmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale , 2012.
33. Skoog D., Holler J., Nieman T., Enstrümantel Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, s; 498-531, 702-716, Ankara, 1998.
34. Johnson E.L.,StevensonR.,Basic Liquid Chromatography; Varian Associates Palo Alto, CA, s; 1-6, 2008.
35. Salkım D., Fluoksetin ve Metaboliti Norculu oksetinin GC-MS Yöntemiyle Biyolojik Materyallerden Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2008.
36. Gündüz T., Enstrümantel Analiz, 7. Baskı, s; 1115-1119, 1177-1190, Gazi Kitabevi, Ankara, 2004.
37. Karaköse A., Piyasada Bulunan Bebek Gıdalarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi (YPSK) ile Patulin Tayini, Hitit Üniversitesi, Çorum, 2012.
38. Porgalı, E., Bazı Fenolik Bileşiklerin HPLC Tekniğiyle Yöresel Kırmızı Şaraplarda Tayin Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Malatya, 2011.
39. Kaya, A., Beyaz, Sarı Ve Kırmızı Soğanda Çeşitli Organik Asitlerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Yozgat, 2010.

40. Mavi, E., E., Bazı Antidepresanların Vücut Sıvılarında Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini İçin Metot Optimizasyonu, Doktora Tezi, Isparta, 2013.
41. Doğan, B., Türkiye Çift Kabuklu Yum Akçalarının Diyaretik Çift Kabuklu Toksinlerinin (DSP) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Florimetrik Sistemde (HPLC/FLD) Analizi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2009.
42. Kafalı, H., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Hplc) Kolon Sonrası Türevlendirme İle 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2008.
43. Hamilton R.J., Sewell PA. Introductionto High Performance Liquid Chromatography, 2. Baskı, New York: Chapmanand Hall Ltd, 1982.
44. Bidlingmeyer BA., Practical HPLC Methodologyand Applications, 1. Baskı, New York: Wiley-Interscience Publication, 1992.
45. Torul. H., Farmasötik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC İle Enantiyomer Tayinleri, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009.
46. Riley C.M., Rosanske T.W., Development and Validation of Analytical Methods, Elsevier Science Ltd., New York.
47. Swartz M.E., Krull, Analytical Method Developmenetand Validation, Morcel Dekker, 1.S., New York, 1997.
48. The United States Pharmacopoeia, 24 thEd, (CD-ROM), 2000.
49. Adamovics J. A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997.
50. Mavi E.E., Bazı Antidepresanların Vücut Sıvılarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini İçin Metot Optimizasyonu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, Isparta, 2013.
51. Kutucu T., Telmisartan ve Hidroklorodiazit'in YPSK Yöntemleri ile Aynı Anda Analizi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2008.
52. Asensio-Ramos, M., Hernandez-Borges, J., Borges-Miquel, T.M. & Rodriguez-Delgado, M.A., Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. Journal of Chromatography A, 1218, 4808–4816, 2011.
53. Le Han, X., Tian, F.F., Ge, Y.S., Jiang, F.L., Lai, L., Li, D.W., Yu, Q.L., Wang, J., Lin, C. & Liu, Y., Spectroscopic, structural and thermodynamic

properties of chlorpyrifos bound to serum albumin: A comparative study between BSA and HSA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 109, 1–11, 2012.

54. Saad, B., Haniffa, N.H., Saleha, M.I., Hashimb, N.H., Abub, A. & Ali, N., Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Food Chemistry*, 84, 313–317, 2004.
55. Pere-Trepat, E. & Tauler, R., Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography–diode array detection mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*, 1131, 85–96, 2006.
56. Venkateswarlu, P., Rama Mohan, K., Ravi Kumar, C.H. & Sessaiah, K., Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Food Chemistry*, 105, 1760–1766, 2007.
57. Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A. & Fuerhacker, M., Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Journal of Talanta*, 75, 284–293, 2008.
58. Islam, S., Afrin, N., Hossain, M. S., Nahar, N., Mosihuzzaman M. & Mamun, M.I.R. Analysis of some pesticide residues in cauliflower by high performance liquid chromatography. *American Journal of Environmental Sciences*, 5(3), 325-329, 2009.
59. Sungur, Ş. & Tunur, Ç. Investigation of pesticide residues in vegetables and fruits grown in various regions of Hatay, Turkey. *Journal of Food Additives and Contaminants*, 265–267, 2012.
60. Karbendazimin kimyasal özellikleri;  
<http://superway.com.au/MSD/MSDS%20Superway%20Carbendazim%20500%20Systemic%20fungicide..pdf> , 2014.
61. Klorpirifosun kimyasal özellikleri;  
<http://npic.orst.edu/factsheets/chlorptech.pdf> , 2014.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğan Yasemin TURHAN, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Ahmet Hamdi Tanpınar İlköğretim Okulu, Gürlek & Nakipoğlu Lisesinde tamamlamıştır. 2005 yılında kazandığı Süleyman Demirel Üniversitesi Şarkikaraağaç Meslek Yüksek Okulu Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümünü 2007 yılında başarıyla bitirmiştir. 2008 yılında Dikey Geçiş Sınavı ile Bozok Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne geçiş hakkı kazanmış ve 2011 yılında başarı ile mezun olmuştur.

2012 yılında yüksek lisans eğitimine Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başlamıştır. Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER danışmanlığında hazırladığı “Karbendazim ve Klorpirifos’un Meyve ve Sebze Örneklerinde HPLC/FD İle Eş Zamanlı Tayini” başlıklı teziyle 2014 yılında yüksek lisans çalışmasını tamamlamıştır.

### **İletişim Bilgileri**

Adres: Oruç Reis Mah. 564 Sok. NO:6 D:2 Esenler/ İSTANBUL

Telefon: (0543) 490 84 56

E-posta: yasminturhan@gmail.com