



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DİFENİL ETER GRUBU HERBİSİTLERİN BİYOLOJİK
NUMUNELERDEN TAYİNİNE YÖNELİK SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE
PESTİSİT-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hilal SAPMAZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ ECZACILIK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİFENİL ETER GRUBU HERBİSİTLERİN BİYOLOJİK NUMUNELERDEN
TAYİNİNE YÖNELİK SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE PESTİSİT-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hilal SAPMAZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ ECZACILIK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayarak sunduğum "Difenil Eter Grubu Herbisitlerin Biyolojik Numunelerden Tayinine Yönelik Sıvı Kromatografisi Yöntemi Geliştirilmesi ve Pestisit-Protein Etkileşimlerinin İncelenmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve etik değerlere uygun şekilde tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tamamıyla tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tez içerisindeki tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı : Hilal SAPMAZ

Tarih : 23.01.2023

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Adli Eczacılık Anabilim Dalında Hilal SAPMAZ tarafından hazırlanan “DİFENİL ETER GRUBU HERBİSİTLERİN BİYOLOJİK NUMUNELERDEN TAYİNİNE YÖNELİK SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE PESTİSİT-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/01/2023

İmza
Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN
Hacettepe Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitlerin Tanımı	1
1.2. Pestisitlerin Tarihçesi	2
1.3. Pestisitlerin Fiziko-Kimyasal Özellikleri	3
1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması	5
1.4.1. Herbisitler	6
1.4.1.1. Difenileterler	6
1.4.2. Herbisitlerin Çevrede Kalıntı Süresi ve Parçalanması	7
1.5. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri	8
1.6. Pestisitlerin Metabolizması	10
1.7. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Toksisitesi	11
1.8. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisit Maddelerine Ait Bilgiler	12
1.8.1. Aklonifen'in Özellikleri	13
1.8.2. Bifenoks'un Özellikleri	13
1.9. Literatür İncelemesi	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Tez Çalışmasına Kullanılan Pestisitler	16
2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	16
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Aklonifen ve Bifenoks'un Eş Zamanlı Analizi	17
2.2.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	17
2.2.2. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	18
2.2.2.1. İdrar Numunelerinin Hazırlanması	18
2.2.2.2. Serum Numunelerinin Hazırlanması	18
2.2.3. Yöntem	19
2.2.3.1. Kromatografik yöntemler	19
2.2.3.1.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	20
2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri	22
2.2.5. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlilik Testleri ve Validasyon Parametreleri	25
2.2.5.1. Seçicilik	25
2.2.5.2. Doğrusallık ve aralık	26
2.2.5.3. Teşhis sınırı (TS, LOD) ve tayin alt sınırı	27
2.2.5.4. Kesinlik	28
2.2.5.5. Doğruluk	28
	iv

2.2.5.6. Sağlamlık	29
2.2.5.7. Tutarlılık	29
2.2.5.8. Stabilité	29
2.3. Numuneyi Analize Hazırlama-Ekstraksiyon Teknikleri	29
2.3.1. Seyrelt ve Enjekte Et Yöntemi (Dilute And Shoot)	30
2.4. Spektroskopik Yöntemler ile Pestisit- HSA Etkileşiminin İncelenmesi	33
2.4.1. Floresans Spektrofotometrisi	33
2.4.2. HSA Özellikleri ve Ligantlara Bağlanabilirliği	34
2.4.3. ACF ve BİF'un HSA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi için Deneysel Çalışmalar	37
3. BULGULAR	39
3.1. Aklonifen ve Bifenoks Pestisitleri için Geliştirilen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UV Yöntemine Ait Analiz Bulguları	39
3.1.1. Yöntemin Optimizasyonu	39
3.1.1.1. Dalga boyu optimizasyonu	39
3.1.1.2. Hareketli fazda organik çözücü ve tampon çözeltinin yüzdelerinin belirlenmesi	40
3.1.1.3. Organik çözücü denemesi	41
3.1.1.4. Farklı tampon çözeltilerin analizleri	42
3.1.1.5. Akış hızı optimizasyonu	43
3.1.1.6. Kolon sıcaklığının belirlenmesi	44
3.1.1.7. Tampon çözeltinin pH'sını belirleme çalışmaları	45
3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları	47
3.1.3. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	47
3.1.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar	52
3.2. Aklonifen ve Bifenoks Pestisitlerinin HSA ile Olan Etkileşimlerini İncelemek İçin Kullanılan Spektroskopik Yöntemlere Ait Bulgular	53
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
ÖZET	71
SUMMARY	72
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	80

ÖNSÖZ

Pestisitlerin modern tarım yapılırken fazla miktarda kullanımı birçok dezavantajın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Pestisitlerin zararlı etkilerinin tam olarak bilinmemesi ve buna bağlı olarak gerekli önlemler alınmadan pestisitlerin kullanımı ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Pestisitlerin insanlara toksik etkilerinin yanı sıra bazılarının kansere neden olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır.

Bu tez kapsamında Difenileter grubu herbisitlerden Aklonifen ve Bifenoks'un sentetik serum ve idrar örneklerinden eş zamanlı analizi için ekonomik, çevreci, hızlı, kolay uygulanabilen, yüksek duyarlılık, doğru ve kesin sonuçlar veren valide edilmiş bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. En uygun analiz koşullarının belirlenmesi için, sabit faz, hareketli faz bileşimleri, farklı derişimlerde tampon çözelti, sıcaklık ve akış hızı denemeleri yapılarak yöntem optimize edilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesinden sonra doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı gibi validasyon karakteristikleri belirlenerek yöntem valide edilmiştir.

Proteinlere bağlanma, pestisitlerin dağılım metabolizmasını ve atılımını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu kapsamda Aklonifen ve Bifenoks'un insan serum albümini ile etkileşimleri yüksek duyarlılık, yüksek seçicilik ve kolay kullanım gibi birçok avantajı nedeniyle, spektroskopik yöntemler ile incelenmiştir. Bu amaçla, Aklonifen ve Bifenoks'un insan serum albüminine affinitesi belirlenmiştir ve etkileşim termodinamiği kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

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

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan, manevi desteğini hiç esirgemeyen sayın Dr. Cem ERKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımnda bana destek olan, bilgi birikimini benimle paylaşan araştırma grubumuzun çok değerli üyesi Dr. Md. Zahirul KABİR'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımna sağladıkları desteklerden dolayı Prof. Dr. Saharuddin B. MOHAMAD'e ve M.Sc. Hafsa TAYYAB'a katkıları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı öncelikle eğitim hayatımdaki ilk öğretmenim olan bana bilginin değerini öğreten annem Suna SAVUT'a, kız kardeşim Seyyide SAPMAZ'a ve sevgili aileme minnettarlığımı sunarım.



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım (Acceptable Daily İntake)
A_{em}	Emisyon Uyarılması Dalga Boyu
A_{ex}	Absorbans Uyarılması Dalga Boyu
BİF	Bifenoks
BSA	Sığır Serum Albumini
BSS	Bağıl Standart Sapma
DDT	Diklorodifeniltri-kloroetan
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EPA	Amerika Çevre Koruma Dairesi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
F_{corr}	Düzeltilmiş Floresans Yoğunluğu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
F_{obs}	Gözlenmiş Floresans Yoğunluğu
GK	Gaz Kromatografisi
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon-s-Transferaz
HSA	İnsan Serum Albumini
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
k	Kapasite Faktörü
K_f	Bağlanma Sabiti
K_H	Henry Yasası Sabiti
K_q	Sönümlenme Oranı Sabiti
K_{sv}	Sönümlenme Sabiti
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
m	Eğim
MRL	Maksimum Kalıntı Seviyesi

n	Kesişim
N	Teorik Tabaka Sayısı
P_v	Buhar Basıncı
QSAR	Kantitatif Yapı-aktivite İlişkileri
R	Korelasyon Katsayısı
R_s	Ayırım Gücü
SK	Sıvı Kromatografisi
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
t	Kuyruklanma Faktörü
t_0	Ölü Hacim
t_R	Alıkonma Zamanı
UDP	Udp-glukuronil Transferaz
USP	Amerikan Farmakopesi
YPBSK	Yüksek Başarımlı Performanslı Sıvı Kromatografisi
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
α	Seçicilik Faktörü
ΔG	Gibbs Serbest Enerji Değişimi
ΔH	Entalpi
ΔS	Entropi
ACF	Aklonifen

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Pestisitlerin metabolizasyon şeması	11
Şekil 1.2. Aklonifen'in kimyasal yapısı	13
Şekil 1.3. BİF'un kimyasal yapısı	14
Şekil 2.1. Seyrelt ve enjekte et yöntemi	32
Şekil 2.2. Spektroflorometre genel yapısı	34
Şekil 2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteinin yapısı	36
Şekil 3.1. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6.8, hareketli faz: ACN (80/20; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, 300 nm, 290 nm, 280 nm	40
Şekil 3.2. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6.8, dalga boyu: 305 nm, hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum asetat çözücülerinin (90/10; h/h), (85/15; h/h), (80/20; h/h), (75/25; h/h), (65/35; h/h) oranlarında kullanılması ile yapılmış analiz sonucunda pestisit maddelerine ait elde edilen kromatogramlar. (İlk kromatogram ACF'ye, ikincisi BİF'e aittir)	41
Şekil 3.3. MeOH (mavi) ve ACN (kırmızı) ile yapılmış organik çözücü çalışmasına ait kromatogram	42
Şekil 3.4. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6.8, dalga boyu: 305 nm, hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum asetat (75/25; h/h) (kırmızı) ve hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum format (75/25; h/h) (mavi) tampon çözücülerini ile yapılmış analizler sonucunda pestisit maddelerine ait elde edilen kromatogramlar	43
Şekil 3.5. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, pH: 6.8, hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, akış hızı (sağdan sola sırasıyla) 0,8 mL/dk, 1 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,4 mL/dk ile yapılan analizlere ait kromatogramlar. (İlk kromatogram piki Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir)	44

Şekil 3.6. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, akış hızı 1,2 mL/dk, pH: 6,8, hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, sıcaklık sırasıyla (sağdan sola) 45 °C, 35 °C, 25 °C ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar. (İlk kromatogram Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir)	45
Şekil 3.7. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, akış hızı 1,2 mL/dk,, hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, sıcaklık 25 °C, pH: 8,8, pH: 6,8, pH: 5,0 ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar. (İlk kromatogram piki Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir)	46
Şekil 3.8. Optimum koşullarda bulk çözücü ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,001 ppm, 0,0025 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm artan derişimlerde)	48
Şekil 3.9. Optimum koşullarda idrar numunesi ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,001 ppm, 0,0025 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm artan derişimlerde)	48
Şekil 3.10. Optimum koşullarda serum numunesi ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,001 ppm, 0,0025 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm artan derişimlerde)	49
Şekil 3.11. Çözücü (Bulk) validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks	50
Şekil 3.12. İdrar ortamının validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks	50
Şekil 3.13. Serum validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks	50
Şekil 3.14. Aklonifen için hızlandırılmış bozunma çalışmaları	52
Şekil 3.15. Bifenoks için hızlandırılmış bozunma çalışmaları	53
Şekil 3.16. HSA üzerine artan derişimlerde Aklonifen ve Bifenoks ilavesi sonucu gerçekleşen floresans sönümlenme sonuçları	54
Şekil 3.17. (A) Aklonifen–HSA ve (B) Bifenoks–HSA etkileşimleri olmak üzere dört farklı sıcaklıkta floresan sönümlenme titrasyonundan elde edilen Stern-Volmer grafikleri	56

Şekil 3.18. (A) Aklonifen–HSA ve (B) Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait 4 farklı sıcaklıktaki floresans sönümlenme titrasyonu ile gerçekleştirilen çalışmalara ait çift logaritmik grafikler 58

Şekil 3.19. (A) Aklonifen–HSA ve (B) Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait Van't Hoff çizelgeleri 60

Şekil 3.20. HSA'nın üzerine artan derişimlerde (A) Aklonifen ve (B) Bifenoks ilavesi sonucu (en üst spektrumdan alta doğru pestisit derişimi azalmaktadır.) UV–VİS absorpsiyonu. Deneysel koşullar: [HSA] = 2 mg ml⁻¹; [ACF] = 13 nM–7.2 µM; [BİF] = 9.7 nM–4.6 µM; λ_{ex} = 280 nm; tampon çözelti = PB 7.4; sıcaklık = 298 K 62



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Tez çalışmasına konu pestisitler hakkında yapılmış olan çalışmalar	15
Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan pestisitler	16
Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler	17
Çizelge 2.3. Sistem uygunluk testi parametreleri (Gebrehiwot, 2019)	23
Çizelge 2.4. Validasyon parametreleri (Gebrehiwot, 2019)	25
Çizelge 3.1. Sistem uygunluk testlerine göre dalga boyu optimizasyonunun karşılaştırılması	40
Çizelge 3.2. SUT parametrelerine göre tampon çözelti molaritesinin kıyaslanması	41
Çizelge 3.3. Organik çözücü denemeleri	42
Çizelge 3.4. Farklı tampon çözelti analizlerine ait sonuçlar	43
Çizelge 3.5. SUT parametrelerine göre akış hızının kıyaslanması	44
Çizelge 3.6. SUT parametrelerine göre kolon sıcaklığının kıyaslanması	45
Çizelge 3.7. SUT parametrelerine göre tampon çözelti pH'sının kıyaslanması	46
Çizelge 3.8. Pestisitlerin eş zamanlı analizi için optimize edilmiş kromatografik şartlar	46
Çizelge 3.9. SUT parametreleri	47
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan çözücü, idrar ve serum örneklerinde validasyon parametreleri	49
Çizelge 3.11. Serum için geri kazanımlar	51
Çizelge 3.12. İdrar için geri kazanımlar	51
Çizelge 3.13. Aklonifen ve Bifenoks'un HSA ile olan etkileşimlerine ait K_{sv} değerleri	57
Çizelge 3.14. Aklonifen–HSA ve Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait pH 7.4'te 4 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmalara ait bağlanma sabitlerine ait değerler	59
Çizelge 3.15. Aklonifen–HSA ve Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait pH 7.4'te 4 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmalara ait termodinamik parametreler	61

1. GİRİŞ

1.1. Pestisitlerin Tanımı

Pestisitler Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından istenmeyen zararlıları öldürmek için kullanılan kimyasal bileşikler olarak tanımlanmış olup; Akarisitler, İnsektisitler, Herbisitler, Fungusitler, Rodendisitler, Bakterisitler gibi sınıflar şeklinde sıralanmaktadır (Kınacı, 2019).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) pestisit tanımında; “İnsan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması ve/veya pazarlanması sırasında bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlıın önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddelerdir. Bu tanım, ayrıca bitki büyümesini düzenleyici, yaprak dökücü, kurutucu veya meyve seyreltici veya ham meyvelerin dökülmesini önleyici etkenleri ve depolanma ve taşıma sırasında ticari malların bozulmasını önlemek amacıyla hasat öncesi ve sonrası ürüne uygulanan maddeleri de kapsamaktadır.” olarak ifade edilmiştir (Kınacı, 2019).

Gelişmiş sayılmayan bazı ülkelerde yetersiz ve/veya sağlıksız besinlerin bilinçsizce tüketimi, dünya popülasyonunun hızlı artması ve tüketilebilir kaynakların sabit kalmaya devamı sonucu oluşan besin yetersizliğini önlemek için günümüzde pestisit kullanımı yaygınlaşmıştır (Kınacı, 2019).

Pestisit kullanımının yaygınlaşması sonucu ülkeler kapsamında pestisit kullanımının kontrol altında tutulabilmesi için yasalarla çeşitli düzenlemeler (pestisitlerin ruhsatlandırılması, pestisitlerin imhası, pestisitlerin nakliyesi vd.) getirilmiştir. Dünyada pestisit kullanımını düzenleyen kuruluşlara Birleşmiş Milletler Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Amerika Çevre Koruma Dairesi

(U.S. Environmental Protection Agency, EPA) gibi kuruluşlar örnek verilmektedir (Kınacı, 2019).

Ülkemizde pestisit kullanımı bazı yasa ve yönetmeliklerle yürütülmektedir. Pestisit kullanımının yasal sınırları Bitki Koruma Ürünleri Kontrol Yönetmeliği, Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Yönetmelik, Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği, Bitki Ürünlerinin Önerilmesi, Uygulanması ve Kayıt İşlemleri Hakkında Yönetmelikleri ile belirlenmiştir (Kınacı, 2019).

1.2. Pestisitlerin Tarihçesi

Elementel kükürt 4500 yıl önce Sümerler tarafından kullanılmış olup bilinen ilk pestisittir. Bilinen bir diğer pestisit kullanımı ise M.Ö. 200 yıllarında Cato üzüm bağlarında kükürt dumanının kullanımınıdır. Cıva, kurşun ve arsenik ise ekinlerdeki zararlı organizmaları ortadan kaldırmak amacıyla 15. yy'a kadar kullanılmıştır. 17. yy süresince tütün yaprağından özütlenen 4 nikotin sülfat insektisit olarak kullanılmıştır. 19. yy'da bitkilerin köklerinden doğal pestisitler olarak adlandırılan piretrum ve rotenon pestisitleri üretilmiştir. 1875 yılında Almanya'da Zeidler diklorodifeniltrikloroetani (DDT) bulmuştur, bu bileşiğin pestisit özelliğini ise İsviçreli kimyacı Paul Mueller 1939 yılında belirlemiştir. 1940'larda yapay pestisitlerin üretimi başlamıştır ve yaygın olarak kullanılmıştır. 1942'de DDT'nin piyasaya çıkması sonrası kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. (Çakmak, 2013).

1948-1951 tarihleri arasında yapılan çalışmalarda insan vücudunda ilk kez organik klorlu pestisit kalıntılarına rastlanmıştır (Kınacı, 2019).

DDT metabolizasyon aşamasında yavaş bir biçimde parçalanmaktadır. Bu durum sonucunda yaşayan organizmaların vücudunda birikim gerçekleşmekte ve söz konusu bileşik gıda zincirine geçmektedir. Bu sebeple 1979'lu yıllarda bileşiğin kullanımı yasaklanmıştır (Çakmak, 2013).

Tarihte bir başka pestisit kullanımı ise II. Dünya savaşı esnasında pestisit ürünü olan organofosfatlı paratyon bileşimidir. Bu bileşik Alman bilim adamlarının, kimyasal silah olarak sinir gazı üretmek istemeleri sonucu ortaya çıkmıştır.

Racher Carson, “Silent Spring” isimli kitabında pestisitlerin zararlı olduğunu iddia etmiş ve bu konuda fazlaca çalışmalar yapıp ilk pestisit kitabını yazmıştır. Kitabın içeriğinde DDT ve klorlu hidrokarbonların çevresel faktörlere göstermiş olduğu dirence ve tüketilebilen hayvanların yağ dokusundaki birikimine ve insan yağ dokusundaki birikimi ve bu bileşiklerin toksikolojik etkilerine dair açıklamalara yer verilmiştir. Daha sonradan DDT'nin kanserojenik olduğu ispatlanmıştır. 1972'de DDT'nin kullanımı ABD'de, Avrupa ülkelerinde ve Türkiye'de yasaklamıştır (Kınacı, 2019).

1.3. Pestisitlerin Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Pestisitlerin dağılımlarını ve hedefe erişimlerini etkileyebilecek bazı unsurlar mevcuttur. Pestisitlerin hava, toprak/tortu, su ve organizmalar arasında dağılımında pestisitlere ait bazı fizikokimyasal özellikler etki etmektedir (Mdeni ve ark., 2022).

Pestisitlerin fizikokimyasal özelliklerinde etkili olan üç adet önemli katsayı mevcuttur, bunlar K_{AW} (hava/su), K_{OW} (oktanol/su) ve K_{OA} (oktanol/hava), kimyasalların sıvı fazdaki çözünürlükleri (S_A , S_W , S_O ; mol m^{-3} olarak ifade edilir) olarak sıralanmaktadır (Mdeni ve ark., 2022).

Pestisitlerin hidrofobikliği, aynı zamanda biyoakümülyasyon değerlendirmesinde bir korelasyon özelliği olan ve tortu, organik karbon ve suda ayrıştırma için kullanılan K_{OW} ile ölçülür. K_{OA} , S_A veya sıvı fazlı buhar basıncı ($P_L = S_{ART}, P_a$), aerosollere adsorbe edilen organik bileşikleri tanımlamak için kullanılan korelasyon özellikleridir. Bu formül pestisitlerin fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Mdeni ve ark., 2022).

Sıcaklık gibi faktörler suda çözünürlüğü, P_v (buhar basıncı) ve K_H 'yi (Henry yasası sabiti) güçlü bir şekilde etkiler. Yaz mevsiminde, yüksek sıcaklıklar nedeniyle yüzey sularının ısınmasıyla pestisitlerin sudan havaya karışması daha fazla gerçekleşmektedir (Mdeni ve ark., 2022).

Yeni tasarlanacak olan aday pestisit moleküllerinin fizikokimyasal özellikleri, canlılar üzerinde yeni terapötik ajanlar kadar önemli role sahiptir. Öncelikle pestisit molekülleri, haşereler tarafından absorbe edilmeli, hedef bölgeye taşınmalı ve ardından hedef reseptörler veya enzimler ile etkileşime girmelidir; molekülün hidrofobikliği, absorpsiyonu, taşınması ve reseptörlerle etkileşimi çok önemlidir. Pestisit molekülünün elektronik ve yapısal özellikleri de reseptör-ligand etkileşimi için önemli faktörlerdir (Pereira ve ark., 2016).

1960'lerden beri Kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (QSAR), farmasötiklerin ve pestisitlerin tasarımında yaygın olarak uygulanmaktadır. QSAR'da biyolojik aktivitelerdeki değişiklikler, doğrusal serbest enerji ilişkileri biçiminde bileşiklerin yapısal özellikleri ile ilgili tanımlayıcılar kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilir (Pereira ve ark., 2016).

Çevresel faktörler bakımından önem arz eden yarı uçucu organik bileşiklerin çoğu, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden ötürü uzun mesafeli atmosferik taşınımına maruz kalır. Buhar basıncı ve çözünürlük bu bileşiklerin taşınması sırasında ömrünü tanımlayan en önemli parametrelerdir. Ayrıca bu özellikler pestisit verimliliğini etkileyeceği için ilaçlama yapılırken göz önünde bulundurulmalıdır (Akamatsu, 2011 ve Pereira ve ark., 2016).

Pestisitler farklı ortamlarda farklı davranışlar gösterebilmektedirler. Bu maddelerin bozunmaları üç farklı şekilde gerçekleşebilmektedir; mikroorganizmalar aracılığıyla biyolojik bozunma, çeşitli kimyasallar aracılığıyla hidroliz, redoks vd. reaksiyonlara girmeleri sonucu kimyasal bozunma ve UV veya görünür ışık aracılığı ile bozunmaları sonucu fotokimyasal bozunma işlemi gerçekleşmektedir.

Pestisit molekülünün biyolojik olarak birikimi ve yavaş bozunması durumunda molekül çevre üzerindeki etkisi bakımından daha agresif hale gelir (Pereira ve ark., 2016).

1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Her türlü zararlıyı öldürmek için tasarlanmış olan pestisitler, çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar. Pestisitlerin sınıflandırılması, toksisitesi veya tehlikeli etkileri, kullanımı veya amacı, kimyasal bileşimi, etki şekli, nasıl veya ne zaman etki ettiği, formülasyonları, menşei gibi çeşitli kriterlere göre yapılmaktadır. Pestisitler genellikle kullandıkları zararlı grubuna ve yapısındaki aktif bileşiklere göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmada üç temel pestisit grubu insektisitler, fungusitler ve herbisitlerdir (Çakmak, 2013).

DSÖ pestisitlerin zararlı etkilerini halk sağlığı açısından incelemiş, buna göre sınıflandırmasını yapmıştır. Pestisitlerin sınıflandırılması hakkındaki bilgiler doğrultusunda pestisitlerin yasal olarak kullanımı en aza indirilerek halk sağlığının ve ekosistemin korunması hedeflenmektedir (Akashe ve ark., 2018).

Pestisitler etkiledikleri canlı türlerine göre, kullanım alanlarına, etki şekillerine, kimyasal yapılarına göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Canlı türleri üzerindeki etkilerine ve kullanım alanlarına göre insektisitler, fungusitler, herbisitler, akarisitler, bakterisitler, molluskisitler, rodentisitler, nematisitler olarak sınıflandırılabilir.

Hedefledikleri enzimlere göre pestisitler asetilkolinesteraz inhibitörleri, kitin sentezi inhibitörleri, ekdizon agonisti, GABA bloklayıcı, juvenil hormon analogu, antikoagülant, glutamin sentetaz inhibitörü, steroid demetilasyon inhibitörü, protoporfirinojen oksidaz inhibitörü, RNA- polimeraz, tiyol reaktantı, protein sentezi inhibitörü, fotosentetik elektron taşıma inhibitörü, mitokondriyal solunum inhibitörü olarak sınıflandırılmaktadır (Aslan ve ark., 2021).

Kimyasal yapılarına göre pestisitler ise inorganik pestisitler, doğal organik pestisitler, sentetik organik pestisitler olarak sınıflandırılır (Çakmak, 2013).

1.4.1. Herbisitler

Tarımsal üretim yapılan alanlarda bulunması istenmeyen bitkilere yabancı ot, yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasal maddelere ise herbisit denir. Herbisit, Latince bitki (Herb-) kelimesinden türetilmiştir ve bitki öldürücü anlamına gelmektedir. Herbisitler kullanılarak üretilen kültür bitkileri kültür bitkilerine zararlı pek çok bitki patojenin/böceklerin bitkiye konukçuluk etmeleri önlenir. Herbisitler kullanım amaçları, etki mekanizması, kimyasal yapıları, bitki bünyesinde taşınma şekli, uygulama yerleri ve dönemlerine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Herbisitler fenoksi asit türevleri, bipiridil türevleri, üreler ve tiyoüreler, triazinler ve triazololler, anilinler, karbamatlar, difenileterler, benzotriazololler vd. olarak sıralanabilir (Aslan ve ark., 2021).

1.4.1.1. Difenileterler

Bitkilerdeki klorofil sentezinde rol oynayan enzimlerden Protoporfirinojen Oksidaz (PPO) enzimi, pestisitlerin kullanımında inhibisyonu hedeflenen önemli enzimlerden biridir (Jakubek ve ark., 2021).

Protoporfirinojen oksidaz enzimini inhibe eden pestisit grubuna difenileter grubu pestisitler adı verilmektedir. Bu herbisitler yabancı ot çıkışı kontrol etmek amacıyla kullanılır (Zhao ve ark., 2022).

Difenileter grubu herbisitler ışık varlığında aktive olarak fotosentez ve fotofosforilasyonu inhibe etmektedir. Bu herbisitler ciltte ve gözlerde ciddi tahrişe yol açmaktadırlar. Asiflorfen, Aklonifen ve Bifenoks difenileter grubu herbisitlere örnek verilebilir (Aslan ve ark., 2021).

1.4.2. Herbisitlerin Çevrede Kalıntı Süresi ve Parçalanması

Pestisitler uygulama sonrasında %0,015- 6,0 oranlarında hedeflendikleri organizmalara ulaşabilmekte, %94-99,9'lük kısım ise tarım ekosisteminde hedef olarak belirlenmemiş organizmalara, toprağa veya akıntı gibi etkenlerle su kaynaklarına karışmaktadır (Yıldız ve ark., 2005 ve Atabey, 2016).

Pestisit bileşikleri uygulana alanlarından çeşitli sebeplerle yer değiştirebilmekte ve eriştikleri alanlarda çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bunlardan bazıları pestisitlerin buharlaşma sonucu atmosferde kalıcı toksik madde birikimine yol açması, fotokimyasal reaksiyona uğrayarak reaksiyon sonucu toksisite oluşturması, toprakta tutulan pestisitlerin toprak içinde kimyasal ve mikrobiyolojik birikime uğrayarak toprakta kirliliğe yol açması, su akıntıları ile topraktan sürüklenen pestisitlerin nehir, göl ve deniz sularını kirlletmesi gibi sorunlardır (Akçan, 2008).

Bu nedenle pestisit bileşikleri, doğal besin zincirinde yer alan bütün canlıların hayatını tehdit etme potansiyeline sahip olan kimyasallardır (Yazgan, 1997).

FAO (Dünya Tarım Örgütü) ve DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) isimli örgütler gıdalardan insanlara geçen pestisit miktarlarını belirlemek için pestisit kalıntı komitesini kurmuştur. Bu komitenin kuruluş amacı pestisitin tanımlanması ve bilimsel araştırmaların sonucunda gıdalarda bulunan pestisit kalıntılarının alt ve üst miktar limitlerinin belirlenmesidir (Kınacı, 2019).

Pestisitler, FAO ve DSÖ tebliğlerinde belirtilen dozlardan farklı uygulandığında, ilaçlama gereğinden fazla uygulandığında ve/veya gereksinim olmadan uygulandığında pestisit bileşiklerinin gıda ürünlerindeki kalıntı miktarları artmaktadır (Kınacı, 2019).

Birden fazla pestisitlerin bir arada kullanılması veya son uygulama ile hasat arasındaki süreye dikkat edilmeden uygulanması sonucu hasat yapıldığı zamanlarda ürünlerdeki pestisit kalıntısı oranında artış gözlenmektedir (Kınacı, 2019).

DSÖ ve Türk Gıda Kodeksi pestisitlerin uygulanmasında dikkat edilecek kuralların belirlenmesi ve pestisitlerin kalıntı miktarının tespitinde önemli role sahiptir (Kınacı, 2019).

1.5. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri

Pestisit kullanımının toksisitesi hakkındaki çalışmalar incelendiğinde çoğu genotoksik çalışmanın gelişmiş ülkelerde yapılmış olduğu görülmektedir (Rodrigues ve ark., 2022).

Oysa gelişmekte olan ülkelerde pestisit kullanımının daha yaygın olduğu bilinmektedir. Gelişmiş ülkelerde odak noktası esas olarak kontrollü tarım sistemlerinde çalışan işçiler iken, gelişmekte olan ülkelerde kontrolsüz tarım ortamında çalışan küçük ölçekli çiftçiler hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Pestisitlerin olumsuz sağlık etkileri hakkında sınırlı bilgiye sahip olan çiftçiler tarafından uygun olmayan pestisit uygulaması, yüksek maruziyet riskine işaret etmektedir (Jallow ve ark., 2017).

Pestisit uygulayıcılarının mesleki pestisit maruziyeti, yeterli bilgi donanımına sahip olmayan uygulayıcıların pestisit kullanımı esnasında pestisite maruz kalması gibi durumlar pestisitlerin genotoksisiteye yol açma ve insan biyolojik matrislerinde birikime sebep olması nedeniyle önem arz etmektedir (Jallow ve ark., 2017).

Pestisitlere sürekli ve ölümcül dozda olmayan maruziyet, oksidatif stres, mutajenite ve hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir. Pestisitlere maruz kalma, biyolojik matrislerden özellikle DNA'nın spesifik alanlarına bağlanarak her

maruziyet sonrası artan düzeyde DNA hasarına yol açmaktadır (Koureas ve ark., 2014).

Pestisitler genellikle kombinasyon halinde ve yüksek derişimli formlarda kullanıldıklarında DNA hasarına neden olmaktadır. Pestisit metabolitleri insan kanında, idrarda, tükürüğünde ve sütünde tespit edilebilmektedir (Kapeleka ve ark., 2021).

Pestisit uygulaması esnasında pestisit uygulanan ürünün tarlada ve depolama sürecinde zararlı organizmalardan kaynaklı ürün kayıplarının önlenmesinde etkili olmasına, insan tüketimi için pestisit uygulanan ürünlerde kalıntı olmamasına, pestisit ekosisteme mümkün olduğunca az zararı olmasına, pestisit yok edilmek istenen zararlıya karşı “selektif toksisite” gösterip diğer canlılara karşı toksisite göstermemesine dikkat edilerek pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine maruziyeti azaltılabilir (Özhan, 2014).

Pestisit kullanımında verimliliğin sağlanabilmesi için çeşitli faktörlere dikkat edilir. Pestisit uygulaması yapılırken yok edilmek istenen zararlının en zayıf ya da en hassas olduğu dönemde ilaçlama yapılarak ilacın etkinliğinin artırılması sağlanıp daha az sayıda ilaç kullanılır, ilaçlama maliyeti azaltılarak bunun bir sonucu olarak çevre ve gıda güvenliğine katkı sağlanabilir (Tiryaki, 2017).

Türkiye’de pestisit kullanımının başlamasının akabinde bazı zehirlenmeler gözlemlenmiştir. Bursa ilinde paration ile kontamine şeftali sonucu zehirlenme vakası, İzmir ilinin Ödemiş ilçesinde paration ile kontamine karpuzun tüketimi sonucu zehirlenme vakası, Alanya ilinde pestisit ile kontamine çiçeklere çıplak el ile dokunma sonucu zehirlenme vakası örnek olarak verilebilir (Özhan, 2014).

1.6. Pestisitlerin Metabolizması

Pestisitler herhangi bir yolla vücuda alındıktan sonra Faz I reaksiyonları ile (Oksidasyon, İndirgenme, Hidroliz, Hidratasyon, Detiyoasetilasyon, İzomerizasyon) tepkimeye girerek sonrasında Faz II reaksiyonları ile (Glukuronidasyon, Sülfatasyon, Metilasyon, Asetilasyon vs.) metabolize olmaktadır (Vural, 2005).

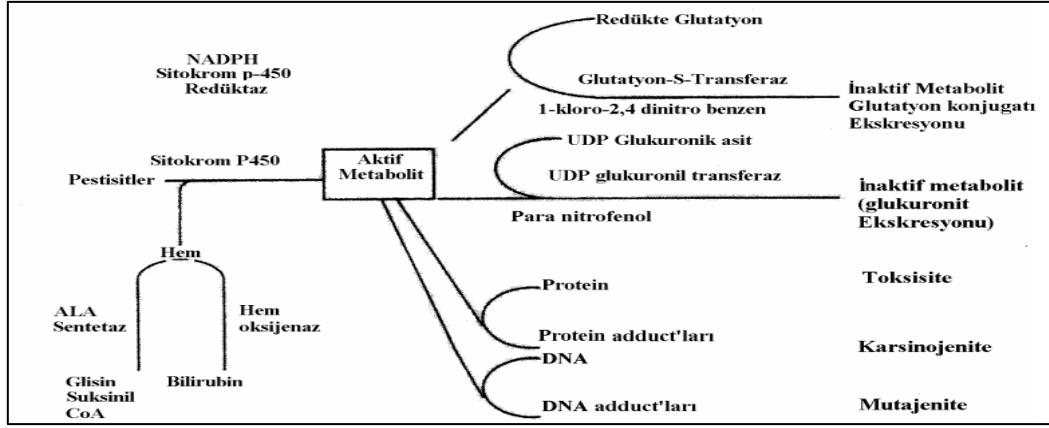
Pestisitler metabolizasyonları esnasında karaciğerde sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından Faz I aşamasında oksidasyona uğrayarak yarı ömrü kısa olan bileşiklere dönüşmekte, değişime uğrayan pestisitler glukuronik asitle ya da glutatyon (GSH) ile Faz II aşamasında konjugasyona uğramaktadır. Biyotransformasyon sonucunda biyoaktivasyona uğraymış olan pestisit metabolitleri DNA, protein gibi makromoleküllere bağlanarak biyolojik yarı ömürlerini arttırmaktadır (Domingues ve ark., 2010).

Pestisit metabolitlerinin DNA ya da nörolojik bakımdan önem teşkil eden esterazlara bağlanmasıyla onkojenik toksisite ya da nörotoksisite ortaya çıkmaktadır (Vakonaki ve ark., 2013).

Pestisitlerin biyotransformasyonda yer alan enzimlerden sitokrom p450 redüktaz (CYP450) enzimi birçok memelide ve böceklerde bulunan hepatositlerde bulunan bir hemoprotein olup ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev almaktadır. Birçok pestisit sınıfı bu enzimi indüklemektedir (Abass ve ark., 2012).

Glutatyon-s-transferaz (GST) enzimi bir izoenzimdir. Pestisit metabolitleri, bu enzimle konjugasyona uğrayarak inaktif hale gelmektedir (Domingues ve ark., 2010).

Udp-glukuronil transferaz (UDP) enzimi, ilaçlar, bilirubin, steroid hormonlar, v.b. gibi maddelerin glukuronik asitle konjugasyonunda rol almaktadır. Pestisitlerin metabolizasyonu Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Kurutaş ve Kılınç, 2003).



Şekil 1.1. Pestisitlerin metabolizasyon şeması (Kurutaş ve Kılınç, 2003).

1.7. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Toksisitesi

Pestisitlerin toksisitesi esas olarak doz ve zaman olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Bu faktörler kapsamında, maddenin ne kadarının dahil olduğu (doz) ve maddeye ne sıklıkta maruz kaldığı (zaman) akut ve kronik toksisite olmak üzere iki farklı toksisite tipine yol açmaktadır (Akashe ve ark., 2018).

Akut toksisite, bir pestisitinin kısa süreli maruziyetten sonra insan, hayvan veya bitki için ne kadar zehirli olduğunu ifade etmektedir. Yüksek akut toksisiteye sahip bir pestisit, çok küçük miktarlarda bile ölümcüldür. Akut toksisite, oral toksisite, dermal toksisite ve inhalasyon toksisitesi olarak ölçülmektedir (Akashe ve ark., 2018).

Pestisitlerin kronik toksisitesi iki farklı kriter ile değerlendirilmekte olup kabul edilebilir günlük alım ve maksimum kalıntı limitleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable Daily Intake, ADI) bir kişinin bir kg vücut ağırlığı başına bir günde alabileceği kabul edilebilecek düzeydeki günlük pestisit bileşiği miktarını mg/kg/gün olarak ifade eden değerdir (Tiryaki ve ark., 2010).

İşlenmiş ürünlerde pestisitlerin bıraktığı izlere "kalıntı" denir. Maksimum kalıntı seviyesi (MRL), pestisitlerin doğru bir şekilde uygulandığında yasal olarak tolere edilebilen en yüksek pestisit kalıntısı seviyesidir (Tiryaki, 2017).

Maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limit, MRL) iyi tarım uygulamaları kapsamında pestisitler doğru bir şekilde uygulandığında gıda maddelerinde, yem içinde veya üzerinde bulunmasına izin verilen en fazla pestisit miktarını(mg/kg) ifade eden değerdir. Bazen MRL yerine (özellikle gıdalarda) bulaşanlar için “müdahale limiti (action limit)” terimi kullanılmaktadır. Zaman zaman da üründe tolere edilebilen en az pestisit içeriği anlamında “tolerans” terimi kullanılmaktadır (Tiryaki, 2017).

Vücutta metabolize olan pestisitler metabolizasyon sonrasında çeşitli toksik etkilere yol açmaktadır. Bu etkiler vücut ve organ ağırlıklarına etki, hematolojik toksisite, immünotoksik etki, dermal etki, biyokimyasal etki, teratojenik ve mutajenik etkiler, genotoksik etkiler olarak sıralanmaktadır (Blakley ve ark., 1999).

Canlı organizmaların hedeflendiği tarımsal mücadele ilaçları, insanlarda da etkiye yol açarak kronik toksisiteye neden olmaktadır. Pestisitler sıklıkla sinir sistemi üzerinde çeşitli nörolojik defektlere yol açmakta, solunum sisteminde akciğer dokusunda ve solunum organlarında hasara yol açmaktadır. Kardiyovasküler sistemde, karaciğerde, böbreklerde, gastrointestinal sistemde, dolaşım sisteminde, deride, gözde çeşitli semptomların oluşmasına yol açmaktadır (Kurutaş ve Kılınç, 2003).

1.8. Tez Kapsamında Kullanılan Pestisit Maddelerine Ait Bilgiler

Tez çalışması kapsamında protoporfirinojen oksidaz inhibitörü etkili difenileter grubu herbisitlerden Aklonifen (ACF) ve Bifenoks (BİF) isimli pestisit etken maddeleri ile çalışılmıştır.

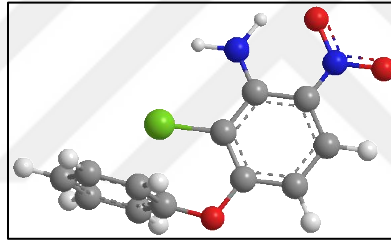
1.8.1. Aklonifen'in Özellikleri

ACF, ayçiçeği, patates, mısır ve buğday ekinlerinde yaygın olarak kullanılan bir difenileter herbisitidir. Yarı ömrü uzun olduğu için kalıcı kabul edilmektedir ve çevrede kolayca birikebilmektedir (Park ve ark., 2022).

Sarı renkli kristalize bir tozudur. Organik çözücülerde iyi çözünür. Suda çözünürlüğü oldukça düşüktür.

Kapalı Formülü: $C_{12}H_9ClN_2O_3$

Molekül Ağırlığı: 264,66



Şekil 1.2. Aklonifen'in kimyasal yapısı.

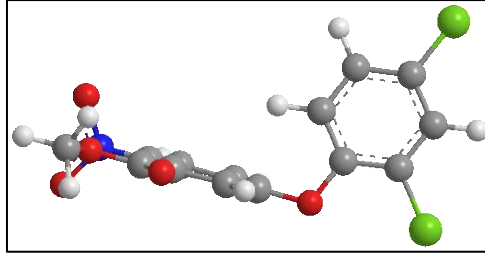
1.8.2. Bifenoks'un Özellikleri

BİF, metil 5-(2,4-diklorfenoksi) 2-nitrobenzoat formülüne sahip olup, tahıl, pirinç, buğday ve arpada bulunan geniş yapraklı ve otsu otlar için tarımsal faaliyetlerde kullanılan selektif ve sistemik bir herbisittir. Ayrıca, BİF bir protoporfirinojen oksidaz inhibitörüdür (De Matos Morawski ve ark., 2021).

Beyaz veya açık sarı renkli kristalize tozudur. Organik çözücülerde iyi çözünür. Suda çözünürlüğü 0,35 mg/L'dir.

Kapalı Formülü: $C_{14}H_9Cl_2NO_5$

Molekül Ağırlığı: 342,1 g/mol



Şekil 1.3. Bifenoks'un kimyasal yapısı.

1.9. Literatür İncelemesi

Literatür çalışmaları incelendiğinde, su ve toprak gibi farklı örneklerden ACF ve BİF tayini için elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin kullanıldığı farklı çalışmaların olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar Çizelge 1.1'de sunulmuştur.

Ayrıca, 2019 yılında Jabłońska-Trypuć ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada BİF'un ve bakteriyel ve insan kanser hücreleri üzerindeki uyarıcı etkisini gösterilmiştir. Ayrıca bu BİF'un hem normal sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur (Jabłońska-Trypuć ve ark., 2019).

Lee ve arkadaşlarının (2021) yılında yaptığı başka bir çalışmada ise ACF'in reaktif oksijen türleri üretimi yoluyla toksik etkilere neden olduğunu ve bunun da mitokondriyal hasara yol açtığını göstermiştir. ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin sebep olduğu bu toksik etkiler insan sağlığı açısından da önemli rol oynamaktadır (Lee ve ark, 2021).

Çizelge 1.1. Tez çalışmasına konu pestisitler hakkında yapılmış olan çalışmalar.

Yöntem	Analit	Doğrusal aralık	Teşhis sınırı	Uygulama	Referans
Diferansiyel puls voltametri (gadolinium niyobat nanopartikül modifiye sensör)	ACF	0,02–78 μM	1,15 nM	Nehir suyu ve toprak	(Gopi ve ark., 2021)
Diferansiyel puls voltametri (poli (N-izopropilakrilamid)/poli (anilin)/bakır modifiye sensör)	ACF	0,01–10 μM ve 18–76 μM	0,009 μM	Göl suyu	(Mutharani ve ark., 2020)
Kare dalga voltametri (grafitik karbon nitrür modifiye sensör)	ACF	0,01 μM – 1,2 μM	1,28 nM	Su ve toprak	(Shetti ve ark., 2019)
Kare dalga voltametri	ACF	0,25–19,2 $\mu\text{g/mL}$	0,073 $\mu\text{g/mL}$	Baraj suyu ve toprak	(İnam ve Çakmak, 2013)
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	ACF BİF	1–250 ng/L	19 ng/mL 39 ng/mL	İçme suları	(Laganà ve ark., 2000)
Gaz kromatografisi	BİF	-	11 $\mu\text{g/kg}$	Baraj suyu, nehir suyu ve kuyu suyu	(Bodur ve Bakırdere, 2019)
Diferansiyel puls voltametri	BİF	200–10000 nM	$6,7 \cdot 10^{-7}$ M	İçme suyu ve göl suyu	(Barek ve ark., 2011)

Ancak her iki maddenin serum veya idrar gibi biyolojik örneklerden analizine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışmaları kapsamında ACF ve BİF'un sentetik serum ve idrar örneklerinde eş zamanlı tayini için basit bir numune hazırlama prosedürüne sahip, tamamen valide edilmiş ekonomik ve çevreci yeni bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve literatürdeki bu boşluğu doldurması hedeflenmiştir.

Bu kapsamda, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) kullanılarak pestisitlere ait miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca genotoksik etkiler gösteren bu pestisitler adli eczacılık açısından önem taşımaktadır. Tez çalışmaları kapsamında ACF ve BİF pestisitlerinin insan serum albümini (HSA) ile etkileşimlerinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi, etkileşim termodinamiğinin aydınlatılması da tez çalışmaları kapsamında hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Çalışmasına Kullanılan Pestisitler

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan pestisitler ve bu pestisit hammaddelerinin temin edildiği firmalar Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan pestisitler

PESTİSİT	FİRMA
Aklonifen	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Bifenoks	Dr. Ehrenstorfer GmbH

2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan araç ve gereçler aşağıda listelenmiştir.

- YPSK sistemi: Shimadzu Prominence-1 LC-2030C (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Manyetik karıştırıcı: Ikamag RH (Jange and Kungel IKA- Labor Technic)
- Elektronik hassas terazi: Shimadzu Libror AEG-220
- Vortex
- pH metre: Model 526 (WTW, Avusturya) ve kombine elektrot sistemi (cam elektrot- referans elektrot)
- Ultrasonik su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen, İnterlab, Türkiye)
- Farklı hacimlere sahip deney tüpleri, balon jojeler ve sarf malzemeler
- Kinetex Evo C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) Phenomenex (Torrance, CA)
- Floresans Spektrometre Cihazı: Agilent Cary Eclipse
- UV- Vis Spektrometre Cihazı: Agilent Cary 60

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal maddeler ve firmalarına ait bilgiler Çizelge 2.2’de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

KİMYASAL MADDE	FİRMA
Asetonitril (ACN)	Sigma -Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Amonyum asetat	Sigma -Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Sodyum asetat	Sigma -Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Hidroklorik asit	Merck Millipore (Darmstadt, Almanya)
Sodyum hidroksit	Merck Millipore (Darmstadt, Almanya)
Hidrojen peroksit	Merck Millipore (Darmstadt, Almanya)
İnsan serum albumin (HSA)	Sigma- Aldrich (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Metanol (MeOH)	Merck Millipore (Darmstadt, Almanya)

2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Aklonifen ve Bifenoks’un Eş Zamanlı Analizi

2.2.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez çalışması kapsamında ACF ve BİF pestisit bileşikleri eş zamanlı olarak aynı derişimlerde hazırlanmıştır. Hassas analitik terazi ile tartım sonucu iki maddenin de derişimi MeOH çözücüsü ile çözümlenerek 1000 µg /mL olarak ayarlanmıştır. Her bir madde için balon jöjelere aynı miktarda çözücü ekleyip, tam olarak çözünmeyi sağlamak için numuneler 10 dakika kadar ultrasonik banyoda beklenmiştir. Hacimleri tamamlanan çözeltiler sonrasında vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra kalibrasyon numuneleri için gerekli seyreltmeler yapılarak, numuneler 5 µL enjeksiyon hacmi ile sisteme verilmiştir.

2.2.2. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Pestisit analizleri esnasında biyolojik matrikslerin pestisitlerin analizinde girişim etkisinin olup olmadığını belirlemek için pestisit bileşiklerinin geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla deneylerde sentetik insan serumu ve insan idrarı olmak üzere iki farklı matriks kullanılmıştır.

2.2.2.1. İdrar numunelerinin hazırlanması

10 mL'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpüne 3,6 mL idrar konulmuştur. Üzerine 4.4 mL ACN eklenmiştir. Bu karışım çözeltisinin üzerine ise 1 mL ACF ve 1 mL BİF eklenmiştir. Numune 15 dakika ultrasonik banyoda ve 15 dakika ise santrifüjde bekletilerek analize hazırlanmıştır. Pestisitli idrar çözeltisinin yanı sıra referans olması açısından boş idrar çözeltisi de hazırlanmıştır. 0,9 mL boş idrar üzerine 0,25 mL MeOH ve 1,35 mL ACN eklenmiştir. Karışım çözelti 15 dakika ultrasonik banyoda ve 15 dakika ise santrifüjde bekletilmiştir. Hazırlanan numuneler 0,01 ppm den başlanarak 100 ppm derişime dek analiz edilmiştir. Analiz her derişim için 5 defa tekrarlanmıştır.

2.2.2.2. Serum numunelerinin hazırlanması

10 mL'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpüne 3,6 mL serum numunesi konulmuştur. Üzerine 4,4 mL ACN eklenmiştir. Bu karışım çözeltisinin üzerine ise 1 mL ACF ve 1 mL BİF eklenmiştir. Numune 15 dakika ultrasonik banyoda ve 15 dakika ise santrifüjde bekletilerek analize hazırlanmıştır. Santrifüj cihazından alınan numune çözeltisinin süpernatant kısmı ayrılmıştır.

2.2.3. Yöntem

Bu tez çalışmasında ACF ve BİF pestisitlerinin miktar tayini için kromatografik yöntemler kullanılırken, pestisitlerin HSA ile olan etkileşimi UV ve floresans spektroskopisi kullanılarak spektroskopik yöntemler ile incelenmiştir.

2.2.3.1. Kromatografik yöntemler

Bir karışımdaki maddelerin, biri sabit diğeri hareketli olarak adlandırılan iki faz arasında farklı dağılımlarının esasına dayanan ayırma yöntemine kromatografi adı verilmektedir. İki farklı maddeden oluşan karışım kromatografik sisteme uygulandığında, maddelerden birinin hareketli faza ilgisi diğerdinden fazlaysa karışım çözeltisi hareketli faz tarafından sürüklendiğinde maddeler ayrılırlar. Hareketli faza daha çok ilgisi olan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit faza daha çok ilgisi olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolondan çıkan her maddenin derişim profiline bağılı olarak elde edilen pikler ise kromatogram olarak adlandırılmaktadır (Tuğ, 2022 ve Erkmen, 2017).

Kromatografik yöntemler hareketli fazın tipine, uygulama biçimlerine, ayrılma mekanizmalarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Hareketli faz kullanılarak yapılan kromatografik yöntemler sıvı kromatografisi (SK), gaz kromatografisi (GK) ve süperkritik akışkan kromatografisi olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Eser ve Sepici-Dinçel, 2018).

Uygulama biçimlerine göre kromatografik yöntemler kâğıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (İTK), sütun (kolon) kromatografisi olarak sıralanmaktadır (Eser ve Sepici-Dinçel, 2018).

Ayrılma mekanizmalarına göre ise adsorpsiyon kromatografisi, dağılıma (Partisyon) kromatografisi, iyon değıştirme kromatografisi, jel kromatografisi ve afinite kromatografisi olarak belirtilmektedir (Eser ve Sepici-Dinçel, 2018).

2.2.3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK)

Analitik yöntemlerde kullanılan YPSK cihazı hareketli faz haznesi ve çözücü sistemi, pompa, enjeksiyon bölmesi, kolon, dedektör, kaydedici bölümlerinden oluşmaktadır (Belanger ve ark., 1997).

Sabit bileşimde tek bir çözücü sistemi kullanılarak yapılan ayırmaya izokratik elüsyon, polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi ile yapılan ayırmaya da gradient elüsyon adı verilmektedir. Pompalama sistemi olarak sürgülü pompalar, pistonlu pompalar ve pnömatik pompalar kullanılmaktadır. Analiz edilecek örneğin kolona tekrarlanabilir hacimlerde gönderilmesi için enjeksiyon bölmesi oldukça önemlidir, manuel ya da otomatik olabilir. Otomatik numune örnekleme sistemleri en tekrarlanabilir sonuçları sağlamaktadır. Soğutmalı olan enjeksiyon türleri deneysel çalışmada tüm örneklerin akşamdan analiz için cihaza konulabilmesi ve örneklerin bozunmaması gibi bir üstünlük sağlar (Sağırlı, 2015).

Sabit fazın katı olduğu kromatografik yöntem adsorbsiyon kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Adsorbsiyon kromatografisinde silikajel kolonlar kullanılır. Dolgu maddesi poröz ya da peliküler yapıda olabilmektedir (Eser ve Sepici-Dinçel, 2018).

Sabit fazın sıvı olduğu kromatografide silikajelin aktif silanol gruplarına çeşitli polaritedeki gruplar bağlanmaktadır. Analitlerin kolona bağlanması sililleme *reaksiyonları* ile gerçekleşmektedir. En fazla kullanılan gruplar; oktil (C8 zinciri), oktadesil (C18 zinciri), fenil, alkilamin ve alkilnitritlerdir (Eser ve Sepici-Dinçel, 2018).

Sabit fazın ve hareketli fazın polarlığına bağlı olarak bağlı faz kromatografisi normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisi olarak ikiye ayrılmaktadır. Normal faz kromatografisinde sabit faz polar yapıda silikajel olup hareketli faz ise apolar yapıda olan hekzan veya isopropil eter olabilmektedir. Ters faz

kromatografisinde sabit faz apolar yapıda C8, C18 gibi hidrokarbonlar seçilmekte, mobil faz ise polar yapıdaki su, MeOH, asetonitril gibi çözücülerden seçilmektedir (Belanger ve ark., 1997).

YPSK cihazında kullanılan dedektörler analite duyarlı dedektörler ve taşıyıcı faza duyarlı dedektörler olarak ikiye ayrılmaktadır. YPSK cihazı dedektörleri absorbands dedektör, floresans dedektör, refraktif indeks dedektörü, elektrokimyasal dedektör, optikçe aktif dedektör ve kütle spektrometrik dedektör olarak sıralanmaktadır. Kolonda ayrılan madde çözeltilisinin dedektörün içinden geçtiği esnada absorbandsının ölçülmesine dayanan dedektörler absorbands dedektörler olarak sınıflandırılmaktadır. Tez çalışmasına konu yöntem absorbands dedektörler kullanılarak geliştirilmiştir (Belanger ve ark., 1997).

YPSK cihazı için dedektör seçiminde bazı kriterlere dikkat edilmektedir. Sıcaklık ve taşıyıcı fazın kompozisyonu değiştiği zaman temel çizginin değişmemesi, dedektörün seçici olması, seçici dedektörün analit türleri arasında büyük farklar ortaya çıkarmaması istenir. Ayrıca dedektörün alt tayin sınırı olduğunca düşük olmalı, dedektör bant genişlemesine sebep olmamalı, dedektörün cevap süresi kısa olmalı ve dedektör kolay ulaşılabilir olmalıdır (Atakol, 2022).

Tez çalışmasında da kullanılmış olan ve aynı zamanda en sık kullanılan dedektör UV dedektördür. Bu dedektörlerde analitin geçtiği hücrede bir UV lambası, bir monokromator ve UV dedektör bulunmaktadır. Analiz esnasında analitin absorpsiyon yaptığı dalga boyu seçilerek deneysel çalışma bu dalga boyunda gerçekleştirilmektedir.

UV dedektör ile yapılan analizlerde analitin en az C=O, -NO₂, C=C gruplarını içermesi gerekmektedir. Doymuş hidrokarbonların analizinde UV dedektörler kullanılamamaktadır (McNally ve ark., 2015).

YPSK cihazında analizlerde kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki adet yöntem bulunmaktadır. Kalitatif analizde alıkonma zamanı ve alıkonma hacmi kullanılmaktadır. Kantitatif analizde ise pik alanı ya da yüksekliğinin bir ya da daha fazla standart ile kıyaslanması gerçekleştirilmektedir. Bu işlemde kullanılan bazı yöntemler alan normalizasyon yöntemi, eksternal (dış) standart yöntemi, internal (iç) standart yöntemi ve standart ekleme yöntemi olarak sıralanmaktadır (McNally ve ark., 2015).

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

YPSK kullanılarak yapılan çalışmalarda analizin doğruluğunu kontrol etmek için çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Bu parametrelerin bütününe Sistem Uygunluk Testleri (SUT) adı verilmektedir.

YPSK sisteminin analiz sonuçlarında gözle izlenebilen bazı parametreler mevcuttur. Bunlar; alıkonma zamanı, pik alanı, pikin şekli olarak sıralanabilir. Analiz esnasında gözlemlenebilen parametrelerden biri elde edilen pikin şeklidir. Analizlerde elde edilen pikin şekli keskin, iki tarafı eşit ve dar olmalıdır.

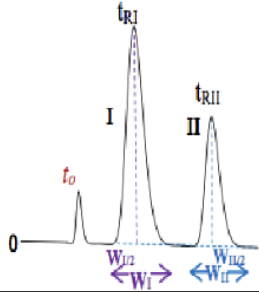
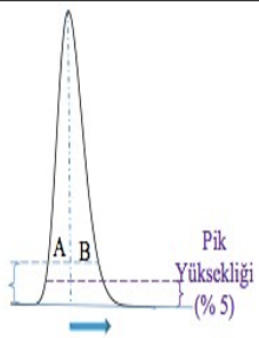
Numunenin kolona enjeksiyonu sonrası, dedektöre gelen her cevap sinyali bir pik olarak görülür. Bu sinyalin çıkış zamanı aynı zamanda pikin alıkonma zamanı (t_R) olarak da adlandırılır ve nitel analizlerde belirleyici faktördür. Numune içinde bulunan analitlerin her birinin farklı alıkonma zamanları vardır. Hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır (Fanali ve ark., 2013; Kromidas, 2005 ve Erkmen, 2017).

Kromatografik ayırma yöntemlerinde kullanımdan önce yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunun kontrolü için sistem uygunluk testleri kullanılmaktadır. Bu testler Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation (ICH)) Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan

Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması istenen testlerdir (International Conference on Harmonization, 2005a; International Conference on Harmonization, 2005b; US FDA, 1983 ve US FDA, 2000).

Sistemdeki akış hızı, pH, okuma yapılacak dalga boyu, hareketli faz bileşiminden kaynaklı en ufak bir değişiklik olması durumunda SUT parametrelerinin yeni sistem için yeniden düzenlenmesi gerekmektedir (Gebrehiwot, 2019).

Çizelge 2.3. Sistem uygunluk testi parametreleri (Gebrehiwot, 2019).

SUT Parametresi	Sembolü	Formülü	Limit	Açıklama
Kapasite Faktörü	k	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$1 \leq k \leq 10$	
Seçililik	α	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{r_0}}{t_{R_1} - t_{r_0}}$	$\alpha > 1$	
Ayrım Gücü	R_s	$R_s = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{10.5} + W_{20.5}}$	$R_s > 1.5$	
Kuyruklanma Faktörü	T	$T = \frac{A + B}{\frac{A}{B}}$	$2 \leq$	
Pik Asimetresi	A_s	$A_s = \frac{A}{B}$	$0.95 \leq A_s \leq 2$	
Teorik Tabaka Sayısı	N	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	$N > 2000$	
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği	% BSS	$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$	$\% BSS < 1.5$	

Çizelge 2.3'te yer alan SUT parametreleri incelendiğinde, k değeri büyük ise, bileşen sabit fazda iyi tutulmaktadır ve kolon boyunca yavaş ilerlemektedir. k değeri çok küçük ise, analit çözücü pikinden ayırlanamamaktadır, çok büyük olması ise analiz süresinin uzun olduğunu göstermektedir. Seçicilik (α), sabit faz ve hareketli fazın

özelliklerine göre değişiklik göstermektedir ve daima 1'den büyük olmalıdır (Gebrehiwot, 2019).

SUT'un parametrelerinin en önemli olanı teorik tabaka sayısıdır. Bu parametre analiz sonucunun veriminden sorumludur. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsi, akış hızı, sıcaklık, pH ve kolonun ömrü gibi deneysel koşullarla doğrudan ilgilidir (Gebrehiwot, 2019).

Kromatografik analizde kolon ve çözücünün ortak tesiri ayırma gücü R_s (rezolüsyon) olarak ifade edilir. Ayırma gücü hesaplanırken, kapasite faktörü, etkin tabaka sayısı ve seçicilik parametreleri kullanılmaktadır. Peş peşe gelen iki pike ait R_s değeri 1,5 ve üstünde olursa ayırım tam olarak gerçekleşmiş kabul edilmektedir (Gebrehiwot, 2019).

Kuyruklanma faktörü ve pik asimetrisi parametreleri analizde kullanılan analite ait pikin eğriliğini, kromatogramın sağ veya sol tarafına dayalı olup olmadığını ve keskinliğinin tespiti için kullanılan parametrelerdir. Pik asimetrisi, pike ait taban yüksekliğinin %10'u, kuyruklanma faktörü ise pikin taban yüksekliğinin %5'i civarından ölçülerek hesaplanmaktadır (Gebrehiwot, 2019).

Pik alanının tekrar edilebilirliği bağlı standart sapması (%BSS) olarak ifade edilmektedir. Bu parametre sayesinde bir kromatografik yöntemde analizi yapılan madde pikinin alanının ve pik yüksekliğinin, belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği ve yöntemin kesinliği belirlenmektedir. Analizi yapılan maddenin en az 5-6 defa sisteme birbiri ardından enjekte edilmesi akabinde elde edilen pik alanları ve pik yüksekliklerinin % BSS olarak elde edilmektedir (Gebrehiwot, 2019).

2.2.5. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlilik Testleri ve Validasyon Parametreleri

Deneyisel çalışma esnasında metot geliştirmede kullanılan yöntemin uluslararası standartlar ile belirlenmiş olan kılavuzlara uygunluğu o yöntemin geçerliliği (validasyon) hakkında bilgi vermektedir. Bu kılavuzlar doğrultusunda geliştirilen yöntem çeşitli parametreler altında incelenerek geçerliliği kontrol edilmektedir. Yöntem geçerliliği incelenirken iki adet kılavuz kullanılır bunlar Çizelge 2.4'te yer almaktadır (Gümüştas, 2016; Crowter, 2001; Hartmann ve ark., 1998; International Conference on Harmonization, 2005a; International Conference on Harmonization, 2005b; Kromidas, 2005; Lee ve Jang, 2010; US FDA, 1983 ve US FDA, 2000).

Çizelge 2.4. Validasyon parametreleri (Gebrehiwot, 2019).

Gerekli Validasyon Parametresi	ICH	USP
Seçicilik	+	+
Doğrusallık	+	+
Aralık	+	+
Teşhis Sınırı (TS)	+	Sadece sınır testlerinde
Tayin Alt Sınırı (TAS)	+	Sadece kantitatif çalışmalarda
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	+
	Gün içi tekrar edilebilirlik	-
	Günler arası tekrar edilebilirlik	-
Doğruluk	+	+
Sağlamlık	Tavsiye edilir	+
Tutarlılık	Tavsiye edilir	+
Çözelti Stabilitesi	+	Tavsiye edilir
Duyarlılık	Tavsiye edilir	+

2.2.5.1. Seçicilik

Analitik yöntemlerin validasyonu esnasında en önemli parametrelerden biri yöntemin seçiciliğidir. Seçiciliği yüksek bir analizde analizi yapılan numunede var

olan ve analit ile girişim oluşturabilecek karakterdeki bileşenlerin (safsızlık, deney esnasında ortaya çıkan bozunma ürünleri veya deney ortamından gelebilecek maddeler) beraberinde analizi yapılmak istenen maddenin de aynı anda ölçümünün gerçekleştirilebilmesidir (Gümüştas, 2016).

2.2.5.2. Doğrusallık ve aralık

Analiz edilen maddenin derişiminin sinyallerinin grafiğe aktarılarak bu sinyallerin oluşturmuş olduğu grafiğın eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallıkta kullanılan parametrelerdir (Gebrehiwot, 2019).

Bu parametreler kullanılan analitin vermiş olduğu sinyaller matematiksel olarak hesaplanır. Bu hesaplamada regresyon analizleri kullanılmakta olup, korelasyon katsayısının 0,999 ve üzerinde olması durumunda doğrusallık sağlanmış olur (Gebrehiwot, 2019).

Doğrusallık çalışmalarında stok çözümlerden en az 5 adet olmak üzere farklı derişimlerde çözümler hazırlanır ve analiz edilir. Analiz sonuçları derişime karşı grafiğe aktarılır. Elde edilen grafikte analiz sonuçları eğilim çizgisine yakın olmalıdır. Bu sayede korelasyon katsayısı ideal değere yaklaşmış olur (Gebrehiwot, 2019).

Bir diğeri validasyon parametresi olan “Aralık” ise doğruluk ve duyarlılık bakımından yeterli olduğu kabul edilen yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığı olarak tanımlanmaktadır. Her nicel yöntemde çalışma aralığı belirlenir ve genellikle hedeflenen seviyelerin %50’si ile %150’si arasında yer alan kısım en iyi performans veren çalışma alanı olarak görülmektedir (Ozkan, 2012 ve Gümüştas, 2016).

2.2.5.3. Teşhis sınırı (TS, LOD) ve tayin alt sınırı (TAS, LOQ)

Numune içerisinde bulunan analiz edilecek maddenin (analitin) teşhis edilebilir fakat onaylanabileceği bir belirsizlik ile miktar tayini yapılamayan en düşük derişimine teşhis sınırı (TS) adı verilmektedir. Tayin alt sınırı ise doğru olarak tayin edilebilen cevaba sahip en düşük derişimi ifade etmektedir (Gumustas ve Ozkan, 2011; Ozkan, 2012 ve Gümüştas, 2016).

TS ve TAS değerleri birkaç yolla bulunabilir veya hesaplanmaktadır. Bunlar, görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve cevabın standart sapması ve eğim kullanılarak hesaplanması yöntemleridir.

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

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

Sinyalin gürültüye oranınının 3 olduğu derişim TS ve 10 olduğu derişim TAS olarak kabul edilmekte olup, s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu eşitlikler aynı zamanda eğri fonksiyonuna bağlı olarak TS, TAS ve duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir. Söz konusu eşitlikler Eşitlik 2.1 ve Eşitlik 2.2 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$TS = \frac{3,3 \times s}{m} \quad (2.1)$$

$$TAS = \frac{10 \times s}{m} \quad (2.2)$$

2.2.5.4. Kesinlik

Geliştirilen deneysel yöntemin gerçek çalışma şartlarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsü olarak tanımlanır. Kesinlik sonuçları % BSS olarak gösterilir. Kesinlik 3 aşamaya ayrılmaktadır, bunlar; enjeksiyonlar arası tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekrar elde edilebilirliktir. Tekrarlanabilirlik testlerinde %BSS değerinin ≤ 1.0 olması istenir, fakat eser elementlerin, biyolojik numunelerin analizlerinde ve safsızlık tayininde %5'e kadar kabul edilmektedir. Orta kesinlik testlerinde ise % BSS değerinin ≤ 2.0 olması istenir, biyolojik numunelerle gerçekleştirilen çalışmalarda ise bu oran %10-15 aralığı kabul edilebilir seviyelerdedir. Tekrar elde edilebilirlik testlerinde de oran aynıdır, fakat safsızlık ve/veya eser madde analizlerinde bu oran %10-15'e dek çıkabilmektedir (Gümüştaş, 2016).

2.2.5.5. Doğruluk

Validasyon çalışmalarında en önemli kısmı oluşturmaktadır. Analiz sonucunda elde edilmiş olan değer gerçek (referans) değere ne ölçüde yakın olduğunun belirlenmesine olanak sağlayan bir parametredir (Gebrehiwot, 2019).

Geri kazanımın yüzdesel olarak hesaplanması ile doğruluk sonuçları elde edilmektedir. Ortama ilave edilen saf maddelerin analiz ortamından geri alınabilirliği geri kazanımın göstergesidir. En az 3 farklı derişim kullanılarak toplam derişim miktarının % 25, % 50 ve % 100'üne eşdeğer olacak derişim değerleri seçilerek bu çalışmalar yapılmaktadır. Seçilen derişim değerlerinin herbiri için en az 5 tekrarlı analiz yapılarak geri kazanım sonuçları % 100'üne kadar yakınsa yöntemin doğruluğunun elde edilen oranda doğru olduğu düşünülür. Doğruluk sonuçları bazı belirteçler ile tespit edilip yöntemin doğruluğu ispatlanabilir. Bu belirteçler; kesin doğrusallık ve seçicilik, elde edilen sonuçların geçerli olması ve kullanılan yöntemle ilişkili olmayan başka bir yöntem ile sonuçların kıyaslanması, analitin deney ortamı dışında analizi yapılacak asıl numuneye uygulanması, ilaç numunesine veya matris

ortamına etken maddeyi ilave edip, geri kazanımının bulunmasıdır (Gümüştas, 2016).

2.2.5.6. Sağlamlık

Geliştirilen yöntemin analiz parametrelerindeki birtakım değişikliklerden etkilenmeden uygulanabilirliğini göstermektedir (Gümüştas, 2016).

2.2.5.7. Tutarlılık

Validasyon parametrelerinden kesinlik ile oldukça benzer kriterlere sahiptir. Kullanılan yöntemin gerçek pratik koşullar altındaki tekrar edilebilirliğini ölçen bir parametredir ve elde edilen sonuçlar % BSS değeri ile ifade edilmektedir (Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

2.2.5.8. Stabilite

Bu parametre genellikle çalışılan analitlerin kararlılığı hakkında bilgi vermektedir. Analitin farklı koşullar altında kararlı kalabildiği süreyi göstermektedir. Stabilite çalışmaları sonucunda yöntemin seçiciliği de tekrarlanmış olmaktadır. Bu parametre meydana gelebilecek bozunma ürünlerinin etken maddenin yanı sıra tayin edilebilirliğinin bir göstergesidir. Stabilite çalışmaları 4'e ayrılır. Bunlar; kısa süreli stabilite, uzun süreli stabilite, dondurma-çözme stabilitesi ve hızlandırılmış bozundurma çalışmaları olarak sıralanmaktadır (Gümüştas, 2016).

2.3. Numuneyi Analize Hazırlama-Ekstraksiyon Teknikleri

Herhangi bir bitki, gıda, toprak ya da su örneğinden analizi yapılacak bileşiği (pestisit, mikotoksin vb.) çözücüye geçirmek için yapılan kimyasal bir işlem ekstraksiyon işlemi adını almaktadır. Bu yöntemde katı ya da sıvı fazda bulunan bir

ya da birden çok bileşimin farklı çözünürlük özellikleri kullanılarak diğer bir sıvı faza alınması işlemi gerçekleştirilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

Pestisit kalıntı analizlerinde ekstraksiyon, kalıntı analizlerinin performansını etkileyen kritik bir basamaktır. Ekstraksiyon pestisitlerin analiz işlem süreçlerinde laboratuvar örneğinin homojenizasyonu veya numunenin işlenmesinden sonraki kısımda yer almaktadır. Pestisitlerin ekstraksiyon çözücüsüne geçirilebildiği ölçüde kalitatif ve kantitatif analiz yapılmakta olup, kromatografik tekniklerin başarısı bu aşamaya bağlı olarak değişmektedir. Uzun ekstraksiyon süresi, emek, yoğun işlem basamakları, yüksek miktarda organik çözücü tüketimi ve düşük tekrarlanabilirlik gibi dezavantajları olan geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, modern cihazların ortaya çıkması ve ekstraksiyon yöntemlerinin etkinliği ve seçiciliğinin artmasıyla birlikte tercih edilmemeye başlanmıştır (Büyüktuncel, 2012).

Ekstraksiyonu etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bunlar sıcaklık, çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi vs. olarak sıralanmaktadır. Çoğu durumda sıcaklığın artışı, çözünürlüğünü ve moleküllerin yayılımını arttırmaktadır. Bu da genellikle ekstraksiyonun güçlenmesiyle sonuçlanmaktadır. Ekstraksiyonda matrikse bağımlılık istenmediği için düşük solvent tüketimi beklenmekte ve ekstraksiyonun hızlı olması istenmektedir. Ayrıca analiz edilecek maddenin filtrasyon gerektirmemesi istendiğinden, ekstraksiyon ısısal olarak kararsız analitler için uygun bir metod olması, toksik kimyasal yönetimi ve imhası gerektirmediği için tercih edilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

2.3.1. Seyrelt ve Enjekte Et Yöntemi (Dilute And Shoot)

ACF ve BİF'un biyolojik numunelerden eş zamanlı miktar tayininde düşük maliyetli ve çevreye duyarlı seyrelt ve enjekte et yöntemi kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan yöntemin esası, ACN bazlı çözücü ile pestisit numunesinin ekstraksiyonu ve beraber ekstrakte edilen diğer matris bileşenlerinden

gelen girişimi (matriks efekti) en aza indirmek ve ekstra temizleme prosedürü ihtiyacını ortadan kaldırmak için ekstraktın suyla seyreltilmesini ve ardından YPSK ile analizini içermektedir (Deventer ve ark., 2014).

Seyrelt ve enjekte et yönteminde numune hazırlama aşaması, elde edilen analiz sonuçlarının kalitesini önemli ölçüde etkilemekte ve aynı zamanda tüm prosedürün "çevreci" olması ve "yeşil kimya" alanına katkıda bulunması sebebiyle analitik sürecin en kritik adımı olarak kabul edilmektedir (Petrarca ve ark, 2020).

Bu doğrultuda, numune hazırlama aşamasında reaktiflerin ve/veya tehlikeli maddelerin kullanımının azaltılması veya ortadan kaldırılması dahil olmak üzere çeşitli numune hazırlama yöntemleri araştırılmıştır. Bu araştırmaların hedefleri arasında organik solventlerin yeniden kullanımı ve geri kazanılması; olağan çözücülerin iyonik sıvılar ve süper kritik akışkanlar ile değiştirilmesi; analitik operasyonların minyatürleştirilmesi, bütünleştirilmesi ve otomasyonu ve daha kısa sürede yüksek proses etkinliğini hedefleyen basınç, mikrodalga ve ultrason radyasyonu uygulaması yer almaktadır (Petrarca ve ark, 2020).

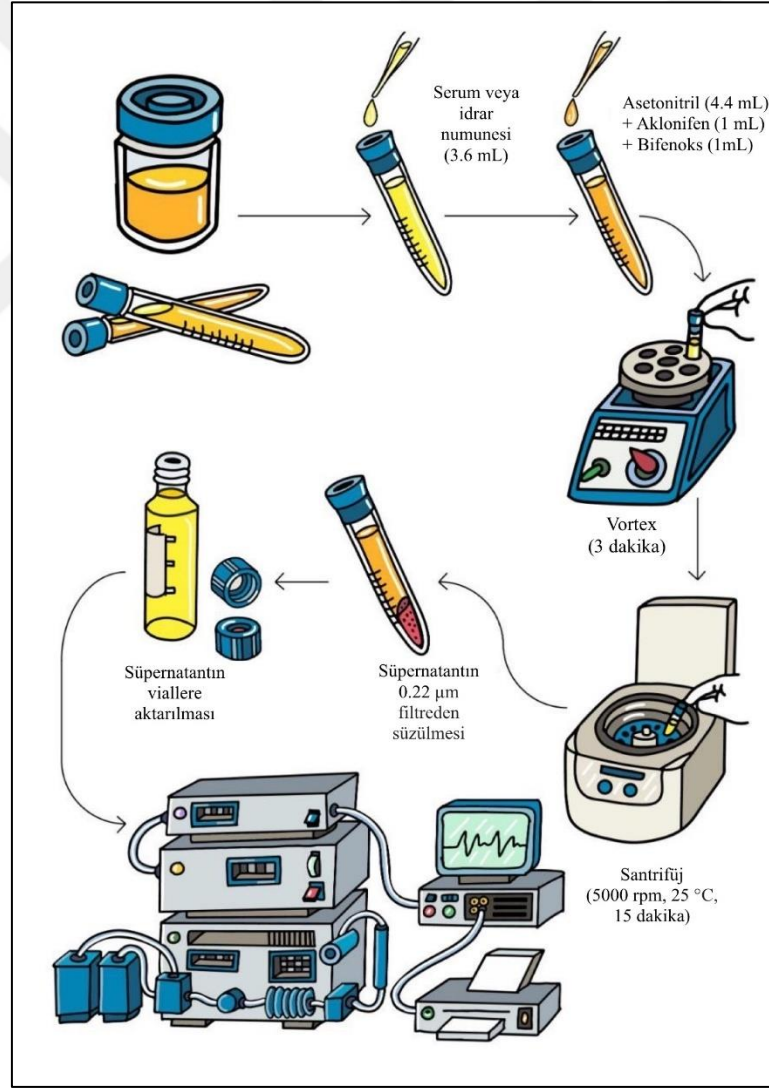
Seyreltme yöntemi matriks etkilerini en aza indirmekte ve böylece temizleme prosedürüne olan ihtiyacı ortadan kaldırmakta; bunun yanı sıra analitin tespit edilebilirliğinin azalmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, seyrelt ve enjekte et yöntemi, özellikle insanların farklı kimyasallara maruz kalmasının biyolojik olarak tespit edilmesinde ve analitik toksikolojide, iyi iyonizasyon gösteren ve yüksek tespit seviyelerine sahip maddeler için kullanılmaktadır (Petrarca ve ark, 2020).

Yukarıda sayılan avantajların yanı sıra analizlerde artan numune çıkışı, analizi gerçekleştiren kişi için çalışma esnasında fazla iş yüküne sebep olmaktadır. Analizlerde verimliliği sınırlayan önemli bir faktör, numunenin hazırlanma süresi ve cihazın numuneyi analiz etme süresidir. Numune çıktısının temizliği basamağının atlanması daha hızlı analiz, işçilik, reaktifler ve sarf malzemeleri için maliyet tasarrufuna ek olarak daha kısa raporlama süreleri gibi avantajlara yol açmaktadır (Deventer ve ark., 2014).

Adli toksikolojide önemli bir yer kaplayan doping analizlerinde veya analiz sonrası 24 saatlik bildirim sürelerinin zorunlu olduğu büyük spor etkinliklerinde hızlı analiz önem arz etmektedir (Deventer ve ark., 2014).

Seyrelt ve enjekte et yöntemi toksikolojik açıdan hızlı analiz sağlamakta, bazı acil durumlarda gerekli olan hızlı tanıyı kolaylaştırmaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan yöntem olan seyrelt ve enjekte et yöntemi aşağıda yer alan Şekil 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Seyrelt ve enjekte et yöntemi.

2.4. Spektroskopik Yöntemler ile Pestisit- HSA Etkileşiminin İncelenmesi

2.4.1. Floresans Spektrofotometrisi

Spektroskopi, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminden kaynaklanan spektrumların üretimi, ölçümü ve yorumlanması ile ilgili bilim dalıdır. Çeşitli analitik problemleri çözmek için birçok farklı spektroskopik yöntem mevcuttur. Yöntemler, analiz edilecek türe (örneğin, moleküler veya atomik spektroskopi), izlenecek radyasyon-madde etkileşiminin türüne (örneğin, absorpsiyon, emisyon veya kırınım) ve kullanılan elektromanyetik spektrum bölgesine göre farklılık gösterir. Spektroskopik yöntemler çok bilgilendiricidir ve hem nicel hem de nitel analizler için yaygın olarak kullanılır (Penner, 2017).

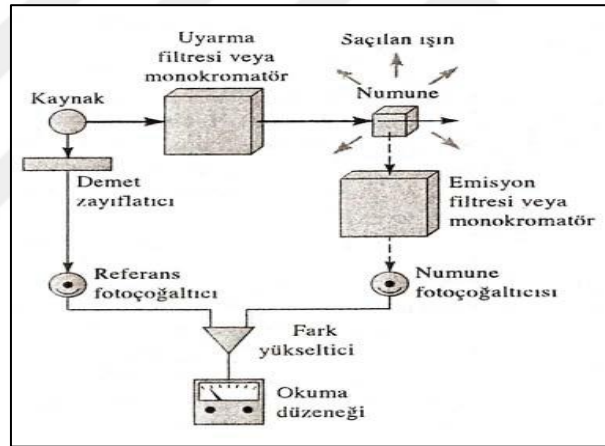
Floresans spektroskopisi hassas ve seçici bir yöntem olması sebebiyle özellikle biyokimyasal ve biyofiziksel çalışmalarda kullanılmaktadır. İncelenen molekül floresans emisyonu yapan (florofor) bir bileşik ise derişimi molekülün floresans şiddetinden hesaplanmaktadır. (Soylu, 2013).

Protein-protein etkileşimleri, ligant ve çeşitli moleküllerin proteinlere bağlanmaları ve protein derişimleri biyolojik floroforlar olarak adlandırılmakta ve yaygın olarak bu yöntemle incelenmektedir (Soylu, 2013).

Floresans en basit haliyle, seyreltik atomik buharların gösterdiği floresans üzerinden örneklendirilmektedir. Çeşitli dalga boyundaki ışınların absorpsiyonu sonrası atomların elektronları üst enerji seviyelerine uyarılmakta, bir süre sonra bu atomlar temel hallerine geri dönmektedir. Bu esnada her iki yönde de aynı iki dalga boyunda ışın yayılımı meydana gelmektedir. Frekansta değişiklik olmadan absorblanan ışının yeniden yayılmasını kapsayan bu prensip rezonans ışınması veya rezonans floresansı olarak tanımlanmaktadır (Soylu, 2013).

Analitin lüminans yapıp yapmaması ve lüminans şiddeti floresansı etkilemektedir. Floresansı etkileyen değişkenler oldukça fazladır. Lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı, analitteki hetero atom içeren bir molekül olup olmaması, molekülün düzlemsel veya rijit yapıda olması, sıcaklık, çözücü, ph, çözeltideki çözünmüş oksijen miktarı, çözeltinin derişimi vd. olarak sıralanabilir (Gümüş, 2009).

Floresans ve fosforesans spektroforometrelerinin esası UV ve görünür bölgede kullanılan bir ışık kaynağından gelen ışığın uyarma dalga boyu seçicisinden geçtikten sonra numuneye gönderilmesine dayanmaktadır. Şekil 2.2.'de fotolüminesans işlemleri için kullanılan genel bir cihazın bileşenleri gösterilmektedir (Gümüş, 2009).



Şekil 2.2. Spektroforometre genel yapısı (Gümüş, 2009).

2.4.2. HSA Özellikleri ve Ligantlara Bağlanabilirliği

Albumin, insan vücudundaki hormonlar, metabolitler ve ilaçların dağılımında temel rol oynamaktadır. Bunu yapısındaki bazı bağlanma bölgeleriyle gerçekleşmektedir. Bilinen ve en çok kullanılan albüminler sığır serum albümin (BSA) ve insan serum albümindir (HSA). HSA, ilk kez 1989 yılında Carter ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Carter ve Ho, 1994).

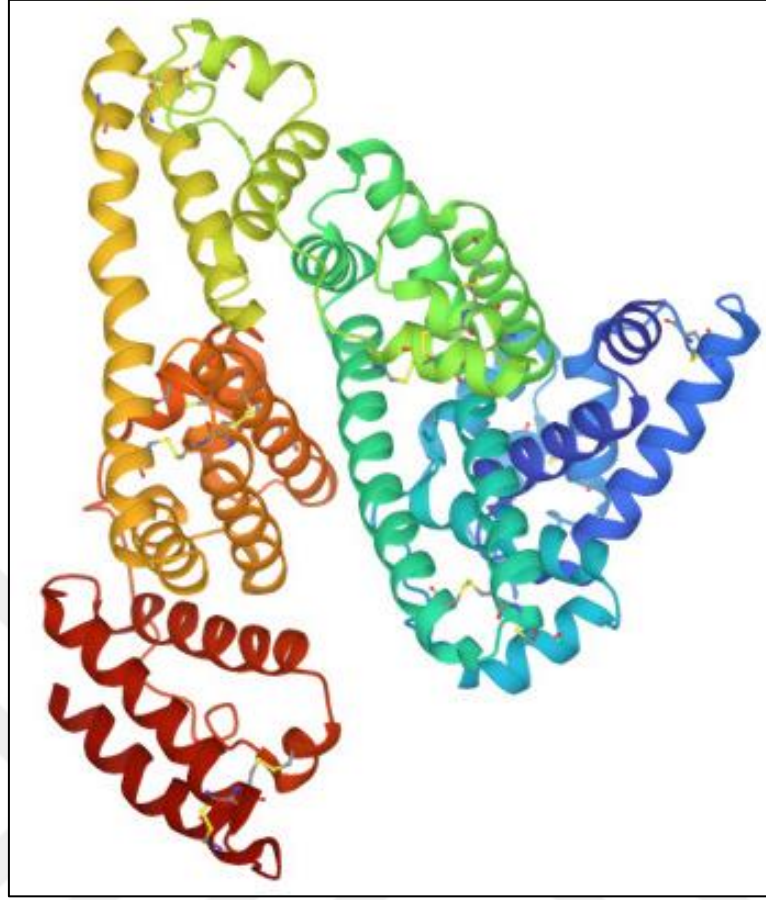
HSA, yaklaşık 66 kDa molekül ağırlığında, tek bir polipeptit zinciri içeren, 585 aminoaside sahip sarmal bir yapı sergileyen ve birden fazla bağlanma bölgesi taşıyan düşük çözünürlükte kristal yapıda bir proteindir. HSA'nın kan plazma derişimi yaklaşık 35-50 mg/mL'dir (yaklaşık 40 mg/mL), bu da HSA'yı kanda bol miktarda bulunan bir protein yapmaktadır (Chugh ve ark., 2019 ve Turgut, 2019).

HSA, bağlanma bölgelerinin fazla olması sebebiyle çeşitli yapı ve işleve sahip olan endojen ve/veya eksojen özellikte ligandlara bağlanabilmektedir. HSA'nın farklı ligantlar ile kompleks oluşturabilmesi onu endojen ve eksojen bileşikler için uygun taşıyıcı protein haline getirmektedir (Chugh ve ark., 2019 ve Turgut, 2019).

Pestisit bileşiklerinin HSA'ya bağlanması, bileşiğin emilimini, metabolizmasını, dağılımını ve atılımını etkilemekte ve sonuçta bileşiğin farmakokinetik profilini etkilemektedir (Mohamed Salem, 2017).

HSA, çok alanlı bir protein olduğu için, her biri iki alt alana (IA, IB, IIA, IIB, IIIA ve IIIB) bölünmüş olan I, II ve III olmak üzere üç benzer alandan oluşmakta ve bu alt birimler sırasıyla dört ve altı sarmallı yapılar içermektedir. (Mohamed Salem, 2017).

Amino asit dizisi ve bu alanların yapısı büyük ölçüde kıyaslanabilir olsa da her bir alan diğeriyle farklı bir şekilde etkileşime girmekte ve bu da her bir alanın asimetric oryantasyonuna yol açmaktadır (Chugh ve ark., 2019 ve Turgut, 2019).



Şekil 2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteinin yapısı (Sugio ve ark., 1998).

HSA'nın bağlanma bölgeleri üzerine birçok çalışma yapılmış olup, çoğunlukla altı alt alanın tümüne yağ asitleri ve ilaçların bağlandığı görülmüştür. Sudlow'un yapmış olduğu çalışmada ilaçlar HSA'nın I ve II olarak tanımlanan iki birincil bölgesinden (sırasıyla II A ve III A) birine bağlanmakta olup çoğunlukla birincil bağlanma bölgesi tercih edilmektedir. HSA-metal kompleksleri üzerine yapılan bağlanma çalışmalarında ise bazı metal komplekslerinin daha çok II A olarak tanımlanan HSA'nın alt bölgesindeki Triptofan aminoasidi çevresinde bulunma eğiliminde olduğu ileri sürülmüştür (Turgut, 2019).

Literatür çalışmaları incelendiğinde HSA'nın birçok pestisit ile bağlanma özellikleri ve bağlanma mekanizmaları çalışılmıştır. Örneğin karbamatlı pestisitlerin akut toksisitesinin tahmini için HSA'nın taşıyıcı protein olmasından faydalanılmış (Hou ve ark., 2022), organofosfatlı insektisitler grubundan Chlopyrifos ve herbisit

olan Triclopyr pestisit bileşiklerinin kararlı metaboliti Trikloro-2-piridinol (TCP) isimli metabolit ile HSA'nın triptofan kalıntısı olan Trp-214 isimli bölgesi arasındaki mesafe tahminin gerçekleştirilmiş (Kashanian ve ark., 2012), organofosfatlı insektisitlerden Dimetoat/ometoat ile zehirlenme sonrası HSA'nın fosforlanmış tirozinleri ve disülfid bağları incelenmiştir (Kranawetvogl ve ark., 2018).

2.4.3. Aklonifen ve Bifenoks'un HSA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi için Deneysel Çalışmalar

Tez çalışmasında kullanılan pestisitlerin HSA ile etkileşiminin belirlenmesi amacıyla 6 mg/mL HSA stok solüsyonu pH 7,4 sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. 2 mg/mL HSA üzerine artan miktarlarda pestisit numuneleri eklenerek toplam çözelti hacmi 3 mL'ye tamamlanmıştır. Yapılan çalışmada ACF için 13 nM- 7,2 µM, BİF için ise 9,7 nM- 4,6 µM aralığında derişimler kullanılmıştır (Sapmaz ve ark., 2023).

Gerçekleştirilen analizin çalışılacak dalga boyu spektrumu 220-600 nm aralığında seçilerek iç filtre etkisinin azaltılması hedeflenmiştir. ACF ve BİF'un HSA ile etkileşimleri 4 farklı sıcaklıkta Stern- Volmer grafiği kullanılarak, floresans sönmleme titrasyon sonuçları ile incelenmiştir. Floresans ölçümlerde uyarma ve emisyon için yarı genişlikleri 5 nm'de sabitlenmiştir. Işın çoğaltıcı tüpün voltajı ise 600 V olarak belirlenmiştir. Analizin tarama hızı ise 500 nm/dk'dır (Sapmaz ve ark., 2023).

Titrasyon esnasında HSA'nın floresans spektrumu (300-500 nm) ACF ve BIF'un varlığında ve yokluğunda tespit edilerek kaydedilmiştir. Sabit HSA derişimi (2 mg/mL) ve artan pestisit derişimi 3 mL'lik tüpte ayrı ayrı karıştırılmıştır. HSA'nın pestisitler olmadan mevcut floresans ömrü τ_0 olarak adlandırılmakta olup, 1.0×10^{-10} olarak elde edilmiştir (Sapmaz ve ark., 2023).

ACF/BIF-HSA etkileşiminin bağlanma sabiti (K_f) ve pestisitlerin HSA'ya bağlanma bölgesi sayısı (n), $\log (F_0-F) / F = \log K_f + n \log [Q]$ eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. ACF/BIF- HSA etkileşimindeki entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) değişimleri van't Hoff eşitliği ($\ln K_f = - \Delta H/RT + \Delta S/R$) kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG) formülü ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) ile pestisitler ile HSA'nın bağlanması aşamasında ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır (Sapmaz ve ark., 2023).

Floresans ölçümü, ligant- protein etkileşimlerinde kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir. Bu tarz etkileşimlerin esası proteinin üzerine etkileşmesi beklenen ligandların eklenmesi ile proteinin floresan spektrumundaki gerçekleşen değişikliklerinin yorumlanmasından oluşmaktadır (Molina-Bolivar ve ark., 2014).

3. BULGULAR

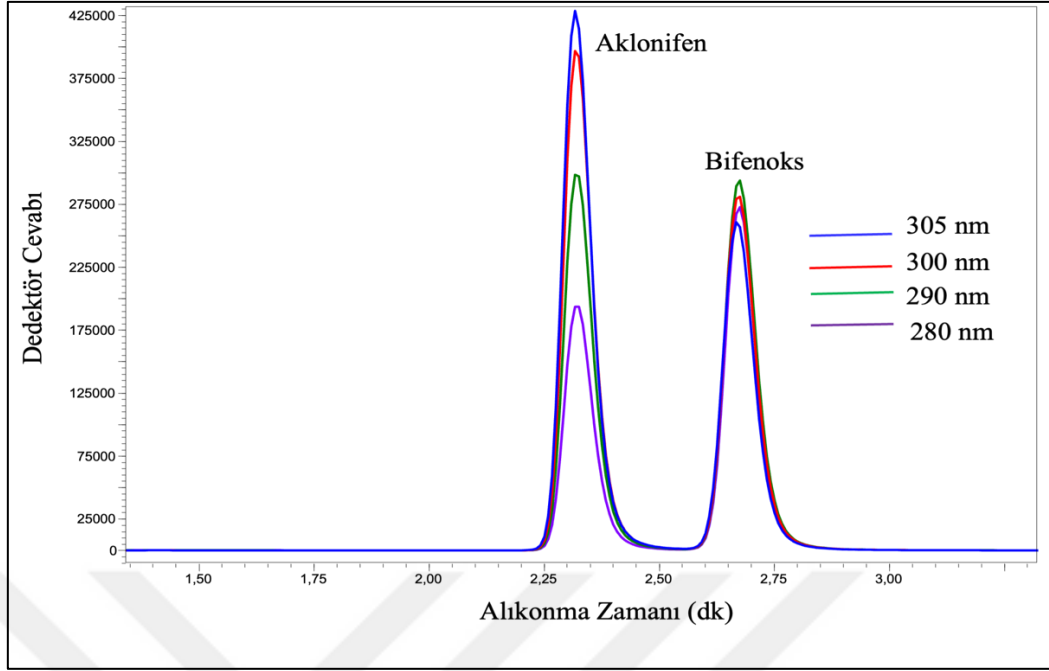
3.1. Aklonifen ve Bifenoks Pestisitleri için Geliştirilen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UV Yöntemine Ait Analiz Bulguları

3.1.1. Yöntemin Optimizasyonu

Yöntem optimizasyonu için öncelikle iki pestisit için eş zamanlı YPSK-UV yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik şartların belirlenmesi amacıyla hareketli faz denemeleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltinin molarite değişiminin analizin sonucuna etkisini inceleme çalışmaları yapılmıştır. Farklı sabit fazlar denenerek sabit fazın partikül boyutunun etkisi incelenmiştir. Bununla birlikte Sistem Uygunluk Testi (SUT) parametreleri göz önünde bulundurularak pH, akış hızı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi çalışmaları da yapılmıştır. SUT parametrelerini hesaplamak ve t_0 'ı belirlemek için fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.1.1.1. Dalga boyu optimizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan pestisit maddelerin analizi için SUT parametreleri göz önünde bulundurularak farklı dalga boyları denenmiş ve en yüksek pik alanı elde edilmeye çalışılmıştır. Sırasıyla 280, 290, 300 ve 305 nm'de pik alanları değerlendirilmiş olup en yüksek pik alanı ve pestisit maddelere ait en belirgin pikler 305 nm dalga boyunda elde edilmiştir.



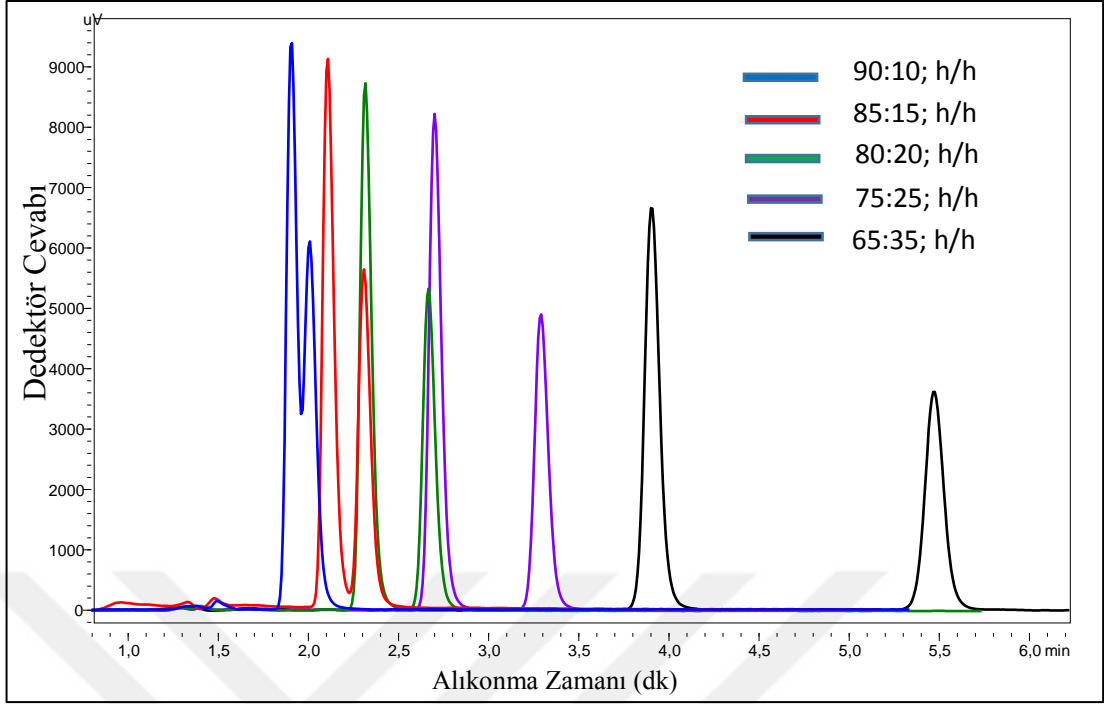
Şekil 3.1. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6,8, hareketli faz: ACN (80/20; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, 300 nm, 290 nm, 280 nm.

Çizelge 3.1. Sistem uygunluk testlerine göre dalga boyu optimizasyonunun karşılaştırılması.

Dalga Boyu (nm)	ACF					BİF						
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
305	2,32	4751	-	-	0,79	1,26	2,67	5493	2,53	1,35	1,07	1,22
300	2,32	4739	-	-	0,79	1,29	2,6	5428	2,51	1,34	1,06	1,24
290	2,32	4734	-	-	0,79	1,30	2,67	5407	2,51	1,34	1,06	1,24
280	2,32	4728	-	-	0,79	1,30	2,67	5458	2,67	1,34	1,06	1,24

3.1.1.2. Hareketli fazda organik çözücü ve tampon çözeltinin yüzdelерinin belirlenmesi

SUT parametrelerine istinaden iyi bir ayırım için kolon, akış hızı, kolon sıcaklığı ve mobil faz bileşimi parametreleri sabitlenmiş ve uygun ACN oranını bulmak için hareketli fazın organik çözücü içeriği %65, %75, %80, %85 ve %90 oranlarında değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonda 25 °C'de 1 mL/dk akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Tampon çözelti olarak 10 mM amonyum asetat kullanılmıştır. Pestisitlerin hareketli fazın içeriğinde %75 ACN mevcut iken ideal oranda ayırım sergilediği gözlenmiştir.



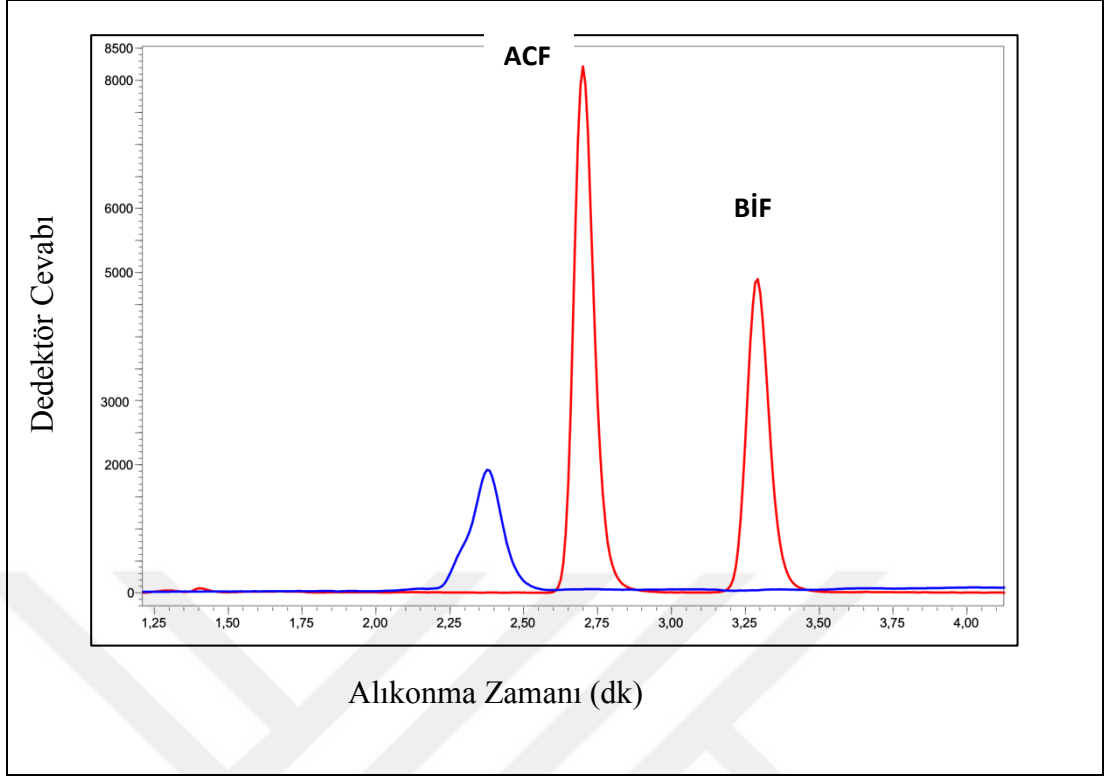
Şekil 3.2. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6.8, dalga boyu: 305 nm, hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum asetat çözücülerinin (90/10; h/h), (85/15; h/h), (80/20; h/h), (75/25; h/h), (65/35; h/h) oranlarında kullanılması ile yapılmış analiz sonucunda pestisit maddelerine ait elde edilen kromatogramlar (İlk kromatogram ACF'ye, ikincisi BİF'e aittir).

Çizelge 3.2. SUT parametrelerine göre tampon çözelti molaritesinin kıyaslanması.

Mobil faz bileşimi	ACF						BİF					
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
90	1,88	3538	-	-	0,43	1,00	1,98	2603	0,72	1,18	0,51	1,26
85	2,10	3936	-	-	1,19	1,29	2,30	4283	1,46	1,17	1,40	1,18
80	2,31	4632	-	-	0,80	1,26	2,66	5527	2,50	1,33	1,07	1,21
75	2,70	5661	-	-	1,08	1,24	3,28	7077	3,92	1,41	1,53	1,18
65	3,90	8707	-	-	1,91	1,16	5,47	11397	8,41	1,61	3,08	1,08

3.1.1.3. Organik çözücü denemesi

Tez çalışmasında hareketli faz seçimi için iki farklı çözücü ile analiz yapılmıştır. Hareketli faz / tampon çözelti oranı sabit tutulup (75/25; h/h) %75 MeOH ve %75 ACN sabit fazları ile denemeler yapılmış (Şekil 3.3), iki pestisit de eş zamanlı analizi için en uygun sabit fazın asetonitril olduğu bu denemede kesinleşmiştir. Çizelge 3.3'te de görüleceği üzere SUT parametrelerine en uygun sabit faz ACN'dir.



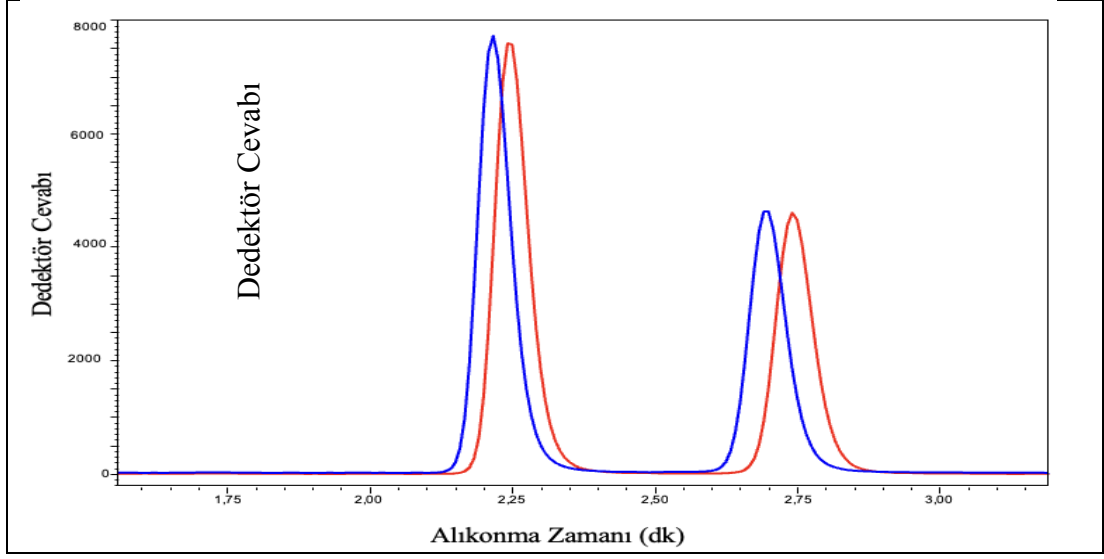
Şekil 3.3. MeOH (mavi) ve ACN (kırmızı) ile yapılmış organik çözücü çalışmasına ait kromatogram

Çizelge 3.3. Organik çözücü denemeleri

Mobil faz bileşimi	ACF						BİF					
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
MeOH	2,31	-	-	-	-	-	2,37	-	-	-	-	-
ACN	2,70	5661	-	-	1,08	1,24	3,28	7077	3,92	1,41	1,53	1,18

3.1.1.4. Farklı tampon çözeltilerin analizleri

Pestisitlerle yapılan çalışmalarda, SK çalışmalarında genellikle amonyum asetat tampon çözeltisi olarak kullanılmaktadır. SK çalışmalarında maddelerin iyi şekilde iyonlaşmasını sağlamak amacıyla amonyum format, amonyum asetat ve formik asit gibi uçucu özellikteki çözücülerin kullanılması gerekmektedir. Analizler esnasında tampon çözücü dışındaki diğer parametreler sabit tutularak analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Sistem uygunluk parametreleri değerlendirildiğinde (Çizelge 3.4) amonyum asetat tampon çözeltisi tez çalışmasında tampon çözelti olarak seçilmiştir.



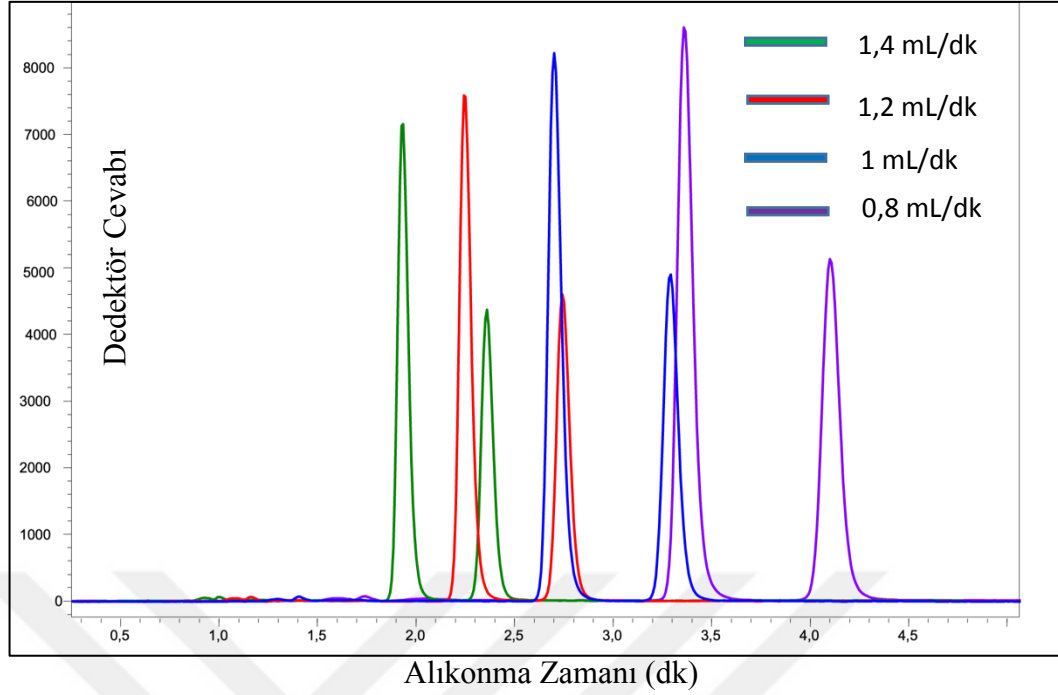
Şekil 3.4. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, 1 mL/dk akış hızı, pH: 6,8, dalga boyu: 305 nm, hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum asetat (75/25; h/h) (kırmızı) ve hareketli faz: ACN ve Tampon: 10 mM Amonyum format (75/25; h/h) (mavi) tampon çözücülerini ile yapılmış analizler sonucunda pestisit maddelerine ait elde edilen kromatogramlar.

Çizelge 3.4. Farklı tampon çözelti analizlerine ait sonuçlar.

Tampon Çözelti	ACF					BİF						
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
Amonyum Asetat	2,70	5661	-	-	1,08	1,24	3,28	7077	3,92	1,41	1,53	1,18
Amonyum Format	2,21	4751	-	-	1,00	1,25	2,69	5983	3,58	1,44	1,44	1,19

3.1.1.5. Akış hızı optimizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5µm) kolonun çalışma basınç değeri dikkate alınarak akış hızı denemeleri yapılmıştır. Akış hızı 0,8 mL/dk- 1,4 mL/dk (Şekil 3.5) arasında değiştirilerek SUT parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). 1,2 mL/dk akış hızında diğer kolonlardan daha düşük bir basınç değeri gözlenmiştir. Bu sebeple 1,2 mL/dk akış hızı optimum akış hızı olarak seçilmiştir.



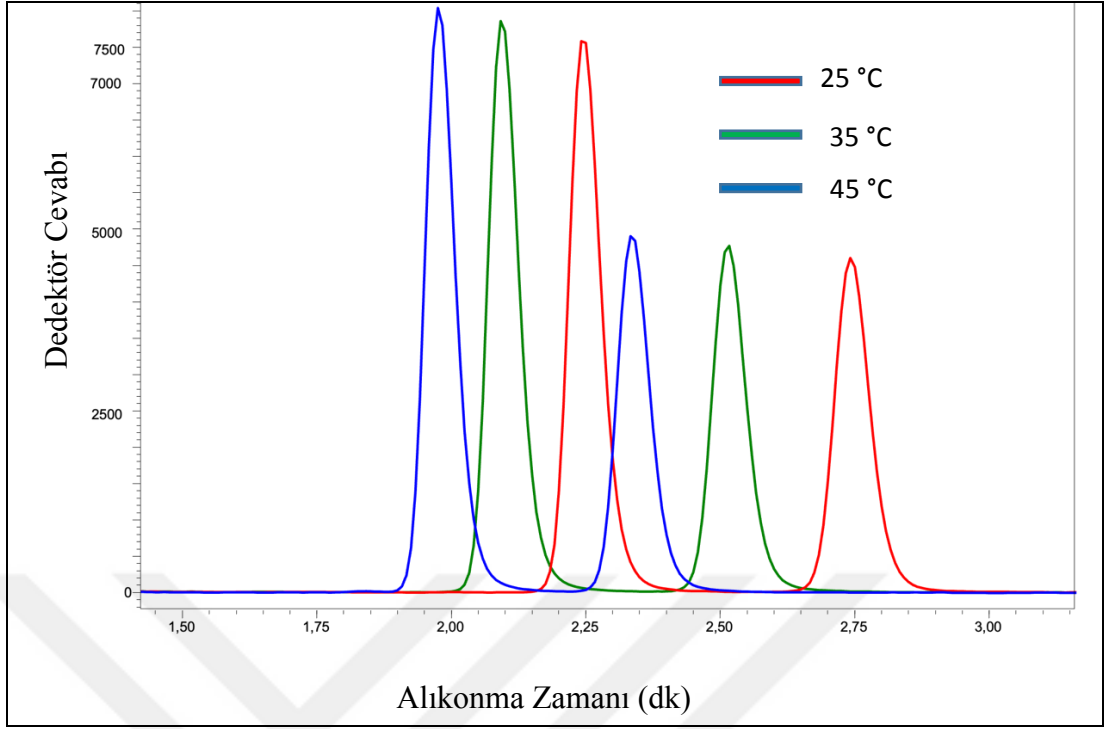
Şekil 3.5. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, 25 °C, pH: 6.8, hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, akış hızı (sağdan sola sırasıyla) 0,8 mL/dk, 1 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,4 mL/dk ile yapılan analizlere ait kromatogramlar (İlk kromatogram piki Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir).

Çizelge 3.5. SUT parametrelerine göre akış hızının kıyaslanması.

Akış Hızı (mL/dk)	ACF						BİF					
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
0,8	3,36	6973	-	-	1,10	1,24	4,10	8192	4,30	1,41	1,56	1,18
1	2,70	5661	-	-	1,08	1,24	3,28	7077	3,92	1,41	1,53	1,18
1,2	2,24	5022	-	-	1,08	1,24	2,74	6003	3,70	1,42	1,54	1,18
1,4	1,92	4280	-	-	1,08	1,26	2,35	5177	3,43	1,43	1,55	1,18

3.1.1.6. Kolon sıcaklığının belirlenmesi

Optimizasyon için optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi için kolon sıcaklığı 25 °C, 35 °C ve 45 °C yapılarak analiz sonuçları karşılaştırılmıştır (Şekil 3.6). Farklı sıcaklıklardaki analiz sonuçları karşılaştırıldığında (Çizelge 3.6) sıcaklık arttıkça iki pestisit için analiz süresi 0,68 dk gibi bir süre kısaldığı için, ayırım gücü, seçicilik ve kolon etkinlikleri arasında da fark bulunmadığı için enerji tasarrufu sağlayabilmek adına kolon sıcaklığı 25 °C olarak seçilmiştir.



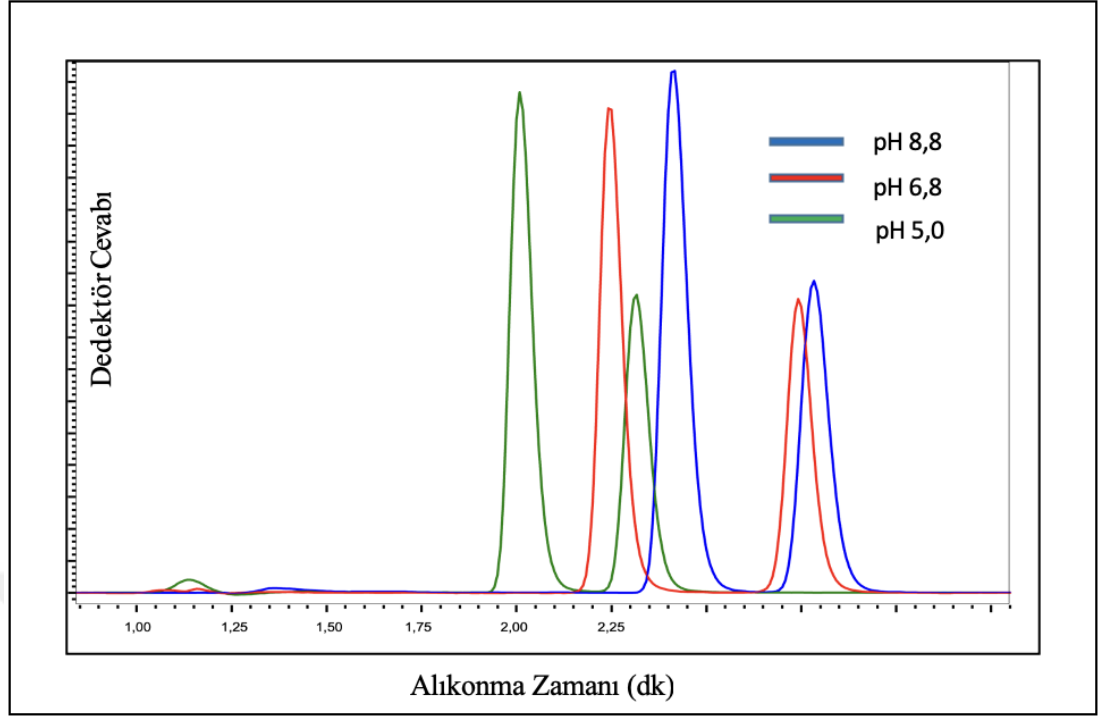
Şekil 3.6. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, akış hızı 1,2 mL/dk, pH: 6,8, hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, sıcaklık sırasıyla (sağdan sola) 45 °C, 35 °C, 25 °C ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar (İlk kromatogram Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir).

Çizelge 3.6. SUT parametrelerine göre kolon sıcaklığının kıyaslanması.

Sıcaklık	ACF						BİF					
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
25 °C	2,24	5022	-	-	1,08	1,24	2,74	6003	3,70	1,42	1,54	1,18
35 °C	2,09	4508	-	-	0,96	1,25	2,51	5488	3,22	1,40	1,35	1,19
45 °C	1,97	4111	-	-	0,85	1,25	2,33	4990	2,81	1,38	1,19	1,20

3.1.1.7. Tampon çözeltinin pH'sını belirleme çalışmaları

Kolon, sabit faz ve hareketli fazlar belirlendikten sonra bu fazların oranları da optimize edilmiş olduğu için tampon çözeltinin pH'sının analizin optimizasyonuna etkisini görmek amacıyla pH'sı sırasıyla 8,8, 6,8 ve 5,0'e ayarlanmış ve incelenmiştir (Şekil 3.7). Analiz sonuçları incelendiğinde optimum pH değeri 6,8 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon, akış hızı 1,2 mL/dk., hareketli faz: ACN (75:25; h/h), Tampon: 10 mM Amonyum asetat, dalga boyu 305 nm, sıcaklık 25 °C, pH: 8,8, pH: 6,8, pH: 5,0 ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar (İlk kromatogram piki Aklonifen'e, ikincisi Bifenoks'a aittir).

Çizelge 3.7. SUT parametrelerine göre tampon çözelti pH'sının kıyaslanması.

pH	ACF						BİF					
	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t	t_r (dk)	N	R_s	α	k'	t
5,0	2,00	3902	-	-	0,76	1,26	2,31	4595	2,30	1,35	1,03	1,23
6,8	2,24	5022	-	-	1,08	1,24	2,74	6003	3,70	1,42	1,54	1,18
8,8	2,41	4600	-	-	0,77	1,26	2,78	5312	2,50	1,35	1,04	1,22

Optimizasyon çalışmaları sonucunda ACF ve BİF'in eş zamanlı analizi için en uygun optimum şartlar Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Pestisitlerin eş zamanlı analizi için optimize edilmiş kromatografik şartlar.

Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon tipi	KİNİTEX EVO C 18 (150 mm x 4,6mm x 5 µm)
Hareketli faz bileşimi	ACN: Tampon 10 mM Amonyum asetat(75/25; h/h)
pH	6,8
Sıcaklık (°C)	25°C
Akış hızı (mL/dk)	1,2 mL/dk
Enjeksiyon hacmi (µL)	10 µL
Dalga boyu (nm)	305 nm

3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

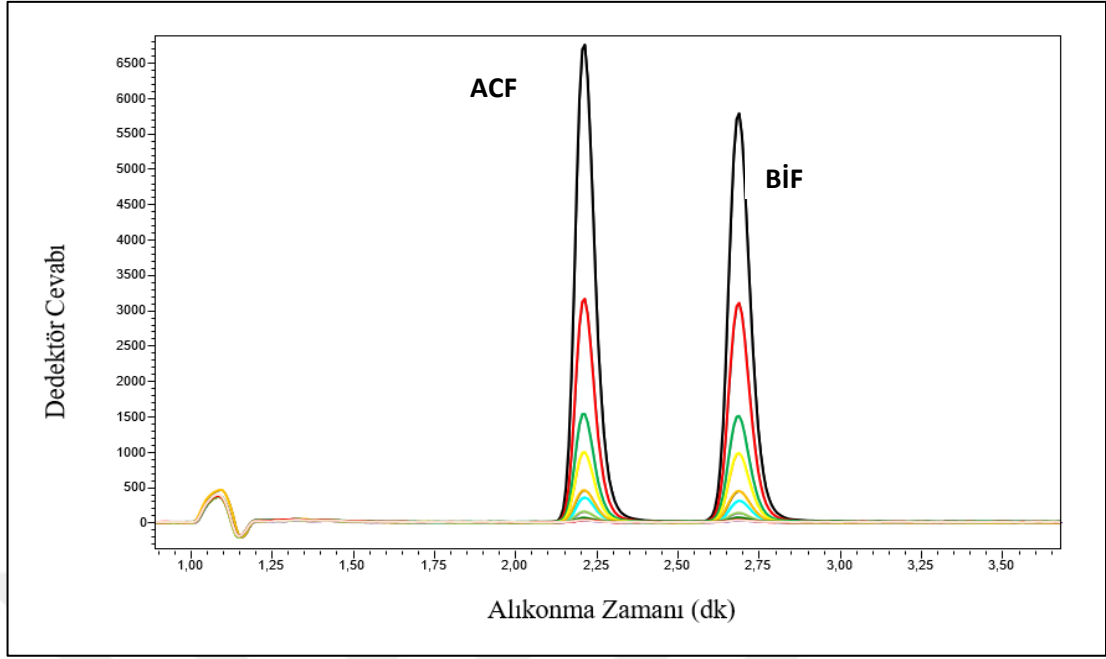
Geliştirilen yöntem için optimize edilen koşullarda SUT parametreleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.9. SUT parametreleri.

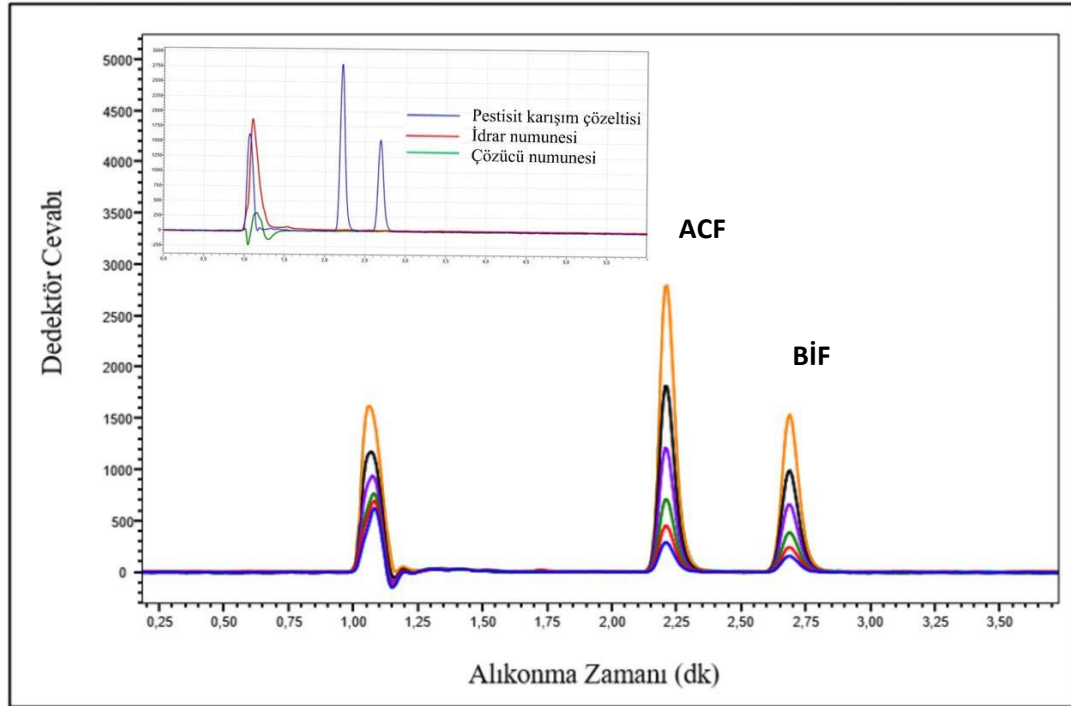
Parametre	ACF	BİF
Alıkonma zamanı (t_r)	2,24	2,74
Kolon etkinliği (N; tabaka/metre)	5022	6003
Seçicilik (α)	-	1,42
Ayırım Gücü (R_S)	-	3,70
Kapasite faktörü (k)	1,08	1,54
Kuyruklanma faktörü (t)	1,24	1,18

3.1.3. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

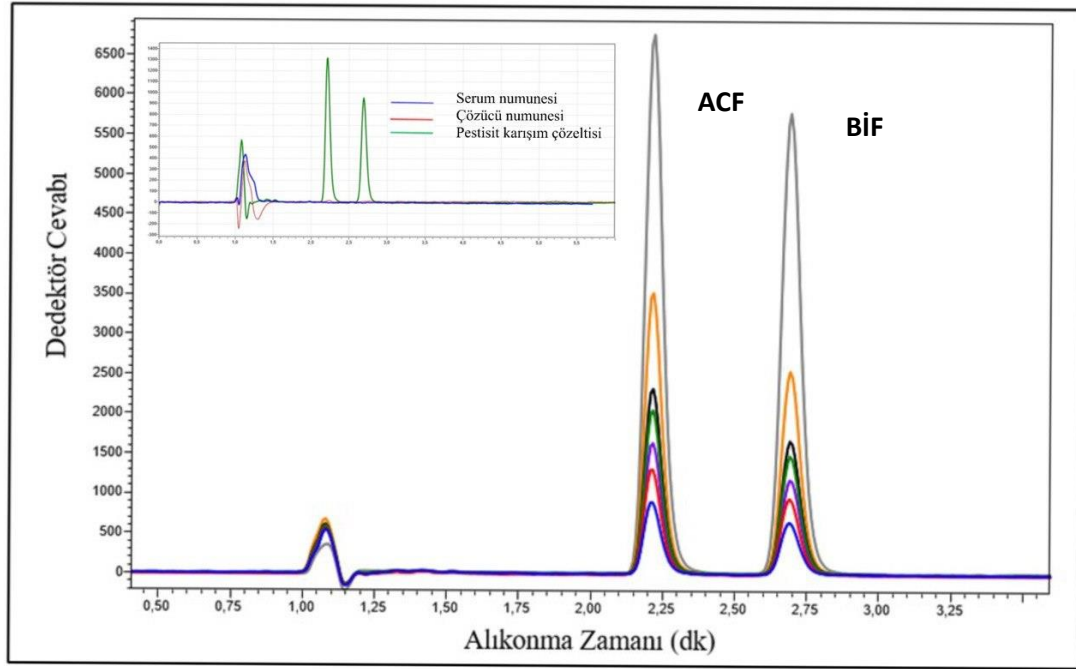
Tez çalışmasının bu aşamasında ACF ve BİF için artan derişimlerde (0,001 ppm, 0,0025 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm ve 1 ppm) karışım çözeltisi hazırlanarak 5 tekrarlı olacak şekilde optimum koşullarda sisteme enjekte edilmiştir. Derişime karşılık tekrarlı sonuçlardan elde edilen ortalama pik alanları grafiğe geçirilerek her bir madde için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş (Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10) ve validasyon parametreleri hesaplanarak Çizelge 3.10'da sunulmuştur.



Şekil 3.8. Optimum koşullarda bulk çözücü ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,001 ppm, 0,0025 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm artan derişimlerde).



Şekil 3.9. Optimum koşullarda idrar numunesi ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,25 ppm ve 0,5 ppm artan derişimlerde) İç şekil: Pestisit karışım çözeltisi, idrar numunesi ve çözücü numunesi kromatogramları.

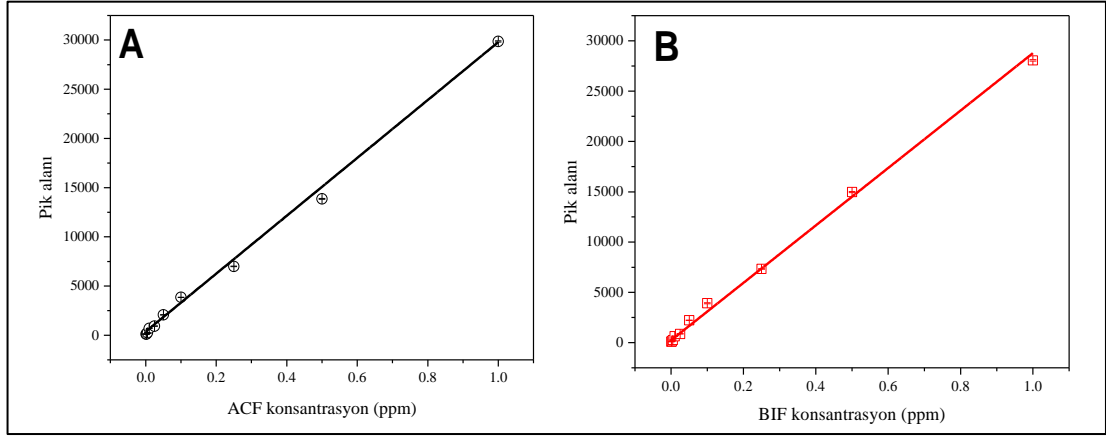


Şekil 3.10. Optimum koşullarda serum numunesi ile yapılan kalibrasyon kromatogramları (0,01 ppm, 0,025 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm ve 1 ppm artan derişimlerde) İç şekil: Serum numunesi, çözücü numunesi ve Pestisit karışım çözeltisi kromatogramları.

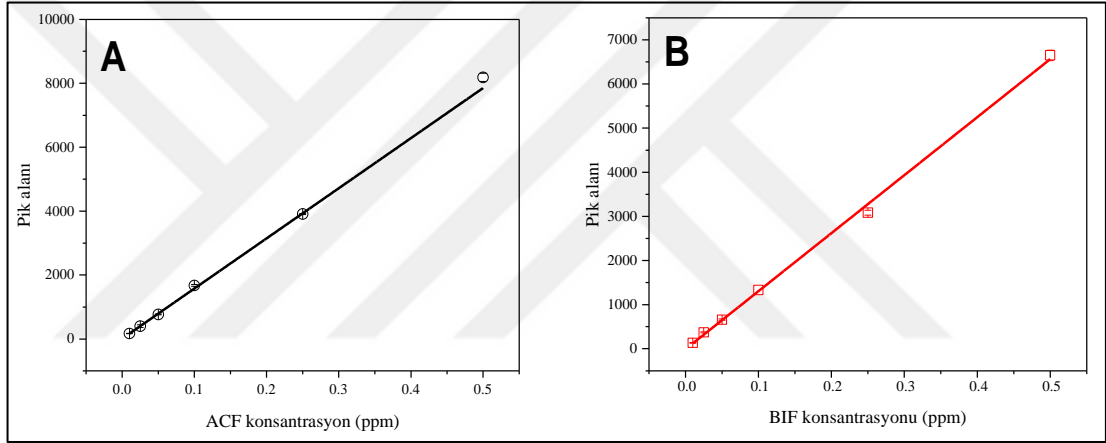
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan çözücü, idrar ve serum örneklerinde validasyon parametreleri.

Validasyon Parametresi	Çözücü (Bulk)		İdrar		Serum	
	ACF	BİF	ACF	BİF	ACF	BİF
Doğrusal aralık (ppm)	0,001-1		0,01-0,5		0,01-1	
Eğim	29414,4	28545,6	15864,75	13147,15	35092,10	29187,37
Kesişim	376,40	239,90	10,20	10,11	4002,10	3478,75
Korelasyon katsayısı	0,991	0,994	0,996	0,998	0,997	0,990
Teşhis sınırı (ppm)	$3,2 \times 10^{-4}$	3×10^{-4}	$2,97 \times 10^{-3}$	$3,11 \times 10^{-3}$	$2,86 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-3}$
Tayin alt sınırı (ppm)	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Gün içi tekrarlanabilirlik (% BSS) *	0,81	0,75	0,95	1,11	0,92	1,00
Günler arası tekrarlanabilirlik (% BSS) *	1,21	1,11	1,34	1,48	1,27	1,39

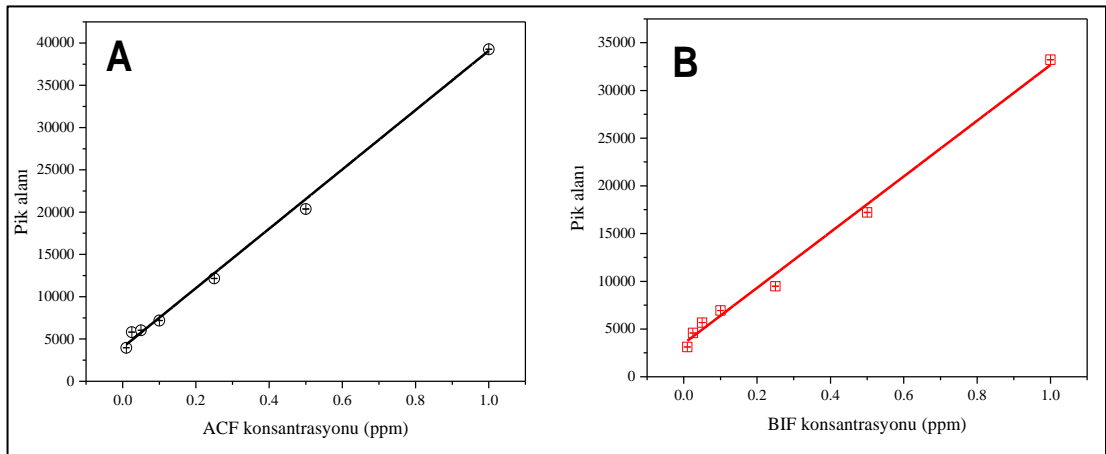
* 5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.



Şekil 3.11. Çözücü (Bulk) validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks.



Şekil 3.12. İdrar ortamının validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks.



Şekil 3.13. Serum validasyonunda kalibrasyon doğruları A) Aklonifen, B) Bifenoks.

Yöntem optimizasyon ve validasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra yöntemin doğruluğunu ve teze konu serum ve idrar örneklerindeki girişim maddelerinin ya da farklı maddelerin, pestisitlerin analizlerinde girişim etkilerini tespit etmek amacıyla geri kazanım yöntemleri çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, ACF ve BİF içeren pestisit numuneleri, serum ve idrar numuneleri ile geri kazanım çalışmaları kör matris ortamına analizi yapılacak maddelerin ilave edilmesi ile yapılmıştır. Geri kazanım çalışmalarının sonucunda standart maddelerin kalibrasyon denkleminde yerlerine yerleştirmek suretiyle % geri kazanım cinsinden hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 3.11 ve 3.12).

Çizelge 3.11. Serum için geri kazanımlar.

Parametre	ACF			BİF		
Bilinen miktar (ppm)	0,3			0,3		
Bulunan miktar (ppm)	305x10 ⁻³			307,33x10 ⁻³		
BSS (%)*	1,64			2,09		
BH (%)	-1,67			-2,44		
İlave edilen miktar (ppm)	450x10 ⁻³	600x10 ⁻³	750x10 ⁻³	450x10 ⁻³	600x10 ⁻³	750x10 ⁻³
Bulunan miktar (ppm)	459x10 ⁻³	604,33 x10 ⁻³	753,33 x10 ⁻³	454,6 x10 ⁻³	608,33 x10 ⁻³	751,33 x10 ⁻³
Geri kazanım (%)	102,0	100,72	100,44	101,02	101,39	100,18
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,78	0,67	0,33	1,01	0,41	0,33
Geri kazanıma ait BH (%)	-2,0	-0,72	-0,44	-1,02	-1,39	-0,18

* 5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

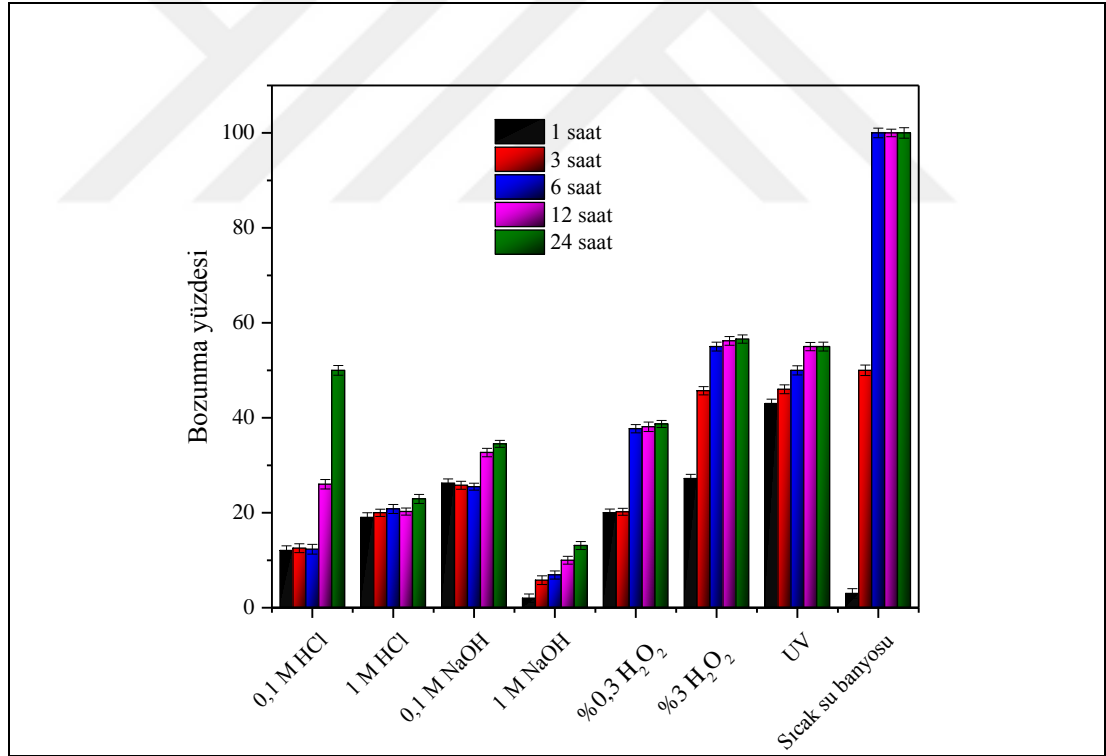
Çizelge 3.12. İdrar için geri kazanımlar

Parametre	ACF			BİF		
Bilinen miktar (ppm)	5 x10 ⁻²			5 x10 ⁻²		
Bulunan miktar (ppm)	49,87 x10 ⁻³			51,17 x10 ⁻³		
BSS (%)*	1,52			1,49		
BH (%)	0,27			-2,33		
İlave edilen miktar (ppm)	7,5 x10 ⁻²	0,1	12,5 x10 ⁻²	7,5 x10 ⁻²	0,1	12,5 x10 ⁻²
Bulunan miktar (ppm)	74,67 x10 ⁻³	102,2 x10 ⁻³	125,33 x10 ⁻³	73,0 x10 ⁻³	102,0 x10 ⁻³	125,17 x10 ⁻³
Geri kazanım (%)	99,55	102,2	100,27	97,33	102,0	100,13
Geri kazanıma ait BSS (%)*	2,79	1,67	2,00	2,74	0,98	3,44
Geri kazanıma ait BH (%)	0,44	-2,20	-0,27	2,67	-2,0	-0,13

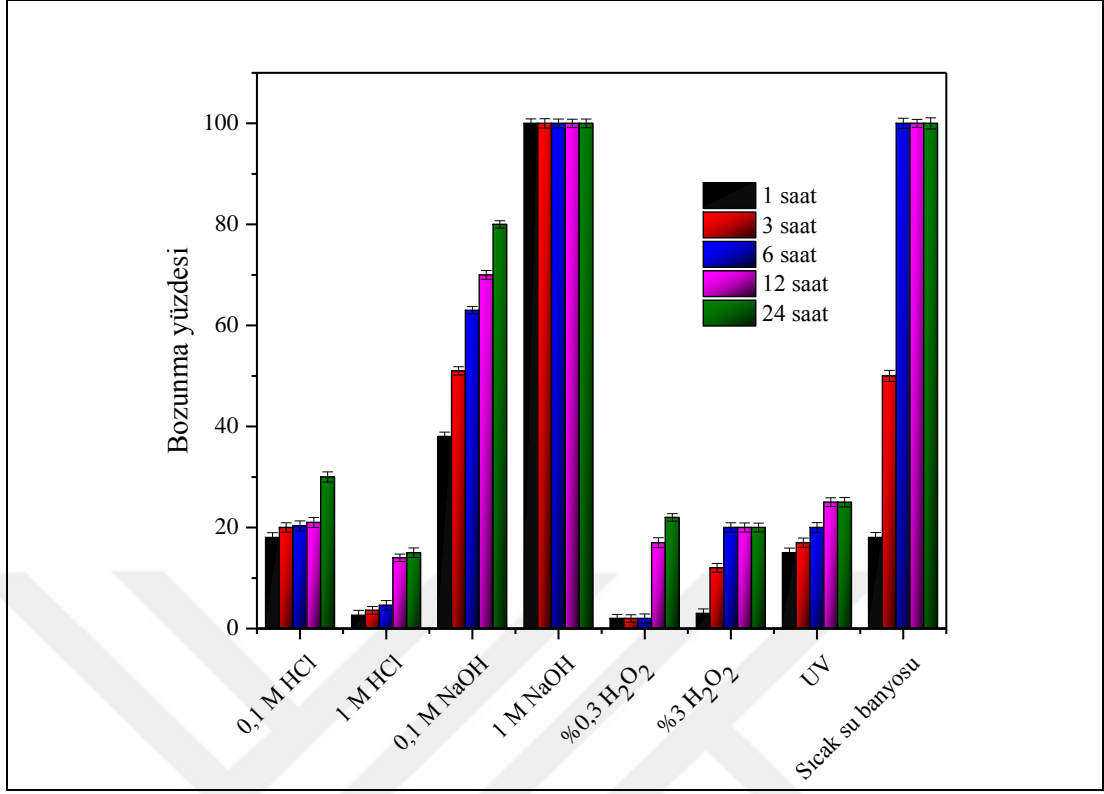
3.1.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Kalibrasyon çalışmalarının tamamlanmasının akabinde yöntem seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla hızlandırılmış bozundurma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bozundurma deneyler esnasında %0,3 ve %3'lük H_2O_2 ile oksidasyon, 0,1 M ve 1 M NaOH ile baz hidroliz, 0,1 M ve 1 M HCl ile asit hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiş, ayrıca pestisit maddeleri 254 nm UV ışık altında ve sıcak su banyosunda (55 °C) 1, 3, 6, 9 ve 12 saat süreyle bozundurma testine maruz kalmışlardır. Bozunan pestisit miktarı ile bozundurulmamış pestisit miktarı kıyaslanarak çalışılan pestisitlere ait bozunma yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).



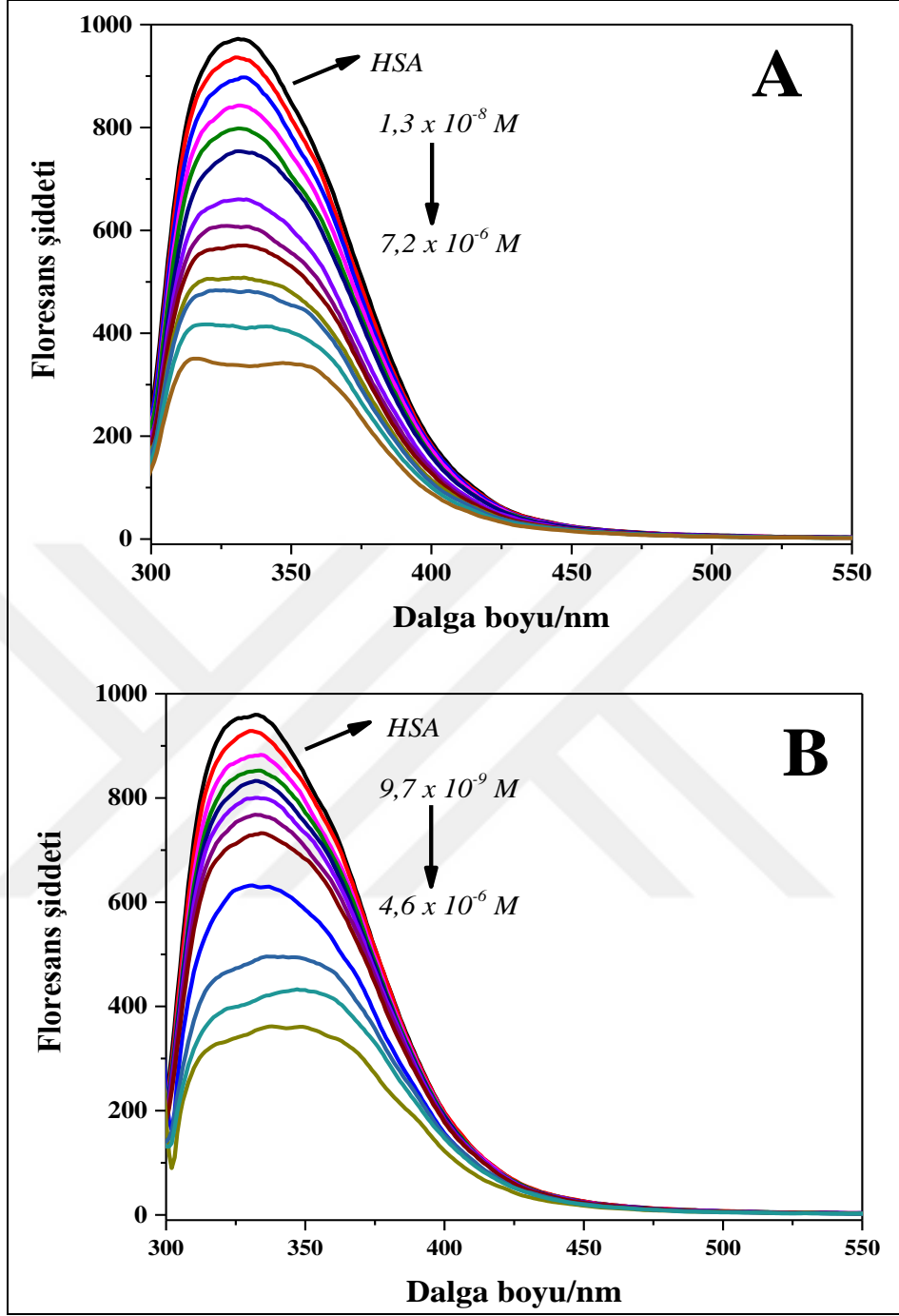
Şekil 3.14. Aklonifen için hızlandırılmış bozunma çalışmaları.



Şekil 3.15. Bifenoks için hızlandırılmış bozunma çalışmaları.

3.2. Aklonifen ve Bifenoks Pestisitlerinin HSA ile Olan Etkileşimlerini İncelemek İçin Kullanılan Spektroskopik Yöntemlere Ait Bulgular

Bu çalışmalar ACF ve BİF'un HSA'nın floresanında herhangi bir indüklemeye neden olup olmadığını gözlemlemek için gerçekleştirilmiştir. HSA-pestisit bileşiklerindeki etkileşimlerinin floresans sönümlenme mekanizmalarının anlaşılabilmesi amacıyla $3 \mu\text{M}$ konsantrasyondaki HSA üzerine $1,3 \times 10^{-8}$ - $7,2 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ aralığında artan derişimlerde Aklonifen ve $9,7 \times 10^{-9}$ - $4,6 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ aralığında artan derişimlerde Bifenoks pestisit bileşiği ilavesi ile floresans şiddetinin düştü gözlenmiş olup, Şekil 3.16'da gösterilmektedir. HSA 280 nm'de uyarıldığında, tek başına maksimum floresan emisyonu gösterdiği pik 336 nm olarak kaydedilmiştir (Sapmaz ve ark., 2023).



Şekil 3.16. HSA üzerine artan derişimlerde Aklonifen ve Bifenoks ilavesi sonucu gerçekleşen floresans sönümlenme sonuçları.

HSA'nın tek başına floresans ölçümü sonrası, çözeltiye artan miktarlarda ACF ve BİF eklenmiştir, bu aşamada emisyon zirvesinde herhangi bir kayma olmamış, HSA floresansı aşamalı olarak sönümlenmiştir (Sapmaz ve ark., 2023).

HSA- pestisit etkileşimleri için floresans sönümlenme verileri 288 K, 293 K, 298 K ve 303 K sıcaklıklarında Stern Volmer denklemi (Eşitlik 3.1.) kullanılarak değerlendirilmiştir.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Pestisit] = 1 + K_q \tau_0 [Pestisit] \quad (3.1)$$

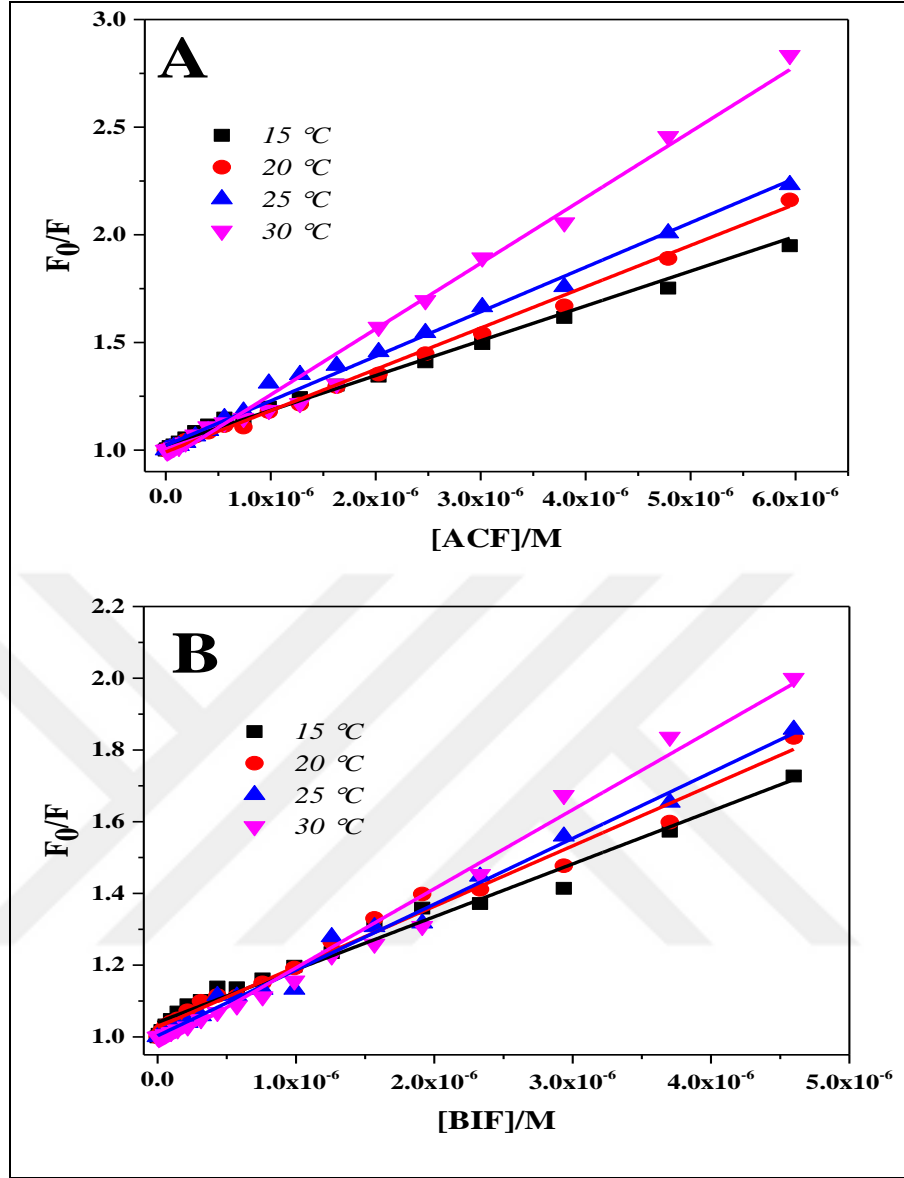
Stern-Volmer eşitliğindeki F_0 ve F değerleri sırasıyla pestisit bileşiği yokluğundaki ve varlığındaki HSA çözeltisinin floresans şiddetini, K_q proteinin sönümlenme hız sabitini, τ_0 pestisit yokluğundaki floresansın ömrünü, $[Pestisit]$ protein-pestisit karışım çözeltisindeki pestisit konsantrasyonunu ve K_{SV} ise Stern-Volmer sönümlenme sabitini göstermektedir.

En yüksek ACF konsantrasyonunda (7,2 μM) HSA floresans şiddetinde %40 azalma gözlenirken, BİF için en yüksek derişim olan 4,6 μM derişiminde yaklaşık %50 azalma görülmüştür (Sapmaz ve ark., 2023).

ACF- HSA ve BİF- HSA etkileşimlerine ait Stern-Volmer grafikleri, floresans verilerinin 288 K, 293 K, 298 K ve 303 K’de incelenmesiyle elde edilmiştir. Bu grafiklerin eğiminden elde edilen K_{sv} değerleri Çizelge 3.13.’te gösterilmiş olup söz konusu grafikler Şekil 3.17’de gösterilmektedir (Sapmaz ve ark., 2023).

İç filtre etkisini en aza indirmek için ise ACF-HSA ve BİF-HSA etkileşimlerine ait floresans şiddetleri Eşitlik 3.2. kullanılarak düzeltilmiştir.

$$F_{Düzeltilmiş} = F_{Gözlenen} \exp [(A_{ex} + A_{em})/2] \quad (3.2)$$



Şekil 3.17. (A) Aklonifen–HSA ve (B) Bifenoks–HSA etkileşimleri olmak üzere dört farklı sıcaklıkta floresan sönümlenme titrasyonundan elde edilen Stern-Volmer grafikleri

HSA proteininin ACF ve BİF pestisit molekülleri ile etkileşimi sonucunda sönümlenme mekanizmasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 15°C (288 K), 20°C (293 K) ve 25°C (298 K) ve 30°C (303 K)'de HSA ile ACF'nin etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $1,62 \times 10^5$, $1,88 \times 10^5$, $2,07 \times 10^5$ ve $3,05 \times 10^5$ K_q değerleri de sırasıyla $1,62 \times 10^{15}$, $1,92 \times 10^{15}$, $2,07 \times 10^{15}$ ve $3,05 \times 10^{15}$ bulunmuştur. HSA ile BİF'un etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $1,60 \times 10^5$, $1,79 \times 10^5$, $1,82 \times 10^5$ ve $2,10 \times 10^5$ K_q değerleri de sırasıyla $1,60 \times 10^{15}$, $1,79 \times 10^{15}$, $1,82 \times 10^{15}$ ve $2,10 \times 10^{15}$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.13. Aklonifen ve Bifenoks'un HSA ile olan etkileşimlerine ait K_{sv} değerleri

Sıcaklık (K)	ACF			BİF		
	R^2	K_{sv}	K_a	R^2	K_{sv}	K_a
288	0,990	$1,62 \times 10^5$	$1,62 \times 10^{15}$	0,990	$1,60 \times 10^5$	$1,60 \times 10^{15}$
293	0,994	$1,88 \times 10^5$	$1,92 \times 10^{15}$	0,990	$1,79 \times 10^5$	$1,79 \times 10^{15}$
298	0,992	$2,07 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{15}$	0,992	$1,82 \times 10^5$	$1,82 \times 10^{15}$
303	0,990	$3,05 \times 10^5$	$3,05 \times 10^{15}$	0,990	$2,10 \times 10^5$	$2,10 \times 10^{15}$

Statik ve dinamik sönümleme, HSA'nın pestisitler tarafından söndürülmesiyle ortaya çıkmakta olup, sıcaklık değişimiyle beraber K_{sv} değerlerinde gerçekleşen değişim, reaksiyonun dinamik veya statik olduğu hakkında fikir vermektedir (Sapmaz ve ark., 2023).

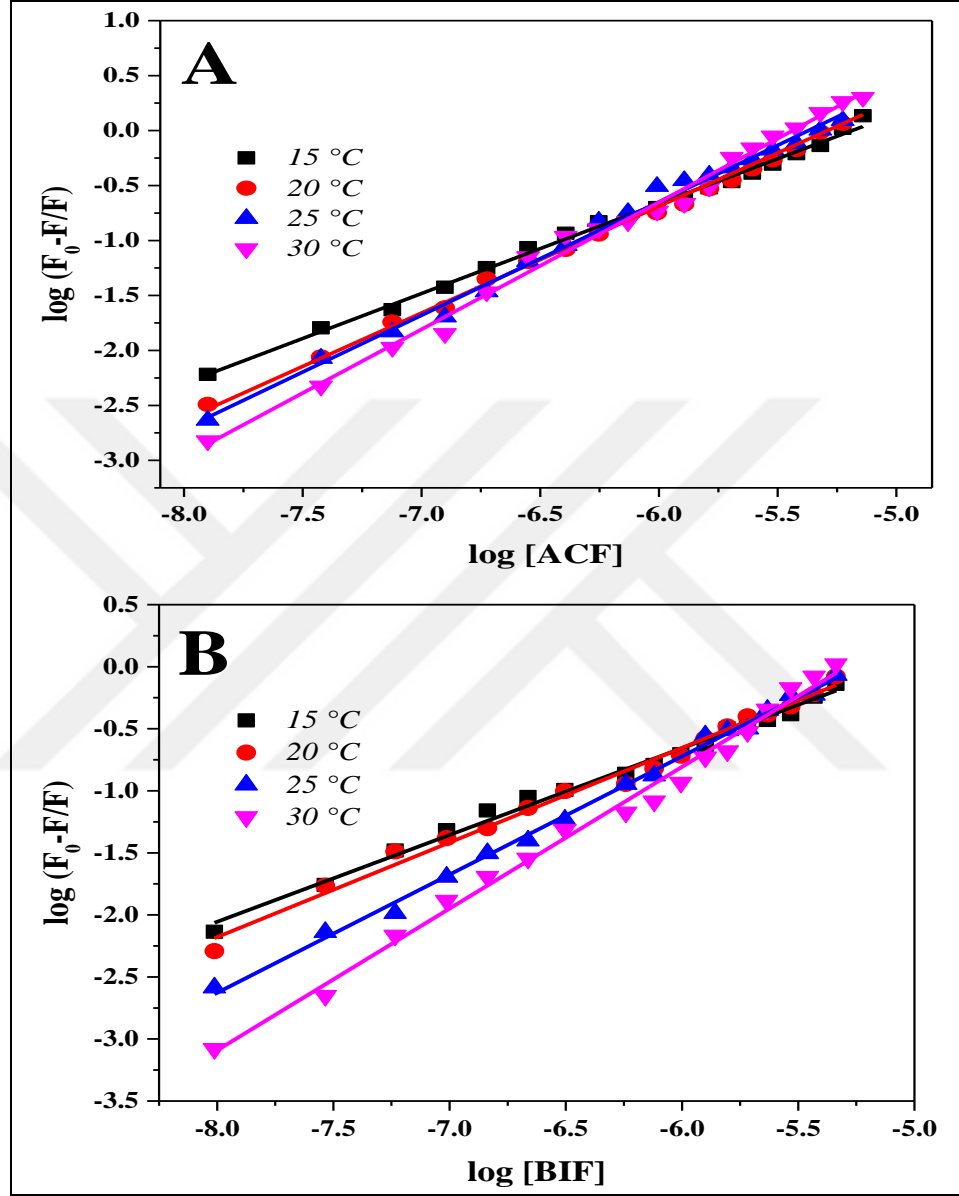
Çizelge 3.13'te de gösterildiği üzere çözeltinin sıcaklığının artması pestisit-protein etkileşim sistemine ait K_{sv} değerinin artmasına yol açmıştır. Artan sıcaklıkla birlikte K_{sv} değerlerinin artması, çalışılan protein-pestisit sistemindeki floresan sönümleme mekanizmasının dinamik söndürmeden kaynaklandığını göstermektedir.

Sönüm mekanizması belirlendikten sonra her bir protein-pestisit etkileşimi için pestisitlerle protein molekülleri arasındaki bağlanma reaksiyonlarıyla ilgili detaylı bilgi elde edilebilmektedir. ACF-HSA ve BİF-HSA etkileşimleri için farklı ısılarda protein molekülü başına pestisitlerin bağlanma bölgelerinin sayısı (n) ve bağlanma sabitleri (K_f), aşağıdaki Eşitlik 3.3 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_f + n \log [Pestisit] \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte yer alan F_0 , F ve $[Pestisit]$ parametreleri Stern-Volmer eşitliğinde tanımlanan parametrelerle aynıdır. F_0 ve F sırasıyla pestisit yokluğundaki ve varlığındaki protein çözeltisinin floresans şiddeti, $[Pestisit]$ protein-pestisit karışım çözeltisindeki pestisit konsantrasyonunu ifade etmektedir. Eşitlik 3.3'e göre, $\log (F_0 - F)/F$ 'ye karşı $\log[Pestisit]$ grafiğinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerlerinden yararlanılarak K_f ve n değerleri hesaplanmıştır.

15°C, 20°C, 25°C ve 30°C’de ACF-HSA ve BİF-HSA etkileşimleri için çizilen $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log[\text{Pestisit}]$ grafiği aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 3.18. (A) Aklonifen–HSA ve (B) Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait 4 farklı sıcaklıktaki floresans sönmleme titrasyonu ile gerçekleştirilen çalışmalara ait çift logaritmik grafikler.

ACF-HSA ve BİF-HSA etkileşimleri için $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log[\text{Pestisit}]$ grafiklerindeki verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerleri aracılığıyla hesaplanmış K_f ve n değeri aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.14. Aklonifen–HSA ve Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait pH 7.4’te 4 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmalara ait bağlanma sabitlerine ait değerler.

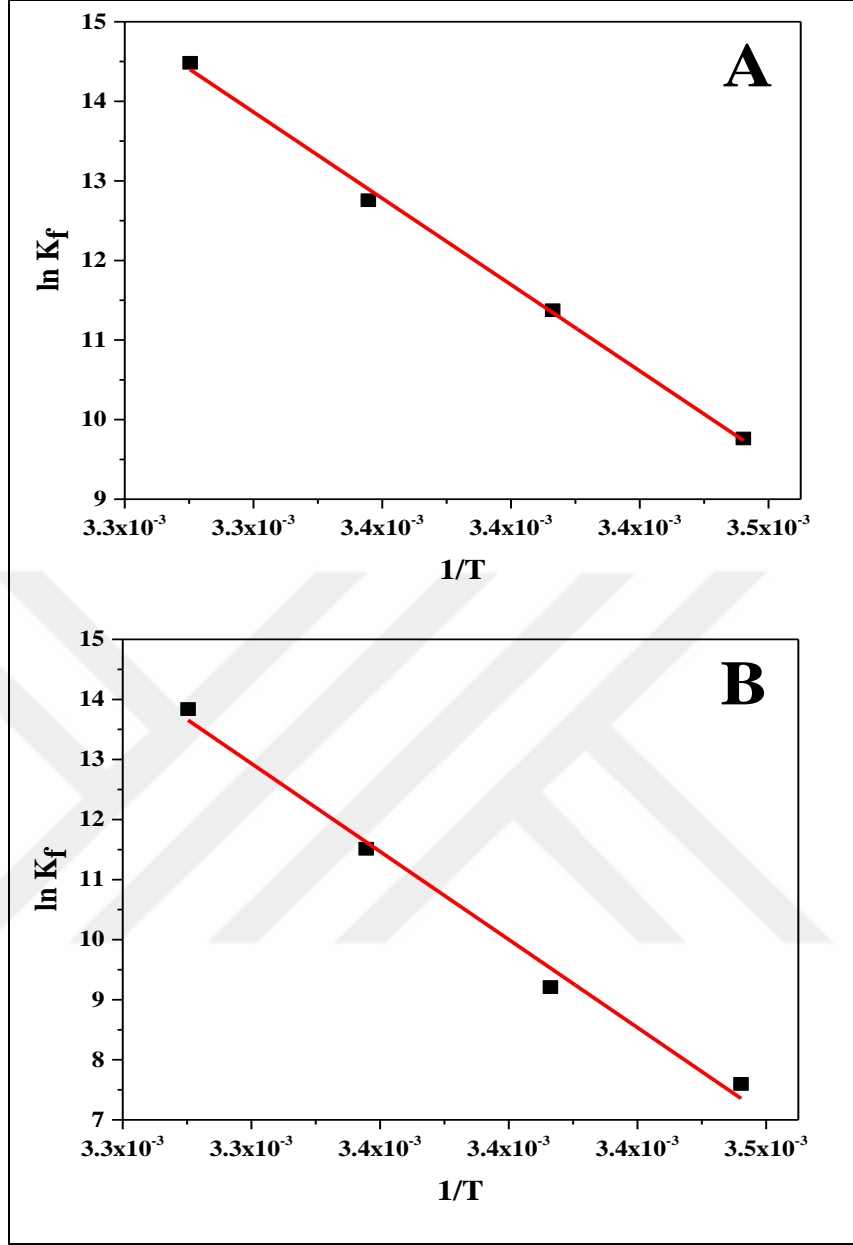
Sıcaklık (K)	ACF				BİF			
	R ²	n	log K _f	K _f	R ²	n	log K _f	K _f
288	0,995	0,82	4,24	1,74 × 10 ⁴	0,992	0,70	3,30	2,00 × 10 ³
293	0,990	0,94	4,94	8,71 × 10 ⁴	0,990	0,76	4,00	1,00 × 10 ⁴
298	0,993	1,03	5,54	3,47 × 10 ⁵	0,996	0,95	5,00	1,00 × 10 ⁵
303	0,992	1,15	6,29	1,95 × 10 ⁶	0,990	1,14	6,01	1,02 × 10 ⁶

Yukarıdaki çizelgeye bakıldığında, ACF ve BİF pestisitlerinin HSA proteinlerine bağlanma işlemi için bağlanma sabiti değerleri, yükselen çözelti sıcaklığıyla beraber artmaktadır. Protein-pestisit sisteminde artan solüsyon sıcaklığıyla bağlanma sabitinin değerindeki artma, kararsız bileşenlerin kısmi ayrışmasından ve yapının kararsız karakterinden kaynaklanmaktadır (Ge ve ark., 2010). ACF ve BİF pestisitlerinin HSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “n” değerinin tüm sıcaklıklarda 1’e yakın olması nedeniyle 1 tanedir ve pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir (He ve ark., 2005).

Proteinler ve pestisit molekülü arasında dört ana etkileşim gerçekleşmekte olup, bunlar van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimlerdir (Hu ve ark., 2005; Jang ve ark., 2009 ve Ge ve ark., 2010). Protein-pestisit etkileşimlerinin yapısal bozulma olmadan çeşitli sıcaklıklarda etkileşimlerin doğasını saptamak amacıyla termodinamik değişken değerleri hesaplanmıştır. Entalpi değişimi (ΔH) ve entropi değişimi (ΔS) değerleri Van't Hoff denklemi (Eşitlik 3.4) kullanılarak belirlenmiştir. Van't Hoff denklemi aşağıda belirtildiği şekildedir.

$$\ln K_f = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3.4)$$

Bu denklemdeki K_f çalışılan sıcaklıktaki bağlanma sabiti değeri, T çözelti sıcaklığı ve R ideal gaz sabitidir. Her sistemin ΔH ve ΔS değerlerini hesaplama amacıyla ln K_a değerine karşı 1/T grafiği (Şekil 3.19) çizilmiştir.



Şekil 3.19. (A) Aklonifen-HSA ve (B) Bifenoks-HSA etkileşimlerine ait Van't Hoff çizelgeleri.

Van't Hoff grafiği verilerinin (Şekil 3.19.A ve Şekil 3.19.B) doğrusal regresyon analizleri kullanılarak oluşturulan lineer grafiklerin eğim ve kayma değerlerinden sırasıyla ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır.

Protein-ilaç sistemindeki bağlanma işlemindeki Gibbs serbest enerji değişiminin (ΔG) değerlerini hesaplamak için Eşitlik 3.5 kullanılmıştır.

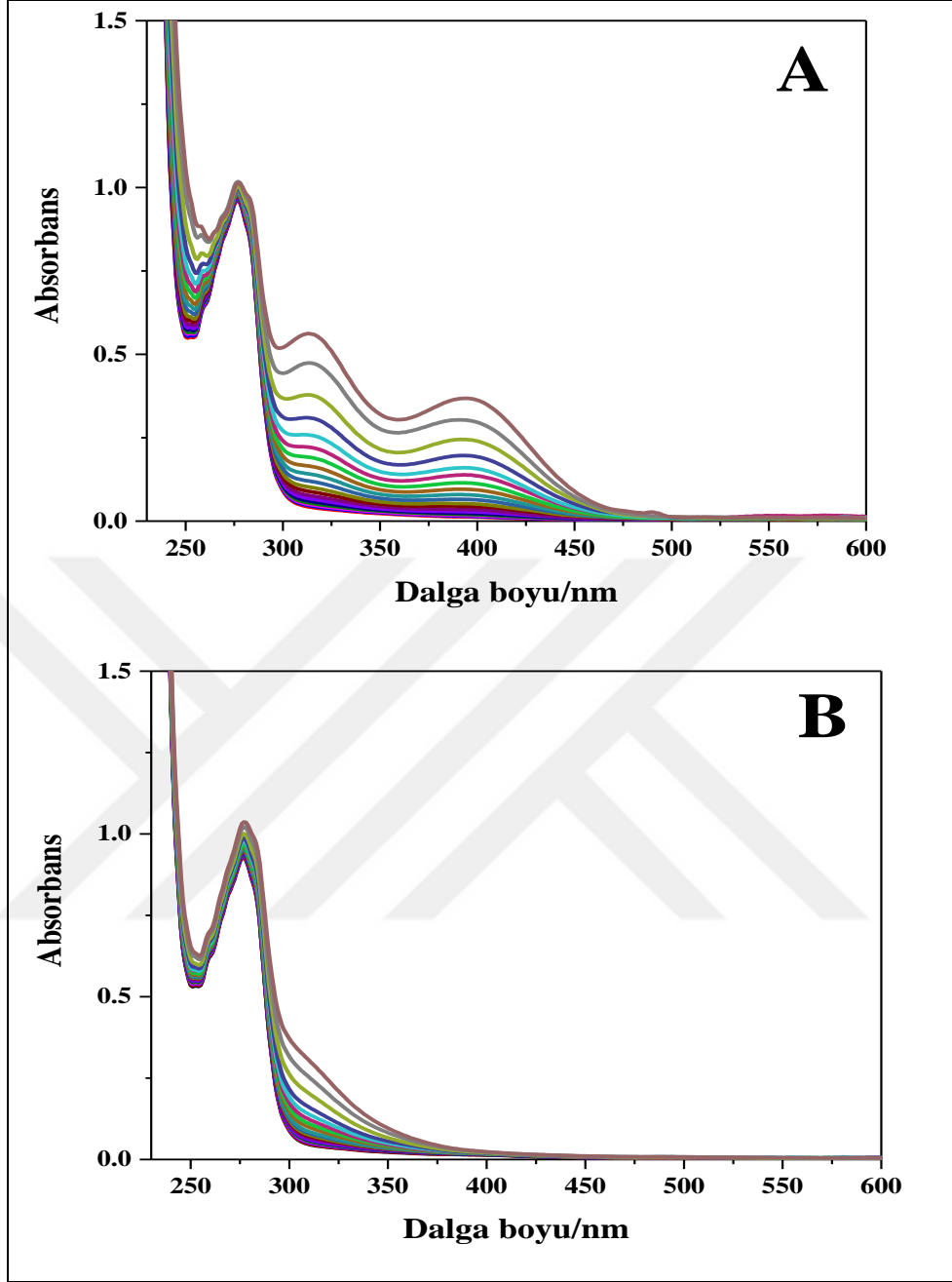
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.5)$$

HSA proteininin ACF ve BİF pestisit bileşiklerine bağlanma prosesleri için elde edilen termodinamik değişkenlerin büyüklüğü ve işareti, etkileşimin türüyle ilgili bilgi vermektedir. $\Delta G < 0$ oluşu reaksiyonun kendiliğinden olduğunu ve $\Delta H < 0$ olduğu durumda reaksiyonun ısı veren (ekzotermik) olduğunu göstermektedir. ΔS ve ΔH değerlerinin negatif olması durumu florofor ile söndürücü arasındaki etkileşimde, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin ana faktörler olduğunu göstermektedir. $\Delta S > 0$ olması halinde hidrofobik etkileşimlerin olduğu bilgisi elde edilmektedir (Lakowicz, 2006).

Çizelge 3.15. Aklonifen–HSA ve Bifenoks–HSA etkileşimlerine ait pH 7.4’te 4 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmalara ait termodinamik parametreler.

Sıcaklık (K)	ACF				BİF			
	ln K _r (mol ⁻¹ L)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ln K _r (mol ⁻¹ L)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
288	9,76	-23,40	225,43	0,864	7,60	-12,17	304,63	1,11
293	11,37	-27,72			9,21	-17,67		
298	12,76	-32,04			11,51	-23,17		
303	14,48	-36,35			13,84	-28,67		

ACF-HSA ve BİF-HSA komplekslerinin oluşumunu ve floresans sonuçlarını doğrulamak amacıyla UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır. Çünkü pestisit etkileşimine bağlı olarak HSA absorpsiyon spektrumundaki değişiklikler, hem sönmüleme sürecinin göstergesi hem de pestisit ile HSA arasında bir kompleksin oluştuğunun kanıtıdır. Şekil 3.20.a, artan ACF konsantrasyonları ile HSA'nın absorpsiyon spektrumundaki değişiklikleri göstermektedir. HSA, yapısındaki Triptofan (Trp) ve Tirozin (Tyr)'in mevcudiyeti nedeniyle 280 nm'de yüksek bir absorpsiyon zirvesi görülmektedir. Artan ACF konsantrasyonları ile HSA absorpsiyon zirvesindeki azalış, HSA kromoforlarının etrafındaki değiştirilmiş mikro ortamı açıkça göstermektedir. Bu sonuç, ACF-HSA etkileşim mekanizmasının dinamik sönmüleme olarak sınıflandırıldığını ve ACF ile HSA arasında kompleksleşmenin meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, artan BİF konsantrasyonları ile HSA absorpsiyon zirvesinde meydana gelen değişiklikler BİF-HSA etkileşim mekanizmasının da dinamik sönmüleme olarak sınıflandırıldığını ortaya koymaktadır (Şekil 3.20.b).



Şekil 3.20. HSA'nın üzerine artan derişimlerde (A) Aklonifen ve (B) Bifenoks ilavesi sonucu (en üst spektrumdan alta doğru pestisit derişimi azalmaktadır.) UV-VİS absorpsiyonu. Deneysel koşullar: [HSA] = 2 mg ml⁻¹; [ACF] = 13 nM-7.2 µM; [BİF] = 9.7 nM-4.6 µM; λ_{ex} = 280 nm; tampon çözelti = PB 7.4; sıcaklık = 298 K.

4. TARTIŞMA

Toplam dünya nüfusu günden güne artmakla beraber nüfus sayısı artışı kıtlık oranını da negatif doğrultuda değiştirmektedir. Kıtlığın artışı ile üreticiler, ürünlerini zararlılardan korumak ve geliştirebilmek için pestisitleri yaygın olarak kullanmaktadır. Ancak, pestisitler hem üründe bıraktıkları kalıntılar hem de ekosistemdeki kalıntıları nedeniyle canlılarda ve çevrede olumsuz etkiye yol açmaktadır.

Bu yüzden tez çalışmasına konu pestisit Difenileter grubundan Aklonifen ve Bifenoks pestisit bileşiklerinin HSA ile etkileşimi ve idrarda analizi için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler kullanılarak araştırma yapılmış ve en uygun yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Öncelikle ACF ve BIF pestisit bileşiklerinin kimyasal özellikleri incelenmiştir. İki pestisit etken maddesinin YPSK yöntemi ile eş zamanlı analizi için en uygun kromatografik koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Hareketli faza en uygun organik çözücü ve tampon çözücü yüzdeleri için denemeler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar sonucunda tampon çözelti olarak amonyum asetat ve organik çözücü olarak asetonitril seçilmesine karar verilmiştir. Amonyum asetat çözeltisi 10 mM olarak hazırlanarak asetonitril çözeltisi ise saf halde gradiyent halde sisteme verilmiştir. Asetonitril yüzdesi denemeleri sırasıyla 90, 85, 80, 75, 65 oranlarındadır.

Yapılan denemeler sonucunda azalan asetonitril oranı ile analiz süresi, ayırım gücü ve kolon etkinliğinde artış gözlenmiştir.

Tampon çözeltinin ve organik çözücünün yüzdelerinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda hem kabul edilebilir değerlerde ayırım sağlayabilmek hem de daha az

organik atık kullanabilmek amacıyla hareketli faz bileşimi asetonitril 10 mM-Amonyum asetat (75:25, h/h) olarak belirlenmiştir.

Tez çalışmasında geliştirilmeye çalışılan yöntemde hareketli faz bileşimi belirlendikten sonra kolon sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacmi sabit tutularak farklı kolonlarda denemeler yapılmıştır.

Bu kolonların özellikleri seçilirken partikül boyutu, farklı paketleme materyalleri ve kolon uzunluğu gibi parametrelerin analiz sonuçlarına etkisini inceleyebilmek hedeflenmiştir. Analize en uygun kolonun Kinetex Evo C18 (150 mm x 4,6mm x 5 µm) olacağı anlaşılmıştır.

YPSK yönteminde kolon sıcaklığının değişmesi analizin süresini, pikin şeklini ve sistem uygunluk parametrelerinin birçok parametresini etkilemektedir. Kolon sıcaklığı denemeleri 25 °C, 35 °C ve 45 °C'de yapılmıştır. Analizler sonucunda üç sıcaklık değerinin birbirine yakın analiz süresine sahip olduğu, birbirine yakın değerlerde ayırım gücü olduğu ve etkinlik sağladığı görülmüştür. Yöntem geliştirilirken fazladan enerji harcanmaması adına kolon sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir.

YPSK yönteminde sıklıkla amonyum asetat ve amonyum format tampon çözeltileri tercih edilmektedir. Yöntem optimizasyonu esnasında amonyum asetat ile yapılan denemeler amonyum format için de tekrarlanmıştır. Amonyum asetat tamponunun teorik tabaka sayısı değeri amonyum format tamponundan daha yüksek olduğu için analiz verimliliği açısından amonyum asetat tamponu seçilerek devam edilmiştir.

Kolon denemeleri esnasında 1 mL/dk akış hızında yapılan denemelerde Kinetex Evo C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) kolonda 44 bar basınç gözlenmiştir. Akış hızı artırılarak analiz süresi azaltılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 0,8, 1, 1,2 ve 1,4 mL/dk akış hızlarında denemeler gerçekleştirilmiştir. SUT parametreleri göz önüne

alınarak 1,2 mL/dk akış hızında 2,74 dakika süresince iki pestisit maddesinin de analiz edilebileceği görülmüştür.

Optimizasyon çalışmalarındaki son adımda tampon çözelti pH'sının analiz sonucuna etkisi incelenmiştir. Tampon çözelti pH'sı asetik asit ilavesi ile 5,0 ve sodyum hidroksit ilavesiyle 8,8'e ayarlanmıştır. Deneme çalışmaları esnasında 5,0, 6,8 ve 8,8 olmak üzere üç farklı pH'da analiz süresi, teorik tabaka sayısı ve ayırım gücü dikkate alındığında en uygun pH'nın 6,8 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebeple pH'ın değişmemesine karar verilmiştir.

Geliştirilmiş olan YPSK yönteminin optimizasyon çalışmaları sonrası, optimize yöntemin SUT parametreleri belirlenmiş olup, bu parametreler doğrultusunda geliştirilmiş olan yöntemin uygulanabilir olduğu kanıtlamış olup, yöntem validasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yöntem validasyonu esnasında çözücü, idrar ve serumda 5 tekrarlı analiz gerçekleştirilmiştir.

Çözücü içinde gerçekleştirilen analizlerde ACF ve BİF için sırasıyla doğrusal aralık 0,001- 1 ppm, teşhis sınırı sırasıyla $3,2 \times 10^{-2}$ ve $3,0 \times 10^{-2}$ ppm, tayin alt sınırı ise kabul edilen %BSS sınırları içinde (≤ 2) ikisi için de $1,0 \times 10^{-3}$ ppm olarak bulunmuştur. Söz konusu yöntemin korelasyon katsayısı sırasıyla 0,991 ve 0,994 olarak elde edilmiştir. Çözücüde gerçekleştirilen analizler için gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS) değerleri 0,81 ve 0,75 bulunmuş olup günler arası tekrar edilebilirlik değeri 1,21 ve 1,11 şeklinde elde edilmiştir.

İdrar ortamında gerçekleştirilen analizlerde ACF ve BİF için sırasıyla doğrusal aralık 0,01- 0,5 ppm, teşhis sınırı $2,97 \times 10^{-3}$ ve $3,11 \times 10^{-3}$ ppm, tayin alt sınırı ise kabul edilen %BSS sınırları içinde (≤ 2) ikisi için de $1,0 \times 10^{-2}$ ppm olarak bulunmuştur. Söz konusu yöntemin korelasyon katsayısı sırasıyla 0,996 ve 0,998 olarak elde edilmiştir. Çözücüde gerçekleştirilen analizler için gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS) değerleri 0,95 ve 1,11 bulunmuş olup günler arası tekrar edilebilirlik değeri 1,34 ve 1,48 şeklinde elde edilmiştir.

Serumda gerçekleştirilen analizlerde ACF ve BİF için sırasıyla doğrusal aralık 0,01- 0,5 ppm, teşhis sınırı $2,86 \times 10^{-3}$ ve 3×10^{-3} ppm, tayin alt sınırı ise kabul edilen %BSS sınırları içinde (<%2) ikisi için de $1,0 \times 10^{-2}$ ppm olarak bulunmuştur. Söz konusu yöntemin korelasyon katsayısı sırasıyla 0,996 ve 0,998 olarak elde edilmiştir. Çözücüde gerçekleştirilen analizler için gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS) değerleri 0,92 ve 1,00 bulunmuş olup günler arası tekrar edilebilirlik değeri 1,27 ve 1,39 şeklinde elde edilmiştir.

ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin numunelerinin bozundurma ürünlerinin analize etkisinin tespiti için bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Pestisit bileşiklerine ait numuneler hafif stres koşullarında incelenmiştir. Bu doğrultuda 0,1 M HCl ve 1 M HCl ile asit hidrolizi, 0,1 NaOH ve 1 M NaOH ile baz hidrolizi ve % 0,3 H₂O₂ ve % 3 H₂O₂ ile oksidasyon, sıcak su banyosunda bekletme ve 254 nm UV ışık banyosunda bekletme koşullarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

ACF için asit ile hidroliz koşullarında 0,1 M HCl için 12. saatten sonra bozunmaya başlamış, baz ile hidroliz ve UV ışık banyosunda bekletme denemelerinde pestisit bileşiğinde belirgin bir bozunma gözlenmemiştir. Sıcak su banyosunda bekletme sonucunda 3. saatin sonunda, %0,3 H₂O₂ ile oksidasyonda 3. saatin sonunda bozunma yüzdelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

BİF için ise, asit hidrolizinde ve UV ışık banyosunda bekletme koşullarında belirgin değişim gözlenmezken sıcak su banyosunda 3. saatin sonunda ve %0,3 H₂O₂ ile oksidasyon denemesinde 6. saatten sonra bozunma yüzdesinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan yöntem geçerlilik testlerinin parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla validasyon çalışmalarında doğrusal aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi parametreler bulunduktan sonra bu parametreler istatistiksel olarak değerlendirilmiş, geliştirilen yöntemin doğruluğunun bulunabilmesi için yapılan çalışmalarda ACF ve BİF içeren pestisit numuneleri,

serum ve idrar numuneleri üzerine ilave edilerek ilave edilen etken maddeler ile geri kazanım çalışmaları yapılmış ve gerekli parametreler hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin eş zamanlı olarak YPSK yöntemi ile analizi Kinetex Evo C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) kolonda, 25 °C kolon sıcaklığında ve 1,2 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hareketli fazın içeriği asetonitril: 10 mM amonyum asetat tamponu, 75:25 (h/h) dir. Çalışma yapılan dalga boyu 305 nm olarak seçilmiş ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Bu koşullarda ACF ve BİF'un alıkonma zamanları sırasıyla 2,24 ve 2,74 dakika olarak elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemde Aklonifen ve Bifenoks için doğrusal aralık 0,001- 1 ppm, teşhis sınırı sırasıyla $3,2 \times 10^{-2}$ ve $3,0 \times 10^{-2}$ ppm, tayin alt sınırı ise kabul edilen %BSS sınırları içinde (<%2) ikisi için de $1,0 \times 10^{-3}$ ppm olarak bulunmuştur.

Tez çalışmalarının ikinci bölümünde kullanılan pestisit bileşiklerinin HSA ile etkileşimi için UV ve floresans spektrometre cihazlarında çalışılmıştır.

Bu kapsamda fosfat tamponu içerisinde pH 7,4'te HSA konsantrasyonu sabit tutularak ACF ve BİF konsantrasyonu değiştirilerek floresans ve UV spektrumları alınmıştır. Floresans spektroskopisi ile elde edilen verilerde artan ACF ve BİF konsantrasyonlarına bağlı olarak HSA'nın floresans şiddetinin azaldığı görülmüştür. Buna bağlı olarak ACF-HSA ve BİF-HSA molekülleri arasında etkileşimin meydana geldiği, bu etkileşimin farklı sıcaklıklarda Stern-Volmer denklemine göre incelenmiş ve artan sıcaklıkla K_{SV} 'nin artış gösterdiği ve ACF ve BİF için dinamik sönümlenme mekanizmasının olduğu sonucuna varılmıştır.

ACF ve BİF ile HSA arasındaki kompleks oluşumunu göstermek ve floresans verilerini doğrulamak için UV-vis absorpsiyon spektroskopisi ile de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çünkü ligand bağlanmasına bağlı olarak HSA'nın absorpsiyon spektrumundaki değişiklikler hem sönümlenme işleminin göstergesi hem de ligand ile protein arasında bir kompleksin oluştuğunun kanıtıdır. Elde edilen sonuçlarından, artan pestisit konsantrasyonları ile HSA'nın absorpsiyon spektrumunda herhangi bir değişim olmaması, etkileşim mekanizmasında dinamik sönümlenmenin baskın

olduğunu ve çalışılan pestisitler ile HSA arasında kompleksleşmenin meydana geldiğini göstermektedir.

ACF-HSA ve BİF-HSA etkileşimleri için $\log(F_0/F) / F$ 'ye karşı \log [Pestisit] grafiklerindeki verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerleri aracılığıyla “ K_f ” ve “ n ” değerleri hesaplanmıştır (Oda sıcaklığında, pestisitlerin HSA ile bağlanma afiniteleri ACF-HSA kompleksi için $K_f=3,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; BİF-HSA kompleksi için $K_f =1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur). ACF ve BİF pestisitlerinin HSA proteinlerine bağlanma işlemi için bağlanma sabiti değerleri, artan ortam sıcaklığı ile artmaktadır. Protein-pestisit sisteminde artan sıcaklık ile bağlanma sabitinin değerindeki artma, kararsız bileşenlerin kısmi ayrışmasından ve yapının kararsız karakterinden kaynaklanmaktadır. ACF ve BİF pestisitlerinin HSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “ n ” değerinin tüm sıcaklıklarda 1'e yakın olması nedeniyle 1 tanedir ve pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir.

Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen termodinamik parametreler (ΔG , ΔH , ΔS), ACF-HSA ve BİF-HSA arasındaki etkileşimde güçlü hidrofobik etkileşimlerin etkin olduğu görülmüştür (ACF-HSA kompleksi için $\Delta S= +0,864 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 225,43 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve BİF-HSA kompleksi için $\Delta S= + 1,11 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 304,63 \text{ kJ mol}^{-1}$). Her iki sistem için Gibbs serbest enerji değişimin pozitif olması moleküller arasındaki etkileşimin endotermik gerçekleştiğini göstermiştir (Oda sıcaklığında ACF-HSA kompleksi için $\Delta G= -32,04 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve BİF-HSA kompleksi için $\Delta G= - 23,17 \text{ kJ mol}^{-1}$).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, difenileter herbisitlerden Aklonifen ve Bifenoks pestisitlerinin YPSK yöntemi kullanılarak eş zamanlı analizi gerçekleştirilmiştir. YPSK ile geliştirilen yöntem için gerekli parametreler optimize edilerek validasyonu tamamlanmıştır. Bu amaçla analiz için en iyi koşulların belirlenebilmesi için mobil fazda organik çözücü yüzdesi, tampon çözelti molaritesi, sabit faz, akış hızı, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin denemeleri yapılmıştır.

Literatür taramalarında ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin biyolojik numunelerden aynı anda tayininin gerçekleştirilmesi için herhangi bir çalışma bulunmadığı için çalışılan bu iki pestisit için aynı anda analizinin gerçekleştirilmesi ve biyolojik numunelerde uygulamalarının yapılması çalışmanın özgünlüğüne dikkat çekmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen verilere göre, ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin eşzamanlı analizi için hızlı, hassas, kesin, uygulaması kolay, doğru, ekonomik ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan spektrofotometrik yöntemle birleştirilmiş YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz yöntemi ile ilgili olarak, ACF ve BİF pestisit bileşiklerinin sağlıklı insan idrarından ve insan serum eş zamanlı analizine başarıyla uygulanabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasına konu pestisit moleküllerinin biyolojik moleküller ile etkileşimi ve yeni moleküllerin tasarlanma amacının daha derinden anlaşılmasına katkıda bulunabilecek bu çalışma, ACF ve BİF özelinde pestisitler başta olmak üzere farklı moleküllerin biyolojik moleküller ile bağlanma mekanizmalarını ve bu tür moleküllerin farmakolojik etkilerini anlamının yanı sıra yeni ve etkili moleküllerin yapısını tasarlamada daha fazla bilgi sağlayarak araştırmacılara katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

YPSK yöntemine ilave olarak floresans spektroskopisi kullanılarak pestisit-protein etkileşimi incelenmesi amaçlanmıştır. Çözeltinin sıcaklığının artması pestisit-protein sistemi için K_{SV} değerlerini arttırmaktadır. Artan sıcaklıkla birlikte K_{SV} değerlerinin artması, çalışılan protein-pestisit sistemindeki floresans sönümlenme mekanizmasının dinamik sönümlenmeden kaynaklandığını göstermektedir.

HSA proteinin ACF ve BİF pestisit bileşiklerine bağlanma prosesleri için elde edilen ΔS ve ΔH değerlerinin pozitif olması (ΔG , ΔH , ΔS), ACF-HSA ve BİF-HSA arasındaki etkileşimde güçlü hidrofobik etkileşimlerin etkin olduğu ve etkileşimin endotermik olduğunu göstermektedir. (ACF-HSA kompleksi için $\Delta S = +0,864 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 225,43 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve BİF-HSA kompleksi için $\Delta S = +1,11 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 304,63 \text{ kJ mol}^{-1}$)

Van 't Hoff eşitliğiyle hesaplanmış K_f ve n değeri yardımıyla ACF ve BİF pestisitlerinin HSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “n” değerinin tüm sıcaklıklarda 1'e yakın olması nedeniyle 1 tane olup pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir.

ACF ve BİF pestisitlerin HSA ile bağlanmasının spektroskopik yöntemlerle ilk kez incelenmesi bu pestisitlerin etki mekanizmalarının belirlenmesi ve farklı pestisitlerin de etki mekanizmalarının değerlendirilmesinde yol göstereci olması açısından tez çalışmalarının literatüre katkısıdır.

ÖZET

Difenileter Grubu Herbisitlerin Biyolojik Numunelerden Tayinine Yönelik Sıvı Kromatografisi Yöntemi Geliştirilmesi ve Pestisit-Protein Etkileşimlerinin İncelenmesi

Bu tez çalışması kapsamında Aklonifen ve Bifenoks pestisit bileşiklerinin YPSK yöntemi kullanılarak analizi için gerekli parametreler bulunmuş ve bu parametrelere bağlı olarak da eş zamanlı analizleri yapılmıştır. Bu amaçla hareketli faz organik çözücü yüzdesi, tampon çözelti molaritesi, kolon, akış hızı, sıcaklık ve pH kullanılarak analizler için en iyi koşullar belirlenmiştir.

Optimizasyon ve validasyon işlemleri tamamlanarak geliştirilen yöntemimizde literatürdeki birçok analiz yöntemine göre daha iyi ve etkin bir ayırım ve daha iyi geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri elde edilmiştir. Hesaplanan validasyon parametreleri doğrultusunda ise geliştirilen yöntemin doğru, duyarlı, kararlı bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

Sonuç olarak bulunan veriler doğrultusunda, Aklonifen ve Bifenoks pestisit maddelerinin biyolojik numunelerden eş zamanlı analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay uygulanabilir, doğru, ekonomik ve herhangi bir ön ayırma işlemi gerektirmeyen analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin biyolojik numunelerden bu maddelerin eş zamanlı analizine başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Ayrıca kullanılan pestisit bileşiklerinin dolaşım sisteminde ana taşıyıcı protein olarak bulunan insan serum albümini (HSA) ile etkileşimlerinin floresans spektroskopisi ve hesaplamaları teknikleri ile incelenmesi amaçlanmış, floresans ve absorpsiyon spektroskopisinden elde edilen sonuçlar ACF/BİF ve HSA arasındaki kompleksleşmeyi doğrulamıştır.

Artan sıcaklıkla beraber K_{SV} değerlerindeki artış, HSA flüoresansının ACF/BİF kaynaklı sönmemesinin dinamik sönmeme olduğunu göstermiştir. Oda sıcaklığında, pestisitlerin HSA ile bağlanma afiniteleri ACF-HSA kompleksi için $K_f=3,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; BİF-HSA kompleksi için $K_f = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Sıcaklık artışıyla beraber bağlanma sabiti değerlerinde artış gözlenmiştir.

Termodinamik verilerin sayısal olarak değerlendirilmesi (ACF-HSA kompleksi için $\Delta S= +0,864 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 225,43 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve BİF-HSA kompleksi için $\Delta S= + 1,11 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = 304,63 \text{ kJ mol}^{-1}$) sonucunda bulunan sonuçlar, ACF-HSA ve BİF-HSA komplekslerinin oluşumunda hidrofobik bağların daha etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Analiz, Floresans, Pestisit, Protein, Sıvı Kromatografisi.

SUMMARY

Development of Liquid Chromatography Method for Determination of Diphenylether Group Herbicides from Biological Samples and Investigation of Pesticide-Protein Interactions

Within the scope of this thesis, the necessary parameters for the analysis of Aklonifen and Bifenox pesticide compounds using the HPLC method were found and simultaneous analyzes were made depending on these parameters. For this purpose, the best conditions for analyzes were determined by using mobile phase organic solvent percentage, buffer solution molarity, column, flow rate, temperature and pH.

In our method, which was developed by completing the optimization and validation processes, a better and more effective separation and better recovery, diagnostic limit and lower limit of determination values were obtained compared to many analysis methods in the literature. In line with the calculated validation parameters, it can be said that the developed method is an accurate, sensitive and stable method.

As a result, in line with the data obtained, a fast, sensitive, precise, easily applicable, accurate, economical and does not require any pre-separation process has been developed for the simultaneous analysis of Aklonifen and Bifenox pesticides from biological samples. It has been shown statistically that the developed analysis method can be successfully applied to the simultaneous analysis of these substances from biological samples.

In addition, it was aimed to examine the interactions of the pesticide compounds used with human serum albumin (HSA), which is the main carrier protein in the circulatory system, by fluorescence spectroscopy and calculation techniques, and the results obtained from fluorescence and absorption spectroscopy confirmed the complexation between ACF/BIF and HSA.

The increase in K_{SV} values with increasing temperature showed that the ACF/BIF induced quenching of HSA fluorescence is dynamic quenching. At room temperature, the binding affinities of pesticides with HSA were $K_f=3.47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for the ACF-HSA complex; For the BIF-HSA complex, K_f was found to be $=1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. An increase in the binding constant values was observed with the increase in temperature.

Numerical evaluation of thermodynamic data ($\Delta S= +0.864 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ for ACF-HSA complex, $\Delta H = 225.43 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta S= + 1.11 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ for BIF-HSA complex The results obtained as a result of $\Delta H = 304.63 \text{ kJ mol}^{-1}$) showed that hydrophobic bonds were more effective in the formation of ACF-HSA and BIF-HSA complexes.

Keywords: Analysis, Fluorescence, Liquid Chromatography, Pesticide, Protein.

KAYNAKLAR

- ABASS K, LÄMSÄ V, REPONEN P, KÜBLBECK J, HONKAKOSKI P, MATTILA S, PELKONEN O, HAKKOLA J (2012). Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*, **294**(1): 17-26.
- AKAMATSU M (2011). Importance of physicochemical properties for the design of new pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(7): 2909-2917.
- AKASHE MM, PAWADE UV, NIKAM AV (2018). Classification of pesticides: A review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, **9**(4): 144-150.
- AKÇAN R (2008). *Pestisit Uygulanan Tavşanlarda Postmortem Kan ve Kemik İliğinde Pestisit Düzeylerinin Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana.
- ASLAN C, KEKİLLİOĞLU A, ŞEN M, KIZILIRMAK A (2021). Examination on pesticides. *EasyChair Preprint*, **6592**: 1-35.
- ATABEY T (2016). *Edirne Yöresinde Üretilen Pirinçlerde Pestisit Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- ATAKOL O (2022). GC ve HPLC Kromatografi Ders Notları. Erişim Adresi: [<https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=50389>]. Erişim Tarihi: 01.01.2022.
- BAREK J, CABALKOVÁ D, FISCHER J, NAVRÁTIL T, PECKOVÁ K, YOSYPCHUK B (2011). Voltammetric determination of the herbicide Bifenox in drinking and river water using a silver solid amalgam electrode. *Environmental Chemistry Letters*, **9**(1): 83-86.
- BELANGER JM, PARÉ JJ, SIGOUIN M (1997). High performance liquid chromatography (HPLC): principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, **18**: 37-59.
- BLAKLEY B, BROUSSEAU P, FOURNIER M, VOCCIA I (1999). Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and Industrial Health*, **15**(1-2): 119-132.
- BODUR S, BAKIRDERE EG (2019). Simultaneous determination of selected herbicides in dam lake, river and well water samples by gas chromatography mass spectrometry after vortex assisted binary solvent liquid phase microextraction. *Microchemical Journal*, **145**: 168-172.
- BÜYÜKTUNCEL E (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **2**: 209-242.

- ÇAKMAK Z (2013). *ACF Pestisitinin Elektrokimyasal Tekniklerle İncelenmesi ve Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- CARTER DC, HO JX (1994). Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, **45**: 153-203.
- CHUGH H, KUMAR P, TOMAR V, KAUR N, SOOD D, CHANDRA R (2019). Interaction of Noscapine with human serum albumin (HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **372**: 168-176.
- CROWTER JB (2001). Validation of pharmaceutical methods. In: *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ahuja, S., Scypinski, S., Academic Press, San Diego, 415-443.
- DE MATOS MORAWSKI F, CAON NB, SOUSA KAP, FAITA FL, PARIZE AL, JOST CL (2021). Hybrid chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles for electrochemical sensing of bifenox herbicide. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **9(5)**: 106298.
- DEVENTER K, POZO OJ, VERSTRAETE AG, VAN EENOO P (2014). Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *Trends in Analytical Chemistry*, **55**: 1-13.
- DOMINGUES I, AGRA AR, MONAGHAN K, SOARES AM, NOGUEIRA AJ (2010). Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29(1)**: 5-18.
- ERKMEN C (2017). *Yeni Nesil HILIC Kolon Kullanılarak Bazı Antiviral İlaçların Farmasötik Dozaj Şekillerinden Sıvı Kromatografisi ile Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- ESER B, SEPİCİ-DİNÇEL A (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, **2(2)**: 51-57.
- FANALI S, HADDAD PR, POOLE C, SCHOENMAKERS P, LLOYD DK (2013). *Liquid chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.
- Farmakoloji I – İlaçların biyotransformasyonu. (t.y.). Erişim Adresi: [<https://cdn.istanbul.edu.tr/FileHandler2.ashx?f=my-veteriner-biyotransformasyon.pdf>] Erişim Tarihi: 12.01.2022.
- GE F, CHEN C, LIU D, HAN B, XIONG X, ZHAO S (2010). Study on the interactions between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, **130(1)**: 168-173.

- GOPI PK, MUTHARANI B, CHEN SM, CHEN TW, ELDESOKY GE, ALI MA, WABAIDUR SM, SHAIK F, TZU CY (2021). Electrochemical sensing base for hazardous herbicide acetonifin using gadolinium niobate (GdNbO₄) nanoparticles-actual river water and soil sample analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **207**: 111285.
- GRDINIC V, VUKOVIC J (2004). Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 489-512.
- GÜMÜŞ E (2009). *Farmasötik Kremlerde Floresans Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- GÜMÜŞTAŞ M (2016). *Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- HAJICOSTAS E. (2003). *Validation of Analytical Methods*. Springer-Verlag, Berlin.
- HARTMANN C, SMEYERS-VERBEKE J, MASSART DL, MCDOWALL RD (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **17**: 193-218.
- HE W, LI Y, XUE C, HU Z, CHEN X, SHENG F (2005). Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**(5): 1837–1845.
- HIBBERT DB (2007). *Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory*. Oxford University Press, Inc., New York.
- HOU C, WANG Z, LI X, BAI Y, CHAI J, LI X, GAO J, XU H (2022). Study of modeling and optimization for predicting the acute toxicity of carbamate pesticides using the binding information with carrier protein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **273**: 121038.
- HUBER L (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories* (2nd Ed.). Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- HU YJ, LIU Y, PI ZB, QUA SS (2005). Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**(24): 6609–6614.
- İNAM R, ÇAKMAK Z (2013). A simple square wave voltammetric method for the determination of acetonifin herbicide. *Analytical Methods*, **5**(13): 3314-3320.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (2005a). *Q2A (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Geneva, ICH.

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (2005b). *Q2B (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Geneva, ICH.
- SAĞIRLI AO (2015). Kromatografi – Ders Notları. İstanbul Üniversitesi. Erişim Adresi: [<https://avesis.istanbul.edu.tr/resume/downloadfile/osagirli?key=0ae7f9bc-dcce-4343-be53-33d5c5df0dcb>]. Erişim Tarihi: 01.08.2022.
- JABŁOŃSKA-TRYPUC A, WYDRO U, SERRA-MAJEM L, WOŁEJKO E, BUTAREWICZ A (2019). The analysis of bifenoxy and dichlobenil toxicity in selected microorganisms and human cancer cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**(21): 4137.
- JAKUBEK M, MASARIK M, BRIZA T, KAPLANEK R, VESELÁ K, ABRAMENKO N, MARTÁSEK P (2021). PPO-inhibiting herbicides and structurally relevant schiff bases: evaluation of inhibitory activities against human protoporphyrinogen oxidase. *Processes*, **9**(2): 383.
- JALLOW MF, AWADH DG, ALBAHO MS, DEVI VY, THOMAS BM (2017). Pesticide risk behaviors and factors influencing pesticide use among farmers in Kuwait. *Science of the Total Environment*, **574**: 490-498.
- JANG J, LIU H, CHEN W, ZOU G (2009). Binding of mitomycin C to blood proteins: A spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, **928**(1-3): 72–77.
- KAPELEKA JA, SAULI E, NDAKIDEMI PA (2021). Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. *International Journal of Environmental Health Research*, **31**(7): 805-822.
- KASHANIAN S, SHARIATI Z, PAKNEJAD M (2012). Estimation of the distance between Trp-214 of HSA and TCP pesticide metabolite. *Toxicology Letters*, **211**: 174.
- KINACI G (2019). *Ayçiçeği ve Çeltik Yetiştiriciliğinde Kullanılan Bazı Herbisitlerin Kalıntı Miktarlarının Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.
- KOUREAS M, TSEZOU A, TSAKALOF A, ORFANIDOU T, HADJICHRISTODOULOU C. (2014). Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Science of the Total Environment*, **496**: 358-364.
- KRANAWETVOGL A, SIEGERT M, EYER F, THIERMANN H, JOHN H (2018). Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate. *Toxicology Letters*, **299**: 11-20.
- KROMIDAS S (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*. Wiley-VCH Verlag GmbH & CoK GaA Publishers, Weinheim.

- KURUTAŞ EB, KILINÇ M (2003). Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **12**(3): 216-228.
- LAKOWICZ JR (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd Ed.). Springer, New York.
- LAGANÀ A, FAGO G, FASCIANI L, MARINO A, MOSSO M (2000). Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, **414**(1-2): 79-94.
- LEE JY, PARK H, LIM W, SONG G (2021). Aclonifen causes developmental abnormalities in zebrafish embryos through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Science of The Total Environment*, **771**: 145445.
- LEE YD, JANG SW (2010). Determination of buprofezin residues in rice and fruits using HPLC with LC/MS confirmation. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, **29**(3): 247–256.
- MCNALLY ME, USHER K, HANSEN SW, AMOO JS, BERNSTEIN AP (2015). Precision of internal standard and external standard methods in high performance liquid chromatography. *LCGC Supplements*, **33**(4): 40-46.
- MDENI NL, ADENIJI AO, OKOH AI, OKOH OO (2022). Analytical evaluation of carbamate and organophosphate pesticides in human and environmental matrices: A review. *Molecules*, **27**(3): 618.
- MOHAMED SALEM AM (2017). *Spectroscopic Investigations on DNA and BSA Binding Ability of a New Platinum (II) Complex Containing 5,6-di(pyridin-2-yl)-2,3-Dihydropyrazine Ligand*. Yüksek Lisans Tezi, Atılım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- MOLINA-BOLIVAR JA, GALISTEO-GONZÁLEZ F, RUIZ CC, MEDINA-O'DONNELL M, PARRA A (2014). Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, **156**: 141-149.
- MUTHARANI B, RANGANATHAN P, CHEN SM (2020). Stimuli-enabled reversible switched aclonifen electrochemical sensor based on smart PNIPAM/PANI-Cu hybrid conducting microgel. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **304**: 127232.
- ÖZHAN G (2014). Farmasötik toksikoloji 2014-2015: 6. not. İstanbul Üniversitesi Ders Notları. Erişim Adresi: [https://avesis.istanbul.edu.tr/resume/downloadfile/gulozhan?key=fb08fb75-ce44-4c41-8539-bb0a959246e2]. Erişim Tarihi: 15.04.2022.
- OZKAN SA (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. HNB Publishers, New York.

- PARK J, AN G, LIM W, SONG G (2022). Aclonifen induces bovine mammary gland epithelial cell death by disrupting calcium homeostasis and inducing ROS production. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **181**: 105011.
- PENNER MH (2017). Basic principles of spectroscopy. In: *Food Analysis*. Springer, Champaign, 79-88.
- PEREIRA VJ, DA CUNHA, JPAR, DE MORAIS TP, RIBEIRO-OLIVEIRA JP, DE MORAIS JB (2016). Physical-chemical properties of pesticides: concepts, applications, and interactions with the environment. *Bioscience Journal*, **32**(3): 627-641.
- TİRYAKİ O (2017). *Pestisit – Kalıntı Analizlerinde Kalite Kontrol (QC) ve Kalite Güvencesi (QA)*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- PETRARCA MH, MEINHART AD, GODOY HT (2020). Dilute-and-shoot liquid chromatography approach for simple and high-throughput analysis of 5-hydroxymethylfurfural in fruit-based baby foods. *Food Analytical Methods*, **13**(4): 942-951.
- PRICHARD E, BARVICK V (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, United Kingdom.
- RODRIGUES A, GAFFARD A, MOREAU J, MONCEAU K, DELHOMME O, MILLET M (2022). Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds: the case of grey partridges (*Perdix perdix*). *Journal of Chromatography A*, **1687**: 463681.
- SAPMAZ H, ERKMEN C, KABIR MZ, TAYYAB H, MOHAMAD SB, USLU B (2023). Spectrofluorometric and computational approaches for the interaction studies of aclonifen and bifenox with human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **284**: 121772.
- SHETTI NP, MALODE SJ, VERNEKAR PR, NAYAK DS, SHETTY NS, REDDY KR, SHUKLA SS, AMINABHAVI TM (2019). Electro-sensing base for herbicide aclonifen at graphitic carbon nitride modified carbon electrode–Water and soil sample analysis. *Microchemical Journal*, **149**: 103976.
- SOYLU İ (2013). *Spektroflorimetrik Metotla İnsan Serum Albumin Proteini ile Diklorprop, Karbofuran, Amitrol ve Dikuat Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- SUGIO S, MOCHIZUKI S, NODA M, KASHIMA A (1998). Crystal structure of human serum albumin. *Worldwide Protein Data Bank*.
- SWARTZ ME, KRULL IS (1997). *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker, New York.

- TİRYAKİ O, CANHİLAL R, HORUZ S (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **26**(2): 154-169.
- TORBECK LD (Ed.). (2007). *Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design*. Informa Healthcare USA, New York.
- TUĞ N (2022). *Parasetamolün Parenteral Çözeltide Stabilité Göstergeli Miktar Tayini İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- TURGUT ÖR (2019). *Fenil/Hekzil Grupları İçeren Monofosfin Liganlı Palladyum (II) ve Platin (II) Sakkarinat Komplekslerinin Sentezi, Yapıları, DNA/HSA Bağlanma Affiniteleri ve Antikanser Aktiviteleri*. Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- US FDA (1983). *Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville.
- US FDA (2000). *Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation*. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville.
- VAKONAKI E, ANDROUTSOPOULOS VP, LIESIVUORI J, TSATSAKIS AM, SPANDIDOS DA (2013). Pesticides and oncogenic modulation. *Toxicology*, **307**: 42-45.
- VURAL N (2005). *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- GEBREHIWOT WH (2019). *Bazı Pestisitlerin Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Eş Zamanlı Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Ankara.
- YAZGAN MS (1997). Türkiye' de pestisit kirliliği. *Türkiye' de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II*, 22-23 Kasım, Gebze.
- YILDIZ M, GÜRKAN O, TURGUT C, KAYA Ü, ÜNAL G (2005). Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları, *6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, 3-7 Ocak, Ankara.
- ZHAO LX, PENG JF, LIU FY, ZOU YL, GAO S, FU Y, YE F (2022). Design, synthesis, and herbicidal activity of diphenyl ether derivatives containing a five-membered heterocycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70**(4): 1003-1018.