

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYVA VE SALATALIKTA TARIM İLACI AMİTRAZİN BOZUNMA
SÜRECİNİN İZLENMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ
Nihat ÖZCAN**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYVA VE SALATALIKTA TARIM İLACI AMİTRAZİN BOZUNMA
SÜRECİNİN İZLENMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ
Nihat ÖZCAN
(509032205)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 Şubat 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 25 Haziran 2010

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Süleyman AKMAN(İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK(İTÜ)
Prof. Dr. F.Artemis KARAALİ(YeditepeÜ)
Prof. Dr. Salih CENGİZ (İÜ)
Prof. Dr Ahmet GÜL (İTÜ)**

HAZİRAN 2010

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım da bana yön veren, bilgisi ve tecrübesiyle destekleyen sayın hocam, Prof. Dr. Süleyman AKMAN' a, tez çalışmalarım süresince değerli bilgilerini esirgemeyerek bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK, Prof. Dr. Artemis KARAALÍ, Doç. Dr. Nilgün TOKMAN' a

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen çok değerli ağabeyim, Doç. Dr. Mustafa ÖZCAN' a,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için imkân sağlayan Prof. Dr. Ahmet GÜL' e

Kendilerini tanımaktan onur duyduğum, her zaman yanımda olup bana destek olan çok değerli arkadaşlarım, Dr. Yasin ARSLANOĞLU, Aylın DEMİREL, Özcan KUBAT, Özlem Yolcular AYCAN, M. Muhlis TEKEL, Wael ALTALALQA, Harun AKGÜN, Yüksek Kimyager Ersin Hayran, Fatih TUNCAY, Yüksek Kimyager Orhan DESTANOĞLU ve Dr. Barbaros AKKURT' a

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Sami ÖZCAN, annem Sabire ÖZCAN, ablam Hatice ÖZCAN, kardeşlerim Rüveyde ve Zeynep ÖZCAN' a

TEŞEKKÜR ederim.

Şubat 2010

Nihat Özcan
(Yüksek Kimyager)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	2
1.2 Tezin Amacı	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Pestisitler	7
2.2 Pestisit Türleri	9
2.2.1 Herbisitler.....	9
2.2.1.1 Amidler	10
2.2.1.2 Benzoik asitler.....	10
2.2.1.3 Karbamatlar	11
2.2.1.4 Nitriller.....	12
2.2.1.5 Nitroanilinler	13
2.2.1.6 Organofosforlular	14
2.2.1.7 Fenoksi asitler	15
2.2.1.8 Piridinler ve kuarterner amonyum tuzları	15
2.2.1.9 Payridazinler ve payridazonlar.....	18
2.2.1.10 Triazinler	19
2.2.1.11 Fenilüreler	20
2.2.1.12 Sülfonilüreler.....	21
2.2.2 İnsektisitler.....	22
2.2.2.1 Benzoilüreler	23
2.2.2.2 Karbamatlar.....	23
2.2.2.3 Organoklorlular	25
2.2.2.4 Organofosforlu insektisitler	26
2.2.2.5 Payretroidler	28
2.2.3 Fungisitler	29
2.2.3.1 Azoller.....	30
2.2.3.2 Benzimidazoller	31
2.2.3.3 Ditiokarbamatlar	31
2.2.3.4 Morfolinler	32
2.2.3.5 Diğer pestisit türleri.....	33
2.3 Etki Şekli.....	34
2.3.1 Herbisitler.....	35
2.3.1.1 Aminoasit sentezi engelleyiciler	35

2.3.1.2	Hücre bölünmesi engelleyicileri.....	35
2.3.1.3	Fotosentez engelleyiciler.....	35
2.3.2	İnsektisitler.....	36
2.3.2.1	Sinir sisteminde sinyal bozucular.....	36
2.3.2.2	Kolinesteraz engelleyiciler.....	36
2.3.2.3	Kitin sentezini engelleyiciler.....	36
2.3.3	Fungisitler.....	37
2.3.3.1	Sülhidril reaktifleri.....	37
2.3.3.2	Hücre bölünmesi engelleyiciler.....	37
2.3.3.3	Ergosterol sentezi engelleyiciler.....	37
2.4	Toksiklik ve Risk Değerlendirme.....	37
2.5	Pestisit Kalıntı Analizi İçin Kalite Kontrol.....	39
2.5.1	Akreditasyon.....	39
2.5.2	Numune alma, taşıma, işleme ve saklama.....	39
2.5.2.1	Örnekleme.....	39
2.5.2.2	Numunenin laboratuara transferi.....	40
2.5.2.3	Numune hazırlanması ve analiz öncesi işlenmesi.....	40
2.5.3	Pestisit Standartları, kalibrasyon çözeltileri ve benzeri şeyler.....	41
2.5.3.1	Standartları saflığı ve kimliği.....	41
2.5.3.2	Referans standartların saklanması.....	41
2.5.3.3	Stok ve çalışma standartlarının hazırlanması ve kullanımı.....	41
2.5.4	Ekstraksiyon ve konsantrasyon.....	42
2.5.4.1	Ekstraksiyon koşulları ve verimi.....	42
2.5.4.2	Ekstrat konsantrasyonu ve hacme tamamlama.....	42
2.5.4.3	Bulaşma, girişimler ve analitin doğal kaynakları.....	42
2.5.5	Kalibrasyon ve kromatografik integrasyon.....	43
2.5.5.1	Kütle spektrometrik dedektörün kütle kalibrasyonu.....	43
2.5.5.2	Kalibrasyon için genel gereksinimler.....	43
2.6	Analitik Metotlar ve Analitik Performans.....	45
2.6.1	Analitik metotların kabul edilebilirliği.....	45
2.6.1.1	Performansın kabul edilebilirliğinin tespiti için geri kazanım.....	45
2.6.1.2	Yeterlilik testi ve referans malzeme analizi.....	46
2.6.1.3	Sonuçların doğrulanması.....	46
2.6.1.4	Sonuçların yazılması.....	46
2.6.1.5	Sonuçların hesaplanması.....	46
2.7	Numune İşleme Ve Temizlik (clean up) Prosedürü: Yeni Gelişmeler ..	47
2.7.1	Geleneksel MRM lerdeki son yenilikler.....	47
2.8	Katı Destek Malzemesi Yardımıyla Ekstraksiyon ve Kısımlandırma ...	49
2.8.1	Makroporöz destek malzemesi yardımıyla ekstraksiyon ve kısımlandırma.....	49
2.8.2	Ekstraktın destek malzemesine dağılımı.....	50
2.8.3	Matris solid faz dispersiyon (MSPD).....	50
2.9	Adsorptif Ekstraksiyon Teknikleri.....	50
2.9.1	Katı faz ekstraksiyon (SPE).....	51
2.9.1.1	Metot geliştirme.....	51
2.9.1.2	Etkileşim mekanizmaları.....	52
2.9.1.3	SPE işlemi.....	52
2.9.1.4	Sorbentler.....	54
2.9.1.5	Uygulamalar.....	56
2.9.2	İmmünosorbentlerle SPE.....	56

2.9.3	Moleküler hafızalandırılmış polimerlerle SPE (MISPE)	57
3.	GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ.....	59
3.1	Giriş Ve Kapsam	59
3.2	Kütle Spektrumu	59
3.3	Yapısal Bilgi	61
3.3.1	Moleküler iyon	61
3.3.2	İzotopik pikler	61
3.3.3	Parçalanma reaksiyonları	63
3.4	Kimyasal İyonizasyon.....	65
3.4.1	Pozitif iyonlar	65
3.4.2	Negatif iyonlar	67
3.5	Tamamlayıcı Bilgiler	68
3.6	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi	68
3.7	Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS).....	69
3.8	GC-MS İle Çoklu Pestisit Taraması.....	73
3.8.1	GC-MS ile çoklu pestisit taramasına giriş	73
3.8.2	GC-MS cihazı	73
3.8.3	Kütle spektrometresi	74
3.8.3.1	Numune girişi.....	74
3.8.3.2	İyonlaşma	74
3.8.3.3	Kütle analizörü	75
3.8.3.4	İyon Tespiti	77
3.8.3.5	Veri toplama ve işleme.....	77
4.	TEZ ÇALIŞMALARI.....	79
4.1	Kullanılan Cihazlar	79
4.2	Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	79
4.2.1	Kimyasallar	79
4.2.2	Sarf Malzemeler	80
4.2.3	Çözeltiler	80
4.3	Araştırmada Kullanılan Numuneler	81
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	83
5.1	Çalışma Metotunun Belirlenmesi.....	84
5.1.1	GC-MS çalışma koşullarının belirlenmesi	84
5.1.2	Enjeksiyon şekli	85
5.1.3	Kütle spektrometresi koşulları	85
5.1.4	Ekstraksiyon metodunun belirlenmesi	88
5.2	Metod Validasyonu	90
5.2.1	Doğrusallık çalışmaları	90
5.2.2	Tespit sınırı LOD ve LOQ çalışmaları.....	94
5.2.3	Geri kazanım çalışması	95
5.2.4	Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik	96
5.2.5	Doğruluk çalışması.....	98
5.3	Belirsizlik Bütçesinin Hesaplanması	99
5.3.1	Belirsizlik bileşenlerinin hesaplanması.....	99
5.3.1.1	Standart hazırlamadan gelen belirsizlik	99
5.3.1.2	Örnek hazırlamadan gelen belirsizlik.....	101
5.3.1.3	Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik	102
5.3.1.4	Birleşik belirsizliğin hesaplanması	103
5.4	Amitrazın Kararlılığının İncelenmesi	104
5.4.1	Amitrazın ayvadaki kararlılığı	105

5.4.2	Amitrazın salatalıktaki kararlılığı.....	105
5.5	Amitrazın Ayvadaki Bozunma Sonuçları	106
5.5.1	-18 °C deki bozunma sonuçları	106
5.5.2	+4 °C deki bozunma sonuçları	107
5.5.3	+25 °C deki bozunma sonuçları	109
5.6	Amitrazın Salatalıktaki Bozunma Sonuçları	110
5.6.1	-18 °C deki bozunma sonuçları	110
5.6.2	+4 °C deki bozunma sonuçları	111
5.6.3	+25 °C deki bozunma sonuçları	113
5.7	Değerlendirme.....	114
KAYNAKLAR		117
ÖZGEÇMİŞ.....		121

KISALTMALAR

AKE	:Asetil kolinesteraz
AMPA	:Amino metil fosfonik asit
API	:Atmosferik basınçta iyonlaştırma
BHC	:Benzen heksaklorür
CI	:Kimyasal İyonlaştırma
CID	:Çarpışma Kaynaklı Parçalanma
DDE	:Dikloro difenil dikloroetilen
DDT	:Diklorodifeniltrikloroetan
DMA	:2,4 Dimetilaniline
DMF	:N-2,4 Dimetilfenil formamide
DMI	:Zorlu matriks girişi
DMPF	:N-2,4-Dimetilfenil-N-metil-formamidine
ECNCI	:Elektron yakalama negatif kimyasal iyonlaştırma
ECPA	:Avrupa tahıl koruma birliği
EI	:Elektron etkisi
EPSPS	:5-enolpiruval- şikimat-3-fosfolat sintaz
FT-IRC	:Fourier dönüşümlü iyon hızlandırıcı rezonans
GAP	:İyi tarım uygulamaları
GC-MS	:Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
GPC	:Jel geçirgenlik kromatografisi
GS	:Glutamin sintaz
HPLC-UV	:Yüksek performanslı likit kromatografi ultraviyole
HRMS	:Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
LC-MS	:Likit kromatografisi kütle spektrometresi
LC-MS/MS	:Likit kromatografisi tandem kütle spektrometresi
LC-QTOF-MS/MS	:Likit kromatografisi kuadrapol-uçuş süresi kütle
LLP	:Likit likit kısımlandırma
LRMS	:Düşük çözünürlüklü kütle spektrometresi
LOAEL	:Yan etkinin gözlemlendiği en düşük seviye
LOD	:Minimum tespit limiti
LOQ	:Minimum hesaplama limiti
LVI	:Büyük hacimli enjeksiyon
MIP	:Moleküler hafızalandırılmış polimer
MISPE	:Moleküler hafızalandırılmış katı faz ekstraksiyon

MRL	:Maksimum kalıntı Limiti
MRM	:Çoklu kalıntı metodu
MSPD	:Matriks Katı faz dispersiyon
NOAEL	:Yan etki gözlenmeyen seviye
PCDD	:polikloro difenil dioksin
PCI	:Pozitif kimyasal iyonlaştırma
PS-DVB	:Polistiren divinil benzen
PTFE	:Poli tetra floroetilen
PTV	:Programlanabilir sıcaklı buharlaştırma
RSD	:Bağıl standart sapma
SD	:Standart sapma
SEC	:Boyut ayırma kromatografisi
SPME	:Katı faz mikro ekstraksiyon
SRM	:Tekli reaksiyon izleme
TCDD	:Tetra kloro dibenzo-p- dioksin
TIC	:Toplam iyon akımı
TOF	:Uçuş süresi

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1: Kullanım alanlarına göre pestisitlerin sınıflandırılması.	1
Çizelge 1.2: Amitrazın Maksimum Kalıntı Limitleri.	2
Çizelge 2.1: Amid herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	11
Çizelge 2.2: Benzoik asit herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	11
Çizelge 2.3: Karbamat herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	12
Çizelge 2.4: Karbamat herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	13
Çizelge 2.5: Nitroanilin herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	14
Çizelge 2.6: Organofosforlu herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	15
Çizelge 2.7: Fenoksi asit herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	17
Çizelge 2.8: Piridin ve kuarterner amonyum herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	18
Çizelge 2.9: Piridazin ve piridazinon herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	19
Çizelge 2.10: Triazin herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	20
Çizelge 2.11: Fenilüre herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	21
Çizelge 2.12: Sülfonilüre herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	22
Çizelge 2.13: Benzoilüre insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	23
Çizelge 2.14: Karbamat insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	24
Çizelge 2.15: Organoklorlu insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	26
Çizelge 2.16: Organofosforlu insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	27
Çizelge 2.17: Payretroid insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	29
Çizelge 2.18: Azol fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	30
Çizelge 2.19: Benzimidazol fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	31
Çizelge 2.20: Ditiokarbamat fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	32
Çizelge 2.21: Morfolin fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	33
Çizelge 2.22: Çeşitli fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.	34
Çizelge 3.1: Yaygın elementlerin doğal bulunma oranları.	62
Çizelge 3.2: 2,3,7,8 TCDD nin muhtemel interferanslarını ayırmak için HRMS in uygulanması.	69
Çizelge 4.1: Çalışmada kullanılan pestisitlere ait bilgiler.	79
Çizelge 4.2: Çalışma standartlarının hazırlanması.	81
Çizelge 5.1: Gaz kromatografisi fırın programı.	84
Çizelge 5.2: Pestisitlerin alı konma zamanları.	84
Çizelge 5.3: PTV şartları.	85
Çizelge 5.4: Enjeksiyon sırasındaki split programı.	85
Çizelge 5.5: Kütle spektrometresi tarama programı.	87
Çizelge 5.6: Kütle spektrometresinde pestisitler için kullanılan iyonlar.	88
Çizelge 5.7: Pam, Dfg S19 ve Quechers metotlarının karşılaştırılması.	90
Çizelge 5.8: Kalibrasyon eğrisi verileri.	91
Çizelge 5.9: Salatalıkta LOD ve LOQ çalışmasına ait veriler.	94
Çizelge 5.10: Ayva da LOD ve LOQ çalışmasına ait veriler.	94
Çizelge 5.11: Salatalıkta düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları.	95
Çizelge 5.12: Salatalıkta yüksek konsantrasyonda geri kazanım çalışması.	96
Çizelge 5.13: Ayva da düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları.	96

Çizelge 5.14: Ayva da düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları ...	96
Çizelge 5.15: Salatalıkta tekraredilebilirlik çalışması sonuçları.....	97
Çizelge 5.16: Ayvada tekraredilebilirlik çalışması sonuçları	98
Çizelge 5.17: Doğruluk çalışması sonuçları	99
Çizelge 5.18: Standart hazırlamadan gelen belirsizlik sonuçları.....	101
Çizelge 5.19: Örnek hazırlamadan gelen belirsizlik sonuçları	102
Çizelge 5.20: Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik sonuçları.....	103
Çizelge 5.21: Amitraz için birleşik belirsizlik sonuçları	103
Çizelge 5.22: DMA için birleşik belirsizlik sonuçları	103
Çizelge 5.23: DMF için birleşik belirsizlik sonuçları.....	104
Çizelge 5.24: DMPF için birleşik belirsizlik sonuçları.....	104
Çizelge 5.25: 100 µg/kg için hesaplanmış örnek analiz sonucu	104

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Yıllara göre pestisit satış miktarı.....	8
Şekil 2.2: Kıtalara göre pestisit satışları.....	8
Şekil 2.3: Pestisit kullanım oranları.....	9
Şekil 2.4: Propanil ve Alaklorun molekül yapıları.....	10
Şekil 2.5: Dicambanın molekül yapısı.....	11
Şekil 2.6: Profam ve EPTC nin molekül yapıları.....	12
Şekil 2.7: Bromoksinil ve Ioksinil in molekül yapıları.....	13
Şekil 2.8: Pendimethalin bileşiğinin molekül yapısı.....	14
Şekil 2.9: Glifosat ve Glufasinat in molekül yapıları.....	14
Şekil 2.10: 2,4-D ve Diklofop bileşiklerinin molekül yapıları.....	15
Şekil 2.11: Parakuat ve Dikuat bileşiklerinin molekül yapıları.....	16
Şekil 2.12: Nurfurazon ve Pyridat bileşiklerinin molekül yapıları.....	18
Şekil 2.13: Simazin ve Metribuzin bileşiklerinin molekül yapıları.....	19
Şekil 2.14: Fenuron ve linuron un molekül yapıları.....	20
Şekil 2.15: Klorosulfuron ve Triasulfuron bileşiklerinin molekül yapıları.....	21
Şekil 2.16: Teflubenzuron un molekül yapısı.....	23
Şekil 2.17: Karbaril ve Metomil bileşiklerinin molekül yapıları.....	24
Şekil 2.18: Endosulfan ve p,p' – DDT nin molekül yapıları.....	25
Şekil 2.19: Fenitrothion ve Klorpirifos un molekül yapıları.....	26
Şekil 2.20: Permetrin in molekül yapısı.....	28
Şekil 2.21: Saprokonazol un molekül yapısı.....	30
Şekil 2.22: Tiabendazol un molekül yapısı.....	31
Şekil 2.23: Fenpropimorf bileşiğinin molekül yapısı.....	32
Şekil 2.24: Captan ve Klorotalonil in molekül yapıları.....	33
Şekil 2.25: Pestisitlerin direkt olmayan yolları.....	38
Şekil 3.1: Kütle spektrumu.....	59
Şekil 3.2: İzotopik piklerin karakteristiği.....	63
Şekil 3.3: Uzayda ardışık ayırma.....	70
Şekil 5.1: Pestisit standartlarının alıkonma zamanları.....	86
Şekil 5.2: PAM 302 metoduna ait akış şeması.....	88
Şekil 5.3: DFG S19 metoduna ait akış şeması.....	89
Şekil 5.4: Quechers metoduna ait akış şeması.....	89
Şekil 5.5: Amitraz a ait kalibrasyon eğrisi.....	92
Şekil 5.6: DMA ya ait kalibrasyon eğrisi.....	92
Şekil 5.7: DMF'e ait kalibrasyon eğrisi.....	93
Şekil 5.8: DMPF e ait kalibrasyon eğrisi.....	93
Şekil 5.9: Ayvadaki bozunma çalışmaları akış şeması.....	105
Şekil 5.10: Salatalıktaki bozunma çalışmaları.....	106
Şekil 5.11: -18 °C de DMA nın oluşma grafiği.....	106
Şekil 5.12: -18 °C de DMF in oluşma grafiği.....	107
Şekil 5.13: -18 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	107
Şekil 5.14: +4 °C de DMA nın oluşma grafiği.....	108
Şekil 5.15: +4 °C de DMF nın oluşma grafiği.....	108

Şekil 5.16: +4 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	109
Şekil 5.17: +25 °C de DMA nın oluşma grafiği.	109
Şekil 5.18: +25 °C de DMF in oluşma grafiği.	110
Şekil 5.19: +25 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	110
Şekil 5.20: -18 °C de DMA nın oluşma grafiği.	111
Şekil 5.21: -18 °C de DMF in oluşma grafiği.	111
Şekil 5.22: -18 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	111
Şekil 5.23: +4 °C de DMA in oluşma grafiği.	112
Şekil 5.24: +4 °C de DMF in oluşma grafiği.	112
Şekil 5.25: +4 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	113
Şekil 5.26: +25 °C de DMA in oluşma grafiği.	113
Şekil 5.27: +25 °C de DMF in oluşma grafiği.	114
Şekil 5.28: +25 °C de DMPF in oluşma grafiği.....	114
Şekil 5.29: Amitraz ve bozunma ürünleri	116

AYVA VE SALATALIKTA TARIM İLACI AMİTRAZIN BOZUNMA SÜRECİNİN İZLENMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Tarımsal uygulamalarda pestisit kullanımı ürün veriminde önemli miktarda bir artışın yanında böcekler, yabancı otlar ve bitki hastalıkları gibi sebeplerden kaynaklanan ürün kayıplarının azaltılmasını da sağlar. Yapılan tahminlere göre dünya da üretilen gıdanın %40 ı pestisit kullanılmadığı zaman tehlikeye girmektedir. Diğer taraftan tarımda pestisit kullanımı insan sağlığı ve çevre için ciddi bir risk oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüzey ve yer altı sularında pestisitlere rastlanmaktadır. İnsan sağlığının yanında pestisitler doğal bitki yaşamının yok edilmesini, doğal böcek nüfusunda azalmaların yanında balık ve vahşi yaşamını da olumsuz etkilemekte hatta zararlıların evrim geçirmesiyle ikincil zararlı problemlerine yol açmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yapılan tüketici anketlerinde gıda güvenliği konusunda tarımsal ilaç kalıntıları en önemli problem olarak görülmektedir.

Türkiye’de Avrupa birliğine oranla daha az miktarda pestisit kullanılmasına rağmen rastlanan pestisit kalıntısı sorunu daha fazladır. Meyve ve sebzelerdeki hastalık ve zararlılara karşı yapılan bilinçsiz mücadele çalışmaları sonucunda yetiştirilen ürünlerde pestisit kalıntılarına rastlanmakta bu da ürünlerimizin ihracatını ciddi bir şekilde tehlikeye sokmaktadır.

Amitraz sistemik olmayan akarasit ve insektisittir. Amitraz maytaların, sineklerin, yaprak bitlerinin armut/turunçgiller, çekirdekli meyveler, çalı, yumuşak meyveler, su kabağı, kırmızı biber ve domates gibi çok çeşitli ürünlerde büyümelerinin kontrol edilmesi için kullanılır. Türkiye’de amitraz kullanımı yasaklanmış olmasına rağmen sebze ve meyve ürünlerinde sıklıkla amitraz kalıntısına rastlanmaktadır. Özellikle yurt dışına ihraç edilen sebze ve meyveler de sıklıkla rastlanan amitraz kalıntısı Türkiye kaynaklı sebze ve meyve ürünlerinin itibarını kaybetmesinin yanı sıra çok ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Nitekim Avrupa Birliğine ihraç edilen gıda ürünlerinde rastlanan olumsuz sonuçların yayınlandığı raporlara göre Türkiye amitrazdan dolayı 2010 yılının ilk altı ayın da 6, 2009 yılında 12, 2008 yılında 30, 2007 yılında da 8 uyarı aldığı görülmektedir

Amitraz kullanımı Türkiye’de yasak olmasına rağmen hem arıcılıkta hem de sebze ve meyve üretiminde sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Amitrazın tespiti için literatürde çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu metotlar genellikle HPLC, GC-ECD, GC-MS ya da LC-MS/MS tekniklerine dayanmaktadır. Bu analizler genellikle kalıntı izleme programlarında kullanılan çoklu pestisit kalıntısı analiz metotlarıdır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki amitraz kararlı bir yapıya sahip olmayıp sıcaklık, nem, pH gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak bozunmaktadır. Mevcut verilere göre amitrazın hızlı bir bozunmaya uğrayarak 2,4 dimetilformamidin (DMF), N-(2,4-dimetil-fenil)-N’-metilformamidin (DMPF) ve 2,4 dimetil anilin (DMA) verdiği bilinmektedir. Toksikoloji çalışmaları molar düzeyde metabolitlerin toksisitesinin ana molekül kadar olduğu yönündedir. Sonuç ürün olan DMA (2,4 dimetil aniline) ise amitraza göre çok daha toksiktir ve buna ilaveten genetik bozukluğa ve kansere sebep olur. Dolayısıyla bu pestisit kararla anilin türevine bozunması önemli çevresel ve sağlık problemlerine yol açmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde kullanılması yasak olmasına rağmen yurt dışına ihraç ettiğimiz sebze ve meyvelerde sıklıkla problem olarak karşımıza çıkan amitrazın ve bozunma ürünlerinin tayini için uygun, doğru, güvenilir ve kolay uygulanabilir analiz yöntemi geliştirilmiş ve geçerli kılınması yapılmıştır. Daha sonra bu yöntem kullanılarak ayva ve salatalıkta amitrazın bozunma süreci izlenerek bozunma ürünlerinin tespiti ve tanımlanmasını gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız meyve ve sebzelerdeki kalıntı sorununu gündeme getirilmekle beraber, ülkemizde kullanımı yasak olmasına rağmen her yıl ihraç ettiğimiz ürünlerde rastlanıp sorun oluşturan amitrazın salatalık ve ayvada farklı sıcaklıklardaki kararlılığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

Amitraz ve bozunma ürünlerinin; DMA, DMF, DMPF in tayini için GC-MS metodu geliştirilmiştir. GC metodunda PTV enjeksiyon şekli en uygun enjeksiyon türü olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresinde SIM modu kullanılmış olup her pestisit için bir hesaplama birde doğrulama iyonu kullanılmıştır.

Amitrazın salatalık ve ayvadan alınması için quechers metodundan faydalanmıştır. Metotta numuneler asetonitril ile magnezyum sülfat ve tuz varlığında alındıktan sonra santrifüj edilip üst fazdan alınan 1 ml lik kısma MSPD uygulanmıştır. Bu metot geçerli kılınarak analitik gereksinimleri karşıladığı görülmüştür.

Metodun geçerli kılınmasından sonra üzerlerine amitraz uygulanan salatalık ve ayva numuneleri farklı sıcaklıklarda saklanarak bozunma süreci izlenmiştir. Amitrazın sıcaklık arttıkça daha hızlı bozunduğu ve temel olarak 3 bozunma ürününün DMA, DMF, DMPF in oluştuğu ayrıca bu üç bozunma ürününün haricinde iki adet daha bozunma ürününün oluştuğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak yaş sebze ve meyve yetiştiriciliği açısından önemli bir merkez olan ülkemizde ciddi pestisit kalıntısı sorunları yaşanmaktadır. Özellikle son yıllarda ihraç ettiğimiz ürünlerde amitraz a rastlanmasından dolayı ihraç ettiğimiz meyve ve sebzelerde çeşitli ülkelerle sorun yaşanmaktadır. Amitraz kullanımı ülkemizde yasak olmasına rağmen çeşitli ürünlerde bilinçsizce kullanılmaktadır. Amitrazın tayini için kullanılan analitik yöntemlerin birçoğu sadece diğer pestisitlerin yanı sıra amitrazın tespitine odaklanmıştır. Oysa ki amitraz hızlı bir şekilde farklı bileşiklere parçalandığından kullanılan analitik metotların bunların tespitini içerecek şekilde güncellenmesi gerekmektedir.

MONITORING OF DEGRADATION PROCESS OF PESTICIDE AMITRAZ AND KARACTERIZATION OF DEGRADATION PRODUCTS IN QUINCE AND CUCUMBER

SUMMARY

The use of pesticide in agricultural application causes not only significant increase in product yield but also decreasing product losses results from insects, herbs and plant diseases. It is estimated that if pesticides were not used 40% of foods would be under risk. On the other hand, pesticides have negative effects on human health and environment. Pesticide residues were detected in ground and underground water. Besides to human health, pesticides destroy ecological life and even cause secondary pest problems by evolution of pest. According to customer surveys which are made in developed countries show that pesticide residue is the most important food safety problem.

Although, in Turkey less pesticides are used with respect to European Union countries, detected pesticide residues problems are more than European Union countries. Unconscious pesticide applications against to pest in fruit and vegetables production causes pesticide residues problems in final product which causes serious risk on exporting our agricultural products.

Amitraz is a non systemic acaricide and insecticide. Amitraz is used to control mites, flycatchers, greenflyers in vegetable and fruits such as pear, citrus fruits, stone fruits, squash, red pepper and tomato. Although application of amitraz in agricultural production has been banned amitraz residues still detected in fruits and vegetables. Detection of amitraz residues on exported fruits and vegetables not only brings about economical losses but also decrease the prestige of Turkish products. According to report of "rapid alert system for food and feed" Turkey have had 6 notification in first six month of 2010. Turkey also had 12, 30 and 8 notifications in respectively 2009, 2008 and 2007.

Even though amitraz is a banned pesticide it is often used both beekeeping and fruits and vegetables production. There are some methods for detection of amitraz. These methods usually based on HPLC, GC-ECD, GC-MS and LC-MS-MS techniques. These methods are multi residues methods and used for pesticide residues monitoring. But latest studies on amitraz showed that amitraz is not a stable pesticide and it degrades to 2,4 dimethylformamidin (DMF), N-(2,4-dimethylfenil)-N'-metilformamidine (DMPF) ve 2,4 dimetil aniline (DMA) depends on temperature, moisture, pH and some other parameters. Toxicology studies prove that degradation product of amitraz are toxic as parent molecule. Moreover final product DMA is more toxic than amitraz and it is also mutagenic, oncogenic and genotoxic. Therefore degradation of amitraz is caused health and environmental problems.

In this study, a reliable, accurate practical method were developed and validated for determination of amitraz and its degradation products which are great problem in exported fruits and vegetables. Then, with suggested method degradation process of amitraz in quince and cucumber were monitored.

In our study not only stability of the amitraz which is banned pesticide was studied on in quince and cucumber but also brings to agenda a big problem of Turkey. Results of the study are follows;

A GC-MS method is developed for degradation product of amitraz DMA, DMF and DMPF. PTV injection technique is determined as suitable injection techniques. For detection of substances SIM mode is used and one ion is used for detection and other is confirmation.

To extract amitraz and its degradation products in quince and cucumber quechers methods is used. Samples are extracted with acetonitrile in presence of sodium chloride and magnesium sulphate. Solution is centrifuged and MSPD is applied to 1 ml supernatant. This method was validated.

The validated method was used to monitore degradation process of amitraz in quince and cucumber in different temperature. Amitraz is degradation is increase with temperature amd mainly three degradaion products forms. Besides this three main degradation product two other degradation products were detected.

In conclusion, as a important center for fruit and vegetable production Turkey has serious pesticide residues problems. Expecially in past years amitraz was detected in exported products which were coming from Turkey. Although application of amitraz has been banned it is used unconscionly in agricultural production. Most of the methods which are used to determination of amitraz is focused on detection only of amitraz. However amitraz degredate rapidly different molecules. Therefore analytical methods must be modified to be able to detect amitraz and degradation products

1. GİRİŞ

Pestisit; herhangi bir zararlıyı engellemek, yok etmek, uzak tutmak amacı ile kullanılan madde ya da karışımlardır. Tarımsal uygulamalarda pestisit kullanımı böcekler, yabancı otlar ve bitki hastalıkları gibi sebeplerden kaynaklanan ürün kayıplarını azaltmaya yardımcı olur. Yapılan tahminlere göre dünya da üretilen gıdanın %40 ı pestisit kullanılmadığı zaman tehlikeye girmektedir. Ancak tarımda pestisit kullanımı insan sağlığı ve çevre için ciddi bir risk oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüzey ve yer altı sularında pestisitlere rastlanmaktadır. İnsan sağlığının yanında pestisitler doğal bitki yaşamının yok olmasını, doğal böcek nüfusunda azalmaların yanında balık ve vahşi yaşamını da etkilemekte hatta zararlıların evrim geçirmesiyle ikincil zararlı problemlerine yol açmaktadır. Bunun yanında pestisit kullanımının getirdiği ekonomik katkıda önemsenmeyecek kadar büyüktür[1].

Gelişmiş ülkelerde yapılan tüketici anketlerinde gıda güvenliği konusunda tarımsal ilaç kalıntıları en önemli problem olarak görülmektedir. Pestisitlerin kullanıldıkları hedef canlıya göre sınıflandırılması Çizelge 1.1 de verilmiştir.

Çizelge 1.1: Kullanım alanlarına göre pestisitlerin sınıflandırılması.

Pestisit Grubu	Hedef Kullanım Alanı
İnsektisit	Böcekler
Herbisit	Yabancı otlar
Fungisit	Mantar
Nematosit	Nematod
Akarisit	Kene
Rodentisit	Fare
Algisit	Alg
Bakterisit	Bakteri
Defoliant	Yaprak

Amitraz sistemik olmayan akarisit ve insektisittir. Amitraz maytların, sineklerin, yaprak bitlerinin armut/turunçgiller, çekirdekli meyveler, çalı, yumuşak meyveler, su kabağı, kırmızıbiber ve domates gibi çok çeşitli ürünlerde gelişmelerini kontrol edilmesi için kullanılır [2].

Uluslar arası gıda standartlarına (Codex Alimentarius) göre amitrazın kullanılmasına izin verilen ürünler ve bu ürünlerdeki maksimum kalıntı limiti aşağıda verilmektedir [3].

Çizelge 1.2: Amitrazın Maksimum Kalıntı Limitleri.

Ürün	mg/kg
Sığır Eti	0,05
Kirazgiller	0,5
Pamuk Tohumu	0,5
Pamuk Tohumu Yağı	0,05
Salatalık	0,5
Sığır, Domuz, Koyunun yenilebilir sakatat kısımları	0,2
Sütler	0,01
Turunçgiller	0,5
Şeftali	0,5
Domuz eti	0,05
Armut/ayva/elma	0,5
Koyun eti	0,1
Domates	0,5

Avrupa birliğine üye ülkelere giren gıda ürünlerinde rastlanan uygunsuz sonuçların içinde yayınlandığı “Rapid Alert System for Food and Feed” belgelerinde Türkiye’den birliğe ihraç edilen ürünlerin amitraz içermesinden dolayı 2010 yılının ilk altı ayında 6, 2009, 2008 ve 2007 yıllarında sırasıyla 12, 30 ve 8 kez uyarı aldığı görülmektedir[4]. Dolayısıyla amitraz ve metabolitleri ihraç ettiğimiz sebze ve meyvelerde problem olarak gözükmemektedir.

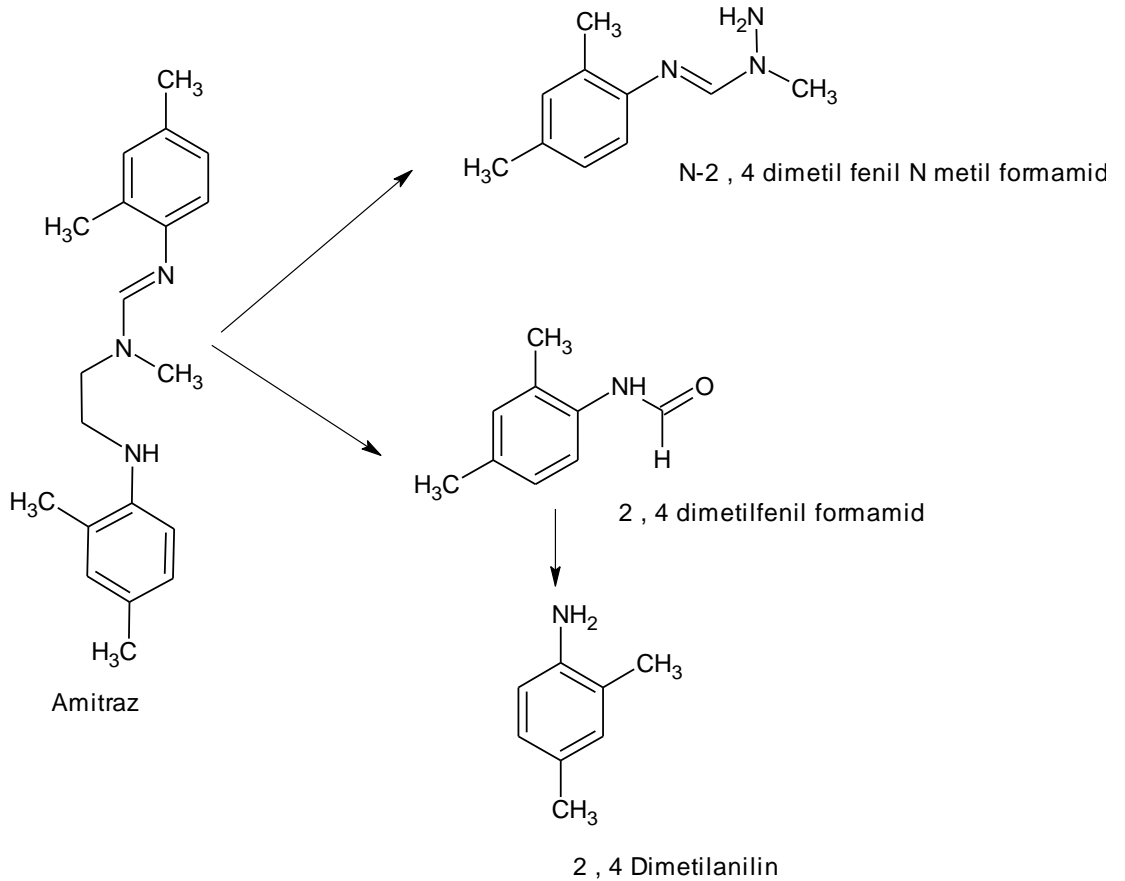
1.1 Literatür Özeti

Biotik ya da abiotik (biyotik olmayan) sistemlerde toksik bulaşanların (pollutant) metabolitlerinin ya da bozunma ürünlerinin yapısal tanımlanması kritik bir unsurdur. Ürün koruma kimyasallarının ürünlerin yenilebilir kısımlarındaki ya da gıda üretilen kısımlarındaki türlerini ve miktarlarını bilmek/tanımlamak önemlidir.

Bu kimyasal türlerin belirlenmesi ayrıntılı ve titiz bir seri çalışma ve araştırma gerektirir. Çünkü bunlar biyolojik, gıda ve çevre numunelerinde çok düşük seviyelerde bulduklarından numunelerde çok daha büyük derişimler de bulunan diğer bileşenlerle karışabilir veya örtülürler. Aslında bu bilim insanları için teşvik

edici bir problemdir. Çünkü bilinen metabolitlerin doğrulanmasının yanı sıra bilinmeyen olası metabolitlerin de ayırt edilmesi gerekir. Bunların düşük seviyelerde karmaşık matrislerin içerisinde tanımlanması ve doğrulanması zorlaşır[2].

Mevcut verilere göre amitrazın hızlı bir bozunmaya uğrayarak 2,4 dimetilformamidin (DMF), N-(2,4-dimetil fenil)-N'-metilformamidin (DMPF) ve 2,4 dimetil anilin (DMA) verdiği bilinmektedir. Amitraz ve bozunma ürünlerinin molekül yapıları Şekil 1.1 de verilmiştir[2]. Toksikoloji çalışmaları molar düzeyde metabolitlerin toksisliğinin ana molekül kadar olduğu yönündedir. Amitrazın ağız yoluyla alındığı zaman farelerde LD₅₀ değeri 523 mg/kg [5], sonuç ürün olan DMA (2,4 dimetil anilin) ise amitraza göre çok daha toksiktir LD₅₀ 467 mg/kg [6] ve buna ilaveten genetik bozukluğa ve kansere sebep olur. Dolayısıyla bu pestisitın kararlı anilin türevine bozunması önemli çevresel ve sağlık problemlerine yol açmaktadır.



Şekil 1.1: Amitrazın bozunma ürünleri.

Literatürde amitraz ve metabolitlerinin balda, armutta ve insan serumunda tayini için çeşitli yöntemler mevcuttur. Saito ve arkadaşları 0,2 ml serum örneğine 25 µl iç

standart ve 0,3 ml su ilave ettikten sonra tek parça silika döngü kolon alınması ile numuneyi temizledikten sonra LC-APCI-MS e enjekte ederek tespitini gerçekleştirmişlerdir. LC-MS de C18 (150 mm 2,1 mm, 3,5 um) kolon kullanıp mobil faz olarak değişmeli 10mM amonyum format ve asetonitril kullanılmıştır. Amitrazın tespiti için m/z 294, 163, 253 iyonları kullanılırken metaboliti içinse m/z 163 iyonu kullanmıştır. Metodun amitraz ve metaboliti için LOD değeri 5 ng/ml LOQ değeri 10 ng/ml, geri kazanım değeri amitraz için 91,2 metaboliti için 94,3 olarak hesaplanmıştır [7]. Pico ve arkadaşları amitrazın UPLC-QTOF cihazı ile tayini ve bozunma ürünlerinin tespiti için metot geliştirmişlerdir. Bu çalışma amitrazın bozunma ürünlerini LC-QTOF MS/MS ile karakterize etmeye odaklanmıştır [2].

Caldow ve arkadaşları ise amitrazın balda ve meyvelerde tespiti için GC-MS ile yeni bir yöntem geliştirerek valide etmişlerdir. Bu metot amitrazın asidik koşullarda tamamen 2,4 dimetil anilin e dönüştürülmesinden sonra GC-MS te tespitine dayanmaktadır. Kromatografik ayırım %5 difenil %95 dimetil polisiloksan dolgu malzemesi içeren 0,25 mm iç çap, 0,25 µm film kalınlığı olan 30 metrelik kapiler kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem de 2,4 dimetil anilinin tespiti için M/Z 106, 120 ve 121 iyonları kütle spektrumunda taranmıştır [8].

Korta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Amitrazın kararlılığını inceleyerek, amitrazın bozunma kinetiğinin ve bozunma ürünlerinin tespitini amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda balda amitrazın 10 gün içerisinde tamamen bozunduğu tespit edilmiştir [9].

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada ise Brimecombe ve arkadaşları amitrazın kararlılığını etkileyen faktörleri incelemişler. Yaptıkları çalışmanın sonucunda amitrazın hem kimyasal hem de biyolojik şartlarda hidroliz olduğunu, amitrazın kararlılığını etkileyen faktörlerin gün ışığı, sıcaklık, pH, çözen çeşidi ve tampon bileşimi olduğunu tespit etmişlerdir.

Amitrazın %20 asetonitril ve %20 Dimetilsülfoksit deki çözeltisinin karalı olduğu görülmüştür. %20 etanol deki çözeltisinde oksidasyon gözlemlenmiş ve 2,4 DMA ve DMF in oluştuğu görülmüştür. %20 metanol de amitrazın açık bir şekilde 2,4 DMA ya ve DMF ye okside olduğu görülmüştür.

pH 2 de amitrazın direk olarak 2,4 DMA ya hidroliz olduğu görülmüştür. 10 dakika içersinde Amitraz miktarının yarı yarıya azaldığı görülmüştür. pH ın 3 den büyük olduğu asidik bölgede ise amitrazın DMF ye ve sonrada 2,4 DMA ya hidroliz olduğu görülmüştür. Asidik şartlarda amitrazın bozunması için iki yolun mümkün olduğu rapor edilmiştir. pH<3 şartlarında Amitrazın hızlı ve direk olarak ara geçiş maddeleri oluşmadan 2,4 DMA ya hidroliz olduğu pH 3-6 da ise amitrazın göreceli olarak daha asit ortamda kararlı olan ara yapıya DPMF ve DMF ye hidroliz olduğu görülmüştür. pH 7 ve yukarisındaki pH lar da oluşan ana ara yapı DMF olarak tespit edilmiştir. 2,4 DMA ve DPMF de az miktarda gözlemlenmiştir. Amitrazın hidrolizi asidik şartlarda hızlı olurken nötr ve alkali koşullar arttıkça bozunması azalmaktadır. pH 2 de 24 saatte amitrazın %87,5, 10 gün sonra %98, 13 gün sonra ise tespit edilemez duruma geldiği görülmüştür. pH 10 da ise 25 gün sonra %60 bozunma gözlemlenmiştir [10].

1.2 Tezin Amacı

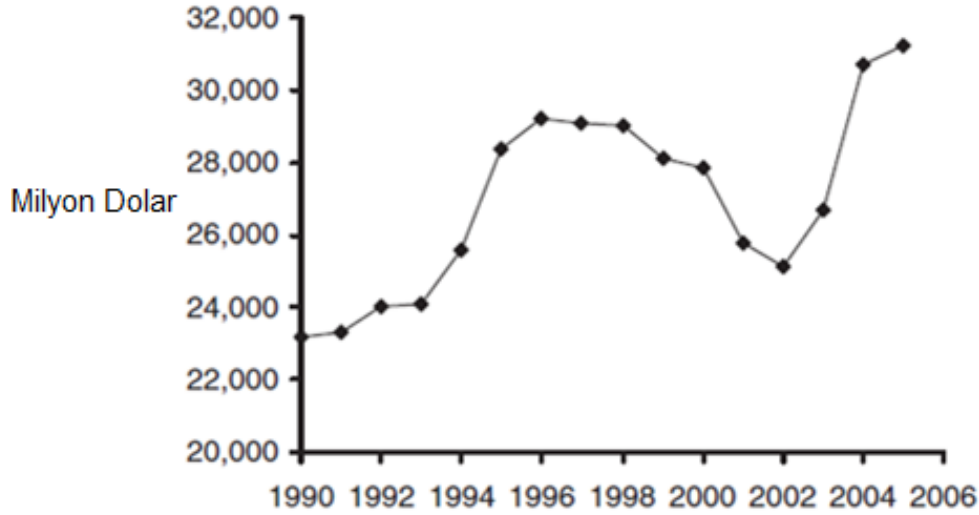
Bu çalışmanın amacı, ülkemizde kullanılması yasak olmasına rağmen yurt dışına ihraç ettiğimiz sebze ve meyvelerde sıklıkla problem olarak karşımıza çıkan amitrazın ve bozunma ürünlerinin tayini için uygun, doğru, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntemin geliştirilmesi ve daha sonra ayva ve salatalıkta amitrazın bozunma sürecini izleyerek oluşan ürünlerin tespiti ve tanımlanmasını gerçekleştirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pestisitler

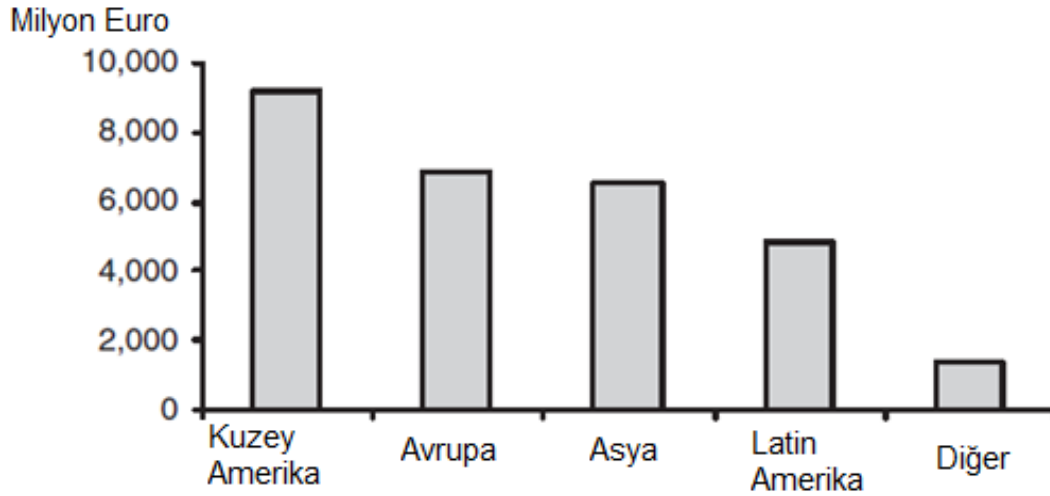
Pestisitler bazen virüs, bakteri gibi biyolojik ajanlarda kullanılsa da genellikle kimyasal maddelerdir. Pestisitinin aktif kısmı etken madde olarak bilinir ve genellikle üretici tarafından emülsiyon olabilen yoğunlaştırılmış ya da katı parçacık (toz, granül, çözünabilir ya da ıslanabilir pudra) olarak formüle edilir. Birçok ticari formülasyon kullanılmadan önce su ile seyreltilmek zorundadır ve yaprakların ya da filizler tarafından alınmasını ve soğrulmasını kolaylaştıran yardımcı maddeler içerir. Kullanım şekillerine göre birçok pestisit sınıfı vardır. Başlıca pestisit grupları, istenmeyen yabancı ot ve diğer bitkileri öldürmek için kullanılan herbisitler, böcek ve diğer eklembacaklıları öldürmek için kullanılan insektisitler ve mantarları öldürmek için kullanılan fungisitler. Diğer pestisit çeşitleri akarasitler, molluskasit, Nematosit, feromon, bitki büyüme düzenleyiciler, iticiler (repellents) ve rodentisitler [11].

Kimyasal maddeler tarımın başlangıcından beri insanlar tarafından haşereleri kontrol altında tutmak için kullanılmaktadır. İlk olarak kükürt, arsenik, cıva ve kurşun gibi inorganik bileşikler kullanılmıştır. Diklorodifeniltriokloroetan (DDT) nin insektisit olarak 1939 yılında Paul Muller tarafından keşfedilmesi haşerelerin kontrolünde çok büyük etki yaptı ve kısa sürede tüm dünya da kullanılır hale geldi. O sıralarda pestisitler sivrisinekler tarafından yayılan sıtma, pireler tarafından yayılan hıyarcıklı veba gibi milyonlarca insanın ölümüne yol açan hastalıkların kontrol altında tutulmasında çok popülerdi. Bununla beraber DDT nin kuşlar üzerindeki toksik etkisinin bilinmesiyle bu fikir değişmeye başladı[12]. Günümüzde pestisitlerin insanlar ve çevre üzerindeki muhtemel toksik etkileri sebebiyle dünya genelinde özellikle gelişmiş ülkelerdeki tescillerinde ve kullanılmalarında çok sıkı düzenlemeler vardır. Buna rağmen biyolojik kontrolde ve bitkilerin haşerelere karşı dayanıklı hale getirilmesinde mesafe kat edilmesine rağmen dünya nüfusunu beslemek ve hastalıklardan korumak için hala vazgeçilmezdir.



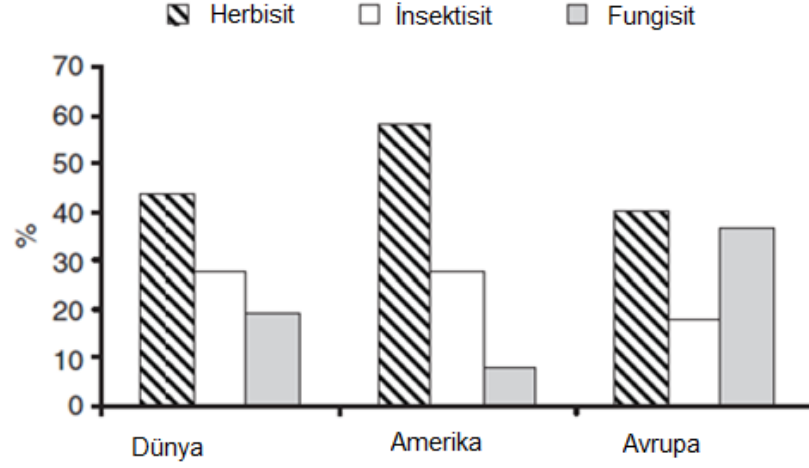
Şekil 2.1: Yıllara göre pestisit satış miktarı.

Pestisit kullanımı 1950 den beri 50 kat artarak günümüzde 2,5 milyon ton/yıl endüstriyel pestisit kullanılmaktadır. Şekil 2.1 son yıllardaki pestisit satış miktarını göstermektedir[1].



Şekil 2.2: Kıtalara göre pestisit satışları.

Avrupa Tahıl Koruma Birliği (ECPA) nın 2001 – 2002 yıllık raporuna göre 2001 yılında pestisit kullanılan başlıca tarımsal alanlar Kuzey Amerika %31,95, Avrupa %23,8 ve Asya %22,6 dır. Kıtalara göre farklı pestisit satışları ve farklı pestisit türlerinin kullanım oranları sırasıyla Şekil 2.2 ve 2.3 te verilmiştir[1].



Şekil 2.3: Pestisit kullanım oranları.

2.2 Pestisit Türleri

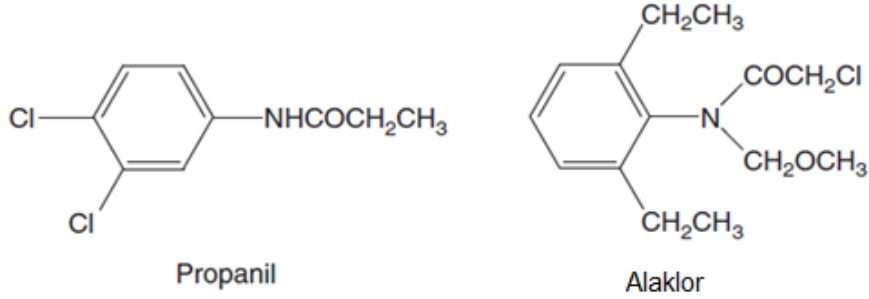
2.2.1 Herbisitler

Tarımda mekanize olmanın yaygınlaşmasıyla insanların yabancı otları kontrol altında tutması ve tahılları yetiştirme kabiliyetleri artmıştır; herbisitler bu gelişmede önemli rol oynamıştır ver eğer herbisitler kullanılmasıydı çok daha yüksek sayıda çiftçiye ihtiyaç duyulacaktı [1].

Herbisitler toprak ya da yaprak uygulamalı olarak genellikle kök ya da yaprak dokusu tarafından soğurulanlar olarak sınıflandırılabilir. Bu bileşikler genel ya da seçici olabilirler. Genel herbisitler tüm bitki örtüsünü öldürürken seçici herbisitler ürünü etkilemeden sadece yabancı otları kontrol ederler. Bu kimyasal maddeler, dikim öncesi, yüzeye çıkma öncesi ya da sonrası gibi farklı bitki büyüme aşamalarında uygulanabilir ve uygulama zamanı ürünlerde kontrol edilmesi istenen yabancı otlara bağlıdır. Herbisitin seçiciliği bitkilerdeki alımının farklı olmasına, yer değiştirmeye metabolizmasına ve etki alanındaki farklılıklara bağlıdır. Buhar basıncı, (Vp) oktanol/su dağılma kat sayısı (Kow) ve sudaki çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özellikleri hakkındaki bilgiler bu tür kimyasalların çevredeki davranışlarının tahmin edilmesine olanak sağlar. Herbisitler kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırılabilirler.

2.2.1.1 Amidler

Herbisitlerin bu grubunda R1-CO-N-(R2,R3) yapısını takip eden çok çeşitli varyasyonda bileşik vardır.

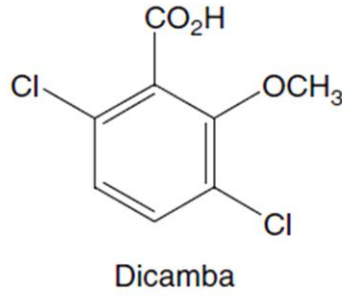


Şekil 2.4: Propanil ve Alaklorun molekül yapıları.

Bu grubun anahtar bileşenleri N-sübstitüye kloroasetamidler ve sübstitüye anilidlerdir. Kloroasetamidler otlar ve geniş yapraklı yabancı otlar için yüzeye çıkmadan önce yapraklara temas ile etkilidirler. Genel olarak bu bileşikler toprağa uygulanır ve mısır, soya fasulyesi ve şeker kamışı gibi birçok tarım ürünüde kullanılır, sürgünler ve kökler tarafından soğurulurlar ve genellikle toprakta kalıcı değildirler. Bu gruba ait propanil ve alaklorun molekül yapıları Şekil 2.4 te verilmiştir. Bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.1 de verilmiştir [1].

2.2.1.2 Benzoik asitler

Bu grup esas olarak sübstitüye benzoik asitlerin klorlu türevlerinden oluşur. Benzoik asit herbisitler büyüme düzenleyici ve büyüme hormonu aktivitesi özelliğine sahip oldukları bilinir. Bu bileşikler tuzları ve esterleri olarak uygulanır ve derin köklerdeki kalıcı yabancı otları kontrol etmek için kullanılır. Bu gruba ait dicamba'nın molekül yapısı Şekil 2.5 te bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri de Çizelge 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.5: Dicambanın molekül yapısı.

Çizelge 2.1: Amid herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

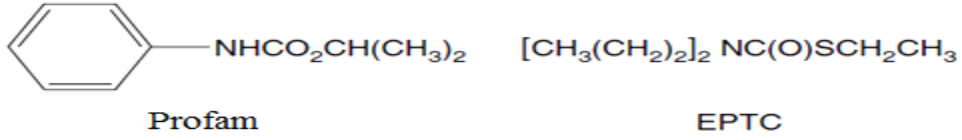
Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	Kow, logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Asetoklor C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	2-kloro-N-etoksümetil-6-0 etilaset-o-toluidid	0.005	4.14	223	8–18
Alaklor C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	2-kloro-2',6'-dietil-N-metoksümetilasetanilid	2.0	3.09	170	1–30
Butaklor C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	N-Butoksümetil-2-kloro-2',6' - dietilasetanilid	0.24	—	23	12
Metolaklor C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	2-Kloro-6-etil-N-(2-metoksi-1-metiletil)aset-o-toluidid	4.2	2.9	488	20
Propaklor C ₁₁ H ₁₄ ClNO	2-Kloro-N-isopropil asetanilid	10	1.423	580	4
Propanil C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	3',4' -Dikloro propionanilid	0.05	3.3	130	2–3

Çizelge 2.2: Benzoik asit herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	Kow, logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Kloramben C ₇ H ₅ Cl ₂ NO ₂	3-Amino-2,5-diklorobenzoik asit	—	—	0.7	14–21
Klortal-dimetil C ₁₀ H ₆ Cl ₄ O ₄	Dimetil tetrakloroterephthalate	0.21	4.28	0.5 × 10 ⁻³	33
Dicamba C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	3,6-Dikloro-o-metoksibenzoik asit	1.67	–1.88	6.1	<14

2.2.1.3 Karbamatlar

Karbamatlar karbamik asidin (R₁-O-CO-NR₂R₃) esterleridir ve tiokarbamatlarla birlikte (R₁-S-CO-NR₂R₃) herbisitlerin geniş bir kısmını temsil ederler. Karbamatlar genellikle toprağa yüzeye çıkmadan önce uygulanır. Bu gruba ait Profam ve EPTC nin molekül yapıları Şekil 2.6 da verilmiştir [13].



Şekil 2.6: Profam ve EPTC nin molekül yapıları.

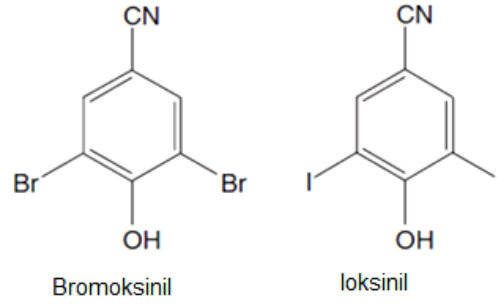
Bu bileşikler kök ya da sürgünler tarafından söğürülür ve sıklıkla bezelyelerde pankar ve diğer tarım ürünlerinde yıllık otları ve geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için kullanılır. Bu herbisitler normalde 3-5 hafta arasında toprak mikroorganizmaları tarafından parçalanır. Bu pestisitlerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.3 te verilmektedir.

Çizelge 2.3: Karbamat herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Klorprofam $C_{10}H_{12}ClNO_2$	Isopropil-3-klorokarbanilat	1.3	3.76	89	30–65
Desmedifam $C_{16}H_{16}N_2O_4$	Etil-3-fenilkarbamoiloksi fenilkarbamat	4×10^{-5}	3.39	7	34
EPTC $C_9H_{19}NOS$	S-Etil dipropiltiokarbamat	0.01	3.2	375	6–30
Molinat $C_9H_{17}NOS$	S-Etil azepan-1- karbotioat	746	2.88	970	8–25
Fenmedifam $C_{16}H_{16}N_2O_4$	Metil-3-(3-metilkarbaniloiloksi) karbanilat	1.3×10^{-6}	3.59	4.7	25
Profam $C_{10}H_{13}NO_2$	Isopropil fenilkarbamat	Yavaşça Sublimleşme	—	250	5–15
Thiobenkarb $C_{12}H_{16}ClNOS$	S-4-Klorobenzil dietilthiokarbamat	2.93	3.42	30	14–21
Triallat $C_{10}H_{16}Cl_3NOS$	S-2,3,3-Trikloroallil diisopropil(thiokarbamat)	16	4.6	4	56–77

2.2.1.4 Nitriller

Bu grupta yer alan bromoksinil ve ioksinil hidroksibenzonitril türevleridir ve herbisit olarak kullanılırlar. Tuzları ya da oktanoat esterleri olarak hazırlanırlar, yapraklara tahıllarda ve bahçe ürünlerinde geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için uygulanırlar. Bu bileşikler yüzeye çıkma sonrasında ve sıklıkla kontrol edilecek diğer yabancı ot türlerini genişletmek için diğer herbisitlerle birlikte kullanılırlar. Toprakta düşük kalıcılığa sahiptirler. Bu gruba ait bromoksinil ve ioksinil in molekül yapıları Şekil 2.7 de verilmiştir.



Şekil 2.7: Bromoksinil ve Ioksinil in molekül yapıları.

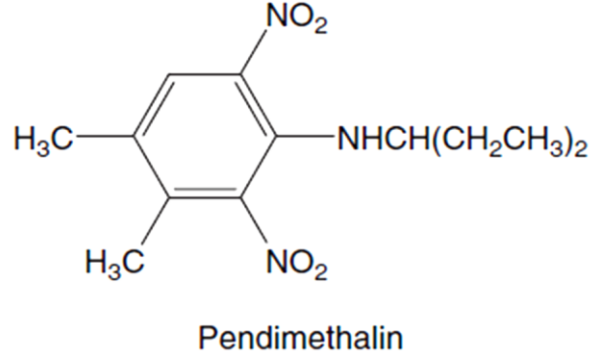
Bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.4 de verilmiştir [13].

Çizelge 2.4: Karbamat herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Bromoksinil $C_7H_3Br_2NO$	3,5-Dibromo-4-hidroksibenzonitril	6.3×10^{-3}	2,8	130	10
Ioksinil $C_7H_3I_2NO$	4-Hidroksi-3,5-diiodobenzonitril	<1	3,43	50	10

2.2.1.5 Nitroanilinler

Bu bileşikler 2,6 dinitroanilin türevleridir. Nitroanilinler düşük suda çözünürlük ve yüksek oktanal/su kısımlandırma katsayısı gibi benzer fizikokimyasal özelliklere sahip herbisit grubudur. Bu herbisitler yıllık otları ve birçok geniş yapraklı yabancı otları birçok üründe kontrol altında tutmak için toprağa uygulanarak kullanılırlar. 2,6 dinitroanilinler çok geniş herbisit aktivitesine sahiptir. Halkanın 3 ve /veya 4 konumunda ya da amino grubunda sübstütiye olma herbisit aktivitesini artırır. Genellikle toprakta belli kalıcılığa sahiptir. Önemli buhar basıncından dolayı toprağa bulaşır. Bu gruba ait pendimethalin in molekül yapısı Şekil 2.8 de verilmiştir. Bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.5 de verilmiştir.



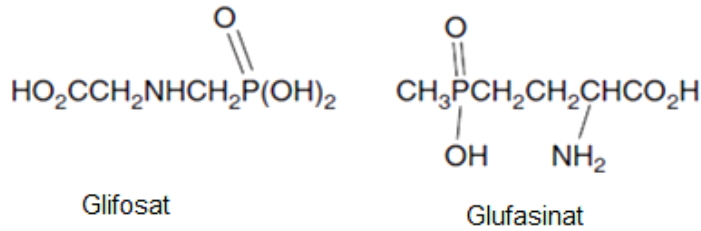
Şekil 2.8: Pendimethalin bileşiğinin molekül yapısı.

Çizelge 2.5: Nitroanilin herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	$K_{ow, logP}$	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Butralin $C_{14}H_{21}N_3O_4$	N-sek-Butil-4-ter-butil-2, 6-dinitroanilin	0,77	4,93	1	14
Ethalfuralin $C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	N-Etil- α, α, α -trifluoro-N-(2-metilallil) -2,6-dinitro- p-toluidin	11,7	5,11	0,3	25–46
Pendimethalin $C_{13}H_{19}N_3O_4$	N-(1-Etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-ksilidin	4	5,18	0,3	90–120
Trifluralin $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	α, α, α -Trifluoro-2,6-dinitro- N,N-dipropil-p-toluidin	6,1	4.83	0,22	57–126

2.2.1.6 Organofosforlular

Glifosat ve glifosinat geniş spektrumlu seçici olmayan, yüzeye çıkma sonrası da sadece yaprağa uygulandığında aktif olan herbisitlerdir. Bu gruba ait glifosat ve glufosinat in molekül yapıları Şekil 2.9 da verilmiştir. Bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.6 da verilmiştir [13].



Şekil 2.9: Glifosat ve Glufasinat in molekül yapıları.

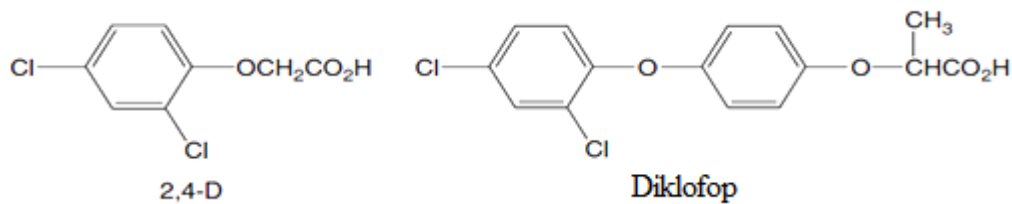
Sulu sistemlerde yabancı otları ve ürün yetiştirilmeyen alanlarda bitki örtüsünü kontrol altında tutmak için çok çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılırlar. Aminometil fosfonik asit (AMPA) glifosatın bitkilerde, suda ve toprakta bulunan ana bozunma ürünüdür [13].

Çizelge 2.6: Organofosforlu herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Glifosat $C_3H_8NO_5P$	N(Fosfonometil) glisin	1.3×10^{-2}	< -3.2	11.6	3–174
Glufosinat-amonyum $C_5H_{15}N_2O_4P$	Amonyum 4-[hidroksi-(metil) Fosfinoil]-DL-homoalaninat	<0.1	<0.1	1370	7–20

2.2.1.7 Fenoksi asitler

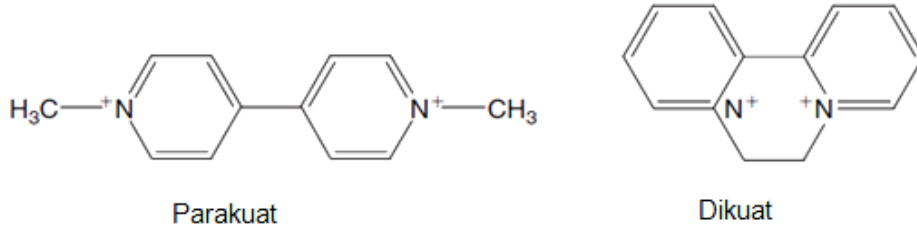
Fenoksi asitler 2,4 dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D asetik asit) ya da mecoprop (propionik asit) düşük karbon sayılı alkonik aside fenoksi radikali ile bağlanması ile oluşan bileşiklere verilen genel addır. Bu gruptaki bazı herbisitler steryo izomer olarak oluşturulurlar ve tekli enantiomerler ya da rasemik karışım olarak satılırlar. Bu gruba ait 2,4 D ve diklofop un molekül yapıları Şekil 2.10 da ve bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.7 de verilmiştir.



Şekil 2.10: 2,4-D ve Diklofop bileşiklerinin molekül yapıları.

2.2.1.8 Piridinler ve kuarterner amonyum tuzları

Piridinlerin (bipiridilyum) herbisit grubu parakuat ve dikuattan oluşturulurlar. Bu bileşikler setil-trimetil-amonyum-bromid gibi kuarterner amonyum germsitlerin genç bitkileri kuruttuğunun gözlenmesiyle geliştirildi. Bu gruba ait parakuat ve dikuat in molekül yapıları Şekil 2.11 de verilmiştir.



Şekil 2.11: Parakuat ve Dikuat bileşiklerinin molekül yapıları.

Klormequate ve mepiquate gibi diğer quaterner amonyum bileşikleri tahıllarda bitki büyüme düzenleyici, süs bitkilerinde çiçeklenmeyi arttırıcı, tarımsal bitkilerde ve ağaçlarda meyve yerleşmesini sağlayıcı olarak kullanılırlar. Paraquat ve diquat yapraklar tarafından absorplanan geniş spektrumlu herbisittir fakat kalıcı yabancı otların köklerini öldürmek için yeteri kadar yer değiştirici değildirler. Bu bileşikler quaterner amonyum yapılarından dolayı oldukça kuvvetli bazdırlar ve toprakta çok çabuk soğurulup deaktive olurlar. Dolayısıyla bu bileşikler yüzeye çıkmadan önceki aşamalarda etkili herbisitler değildirler. Suda yüksek çözünürlüğe sahiptirler ve düşük oktanal/su kısımlandırma katsayıları vardır. Ticari olarak dibromid ve diklorid tuzları olarak satılırlar. Bu herbisitler toprakta kuvvetli soğurulurlar ve desorpsiyonları için kuvvetli asit bozundurma gerekir. Bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.8 de verilmiştir.

Çizelge 2.7: Fenoksi asit herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

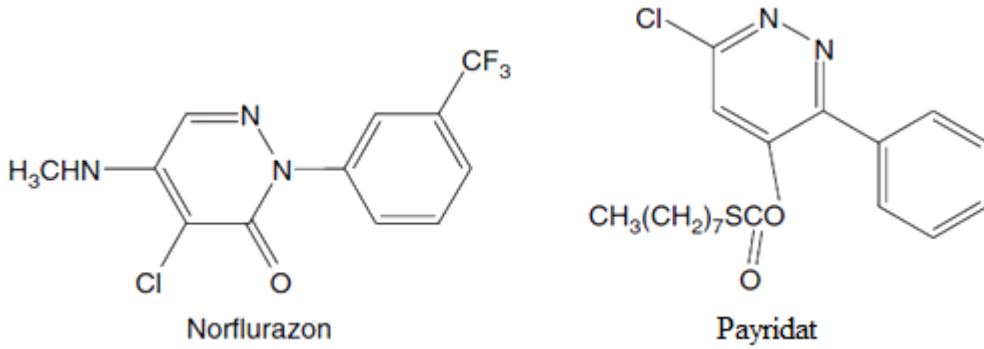
Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
2,4-D C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	2,4-Diklorofenoksi asetik asit	1,86 × 10 ⁻²	0,04	23,180	<7
Diklofop C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	(RS)-2-[4-(2,4-Diklorofenoksi) fenoksi] propionik asit	9,7 × 10 ⁻⁶	2,81	122,70	30
Fenoksaprop-P C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	(R)-2-[4-(6-kloro-1,3-benzoksazol -2-iloksi) fenoksi]propionik asit	1,8 × 10 ⁻¹	1,83	61000	1–10
Fluazifop-P C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄	(R)-2-[4-(5-Trifluorometil-2 -payridiloksi) fenoksi]propionik asit	7,9 × 10 ⁻⁴	-0,8	780	<32
MCPA C ₉ H ₉ ClO ₃	4-kloro-(2-metilfenoksi)asetik asit	2,3 × 10 ⁻²	-0,71	274	<7
Mekoprop-P C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	(R)-2-(4-Kloro-o-toliloksi)propionik asit	0,4	0,02	860	3–13
Kuizalofop- P-etil C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	Etil(R)-2-[4-(6-klorokuinoksalin-2-iloksi) fenoksi]propionat	1,1 × 10 ⁻⁴	4,66	0,61	≤1
Triklopir C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃	3,5,6 Trikloro-2-payridiloksiasetik asit	0,2	-0,45	8,10	46

Çizelge 2.8: Piridin ve kuarterner amonyum herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Dikuat dibromid $C_{12}H_{12}Br_2N_2$	1,1' -Etilen-2,2' -bipiridilyum	<0.013	-4.6	700	<7
Parakuat diklorid $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$	1,1' -Dimetil-4,4' -bipiridinyum diklorid	<0.01	-4.5	620	<7
Klormekuat klorid $C_5H_{13}Cl_2N$	2-Kloroetil trimetil amonyum	<0.01	-1.59	1000	1–28
Mepikuat klorid $C_7H_{16}ClN$	1,1' -Dimetil-piperidinyum klorid	<0.01	-2.82	500	10–97

2.2.1.9 Payridazinler ve payridazonlar

Payridat ve payridazinonlar norflurazonlar ve kloridazonlar gibi bu grupta yer alırlar. Yıllık otları, geniş yapraklı yabancı otları, tahıllarda, mısırdaki, pirinçteki ve diğer ürünlerdeki otları kontrol etmek için yüzeye çıkma sonrası ya da öncesinde kullanılan yaprak aktiviteli temas seçici herbisitlerdir. Genellikle pyridazonlar toprakta uzun süre kalırlar. Bu gruba ait nurflurazon ve payridat ın molekül yapıları Şekil 2.12 de ve bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.9 de verilmiştir.



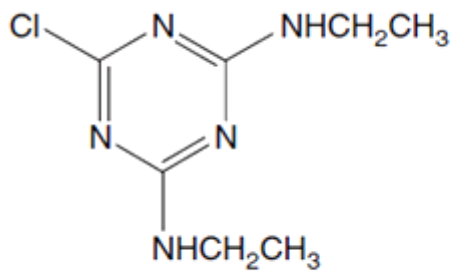
Şekil 2.12: Nurflurazon ve Pyridat bileşiklerinin molekül yapıları.

Çizelge 2.9: Piridazin ve piridazinon herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

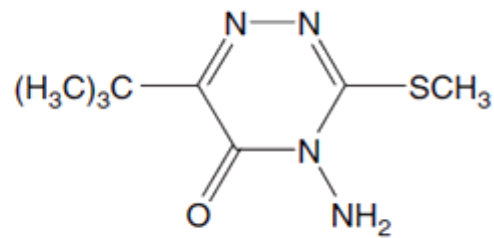
Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Kloridazon $C_{10}H_8ClN_3O$	Amino-4-kloro-2-fenilpayridazin-3(2H)-on	<0.01	1.19	340	21–76
Norflurazon $C_{12}H_9ClF_3N_3O$	4-Kloro-5-metil amino-2-(α,α,α -trifluoro-m-tolil) payridazin-3(2H)-on	3.8×10^{-3}	2.45	34	45–180
Pyridat $C_{19}H_{23}ClN_2O_2S$	Kloro-3 fenil payridazin -4-il-S-oktiltiokarbonat	4.8×10^{-4}	4.01	1.5	<3

2.2.1.10 Triazinler

Çok çeşitli triazin bileşikleri yıllık ve geniş yapraklı otları ekili ve ekili olmayan alanlarda kontrol altında tutmak için zaman içerisinde sentezlendiler. Düşük dozlarda mısır ve diğer tahıllarda geniş yapraklı otları öldürmek için etkilidirler, yüksek dozlarda da toprak sterilizasyonunda kullanılabilirler. Genellikle bu herbisitler yüzeye çıkmadan önce veya sonra uygulanabilirler ve sırasıyla kökler ya da filizler tarafından absorplanırlar. Bazı durumlarda aktif olduğu alanı genişletmek için diğer herbisitlerle karışımları kullanılır. Bu bileşikler toprakta kabul edilebilir kalıcılığa sahiptir. Bu gruba ait simazine ve metribuzin in molekül yapıları Şekil 2.13 de ve bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.10 da verilmiştir.



Simazin



Metribuzin

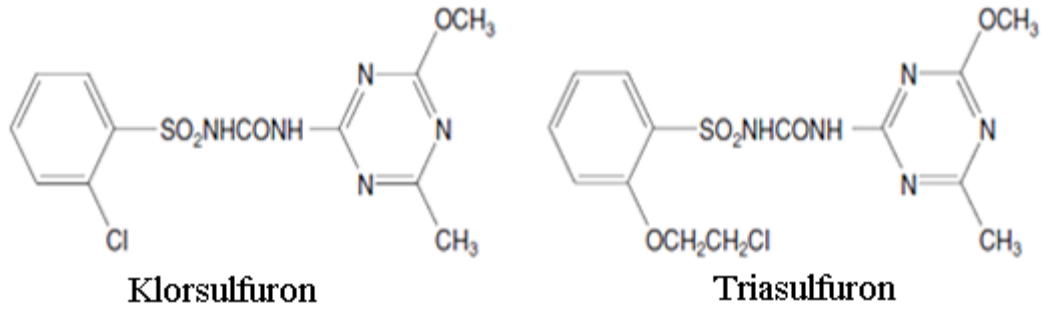
Şekil 2.13: Simazin ve Metribuzin bileşiklerinin molekül yapıları.

Çizelge 2.11: Fenilüre herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Klorotoluron $C_{10}H_{13}ClN_2O$	3-(3-Kloro-p-tolil)-1,1-dimetil-üre	0,005	2,5	74	30–40
Diuron $C_9H_{10}C_{12}N_2O$	3-(3,4-Diklorofenil)-1,1-dimetilüre	$1,1 \times 10^{-3}$	2,85	36	90–180
Fenuron $C_9H_{12}N_2O$	1,1-Dimetil-3-fenilüre	21	—	3850	60
Isoproturon $C_{12}H_{18}N_2O$	3-(4-Isopropilfenil)-1,1-dimetilüre	$8,1 \times 10^{-3}$	2,5	65	6–28
Linuron $C_9H_{10}C_{12}N_2O_2$	3-(3,4-Diklorofenil)-1-metoksi-1-metilüre	0,051	3,0	63,8	38–67

2.2.1.12 Sülfonilüreler

Bu süstitüye üre grubu fenil üre herbisitlere göre kilogram/hektar yerine gram/hektar uygulama oranıyla daha yüksek aktiviteye sahiptir. Normalde yüzeye çıkma evresinden sonra uygulanır ve kökler ve filizler tarafından absorplanırlar ve bazı durumlarda sahada belirgin kalıcılığa sahiptirler. Bu gruba ait klorsulfuron ve triasulfuron un molekül yapıları Şekil 2.15 de ve bu sınıfa ait herbisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.12 de verilmiştir.



Şekil 2.15: Klorsulfuron ve Triasulfuron bileşiklerinin molekül yapıları.

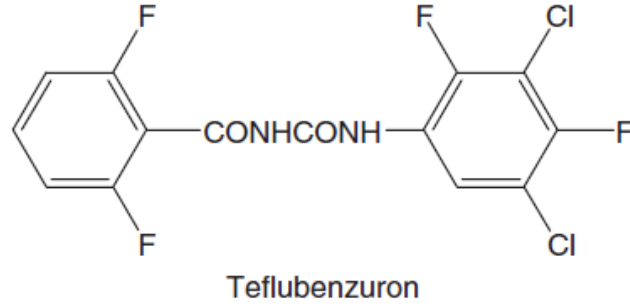
Çizelge 2.12: Sülfonilüre herbisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Azimsulfuron C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₅ S	1-(4,6-Dimetoksipirimidin-2-il)-3-[1metil-4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-pirazol-5-ilsulfonil]üre	4,0 x 10 ⁻⁶	-1,37	1050	—
Klorsulfuron C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	1-(2-Klorofenilsulfonil)-3-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)üre	3 x 10 ⁻⁶	-0,99	7000	28–42
Flazasulfuron C ₁₃ H ₁₂ F ₃ N ₅ O ₅ S	1-(4,6-Dimetoksipirimidin-2-il)-3-(3-trifluorometil-2-piridilsulfonil)üre	<0,013	-0,06	2100	<7
İmazosulfuron C ₁₄ H ₁₃ ClN ₆ O ₅ S	1-(2-Kloroimidazo[1,2-a]piridin-3-ilsulfonil)-3-(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)üre	4,5 x 10 ⁻⁵	0,049	308	—
Metsulfuron-metil C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	Metil-2-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2 ilkarbamoil sulfamoil) benzoat	3,3 x 10 ⁻⁷	-1,74	2790	7–35
Rimsulfuron C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	1-(4,6-Dimetoksipirimidin-2-il)-3-(3-etilsulfonil-2-piridil sulfonil)üre	1,5 x 10 ⁻³	-1,47	7300	10–20
Thifensulfuron-metil C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₆ S ₂	Metil 3-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2 ilkarbamoil sulfamoil)thiofen-2-karboksilat	1,7 x 10 ⁻⁵	0,02	6270	6–12
Triasulfuron C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S	1-[2-(2Kloroetoksi)fenilsulfonil]-3-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)üre	<2 x 10 ⁻³	-0,59	815	19
Tribenuron-metil C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S	Metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il(metil)karbamoil sulfamoil]benzoat	5,2 x 10 ⁻⁵	-0,44	2040	1–7

2.2.2 İnsektisitler

Tarımsal üretim bitkilere zarar veren ve sonuçta ürün veriminde azalmaya sebep olan haşerelerden etkilenebilirler. Dolayısıyla insektisitler ürünlerde haşereleri kontrol altında tutabilmek için yaygın olarak kullanılır. Bu bileşikler toprak kaynaklı haşereleri öldürmek için toprağa uygulanabilir ya da bitkinin havayla temas eden kısmına uygulanır. Uygulanan insektisitlerin büyük bir çoğunluğu ya direk uygulamalarla ya da yapraklardan ve gövdeden süzülerek toprağa ulaşır.

2.2.2.1 Benzoilüreler



Şekil 2.16: Teflubenzuron un molekül yapısı.

Bazı benzoilüre türevlerinin biyolojik aktivite çalışmalarında haşerelerin tüy dökme işleminde rol oynayan insektisit aktivitesi tespit edilmiştir. Benzoilüreler böcek büyüme düzenleyici olarak davranır ve böceğin dış iskeletinde kitin oluşumuna interfere olurlar. İnsektisit olarak kullanılan birçok benzoilürelerde florür atomu kullanılır ve yüksek molekül ağırlığına sahiptirler. Çizelge 2.13 te bu bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri özetlenmiştir. Bu gruba ait teflubenzuron un molekül yapısı Şekil 2.16 da verilmiştir.

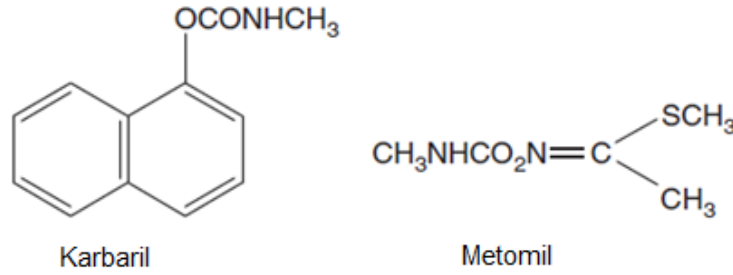
Çizelge 2.13: Benzoilüre insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Diflubenzuron $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$	1-(4-Klorofenil)-3-(2,6difluorobenzoil) üre	$1,2 \times 10^4$	3.89	0,08	<7
Heksaflumuron $C_{16}H_8C_{12}F_6N_2O_3$	1-[3,5-Dikloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoro etoksi) fenil]-3-(2,6- difluorobenzoil)üre	$5,9 \times 10^2$	5.68	0,027	50–64
Teflubenzuron $C_{14}H_6C_{12}F_4N_2O_2$	1-(3,5-Dikloro-2, 4-difluorofenil)- 3-(2,6-difluorobenzoil) üre	$0,8 \times 10^6$	4.3	0,019	14–84
Triflumuron $C_{15}H_{10}ClFN_2O_3$	1-(2Klorobenzoil)-3(4trifluorometoksifenil) üre	4×10^5	4.91	0,025	112

2.2.2.2 Karbamatlar

Çeşitli fenollerin N-Metil ve N,N dimetil karbamik esterleri kullanışlı insektisit özelliğine sahiptir. Aromatik N-Metil karbamatlar fenil-N-Metil karbamatın çok çeşitli klorür, alkil, alkilthio alkoksi ve dialkilamino yan zinciriyle türevleridir. Bazı

karbamat insektisitler moleküllerinde sülfür atomu içerir. Bu bileşikler geniş uygulama alanına sahiptir ve özellikle güve larvaları salyangozları, sümüklü böcekleri ve ev tipi böcekleri de içeren süs bitkisi böceklerinde etkilidir. Bazıları sistemik karakter gösterir. Bu gruba ait karbaril ve metomil in molekül yapıları Şekil 2.17 de verilmiştir. Bu sınıfa ait insektisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.14 de verilmiştir.



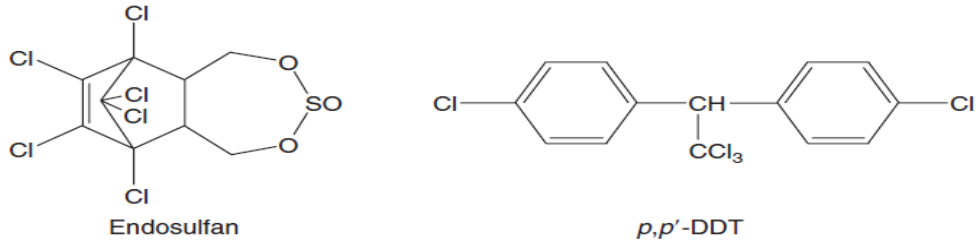
Şekil 2.17: Karbaril ve Metomil bileşiklerinin molekül yapıları.

Çizelge 2.14: Karbamat insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Aldikarb $C_7H_{14}N_2O_2S$	2-Metil-2-(metilthio) Propion aldehyd O-metilkarbamoiloksim	13	—	4930	30
Karbaril $C_{12}H_{11}NO_2$	1-Naftil metilkarbamat	$4,1 \times 10^{-2}$	1,59	120	7–28
Karbofuran $C_{12}H_{15}NO_3$	2,3-Dihidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il metilkarbamat	0,031	1,52	320	30–60
Karbosulfan $C_{20}H_{32}N_2O_3S$	2,3-Dihidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il(dibutilaminothio) metilkarbamat	0,041	-	0,35	2–5
Fenoksikarb $C_{17}H_{19}NO_4$	Etil-2-(4-fenoksifenoksi) etilkarbamat	$8,67 \times 10^{-4}$	4,07	7,9	31
Methomil $C_5H_{10}N_2O_2S$	S-Metil N-(metilkarbamoiloksi) thioasetamidat	0,72	0,093	57,900	5–45
Oksamil $C_7H_{13}N_3O_3S$	N,N' -Dimetil-2-metil karbamoil oksiiimino-2-(metilthio) asetamid	0,051	0,44	280,000	7
Pirimikarb $C_{11}H_{18}N_4O_2$	2-Dimetilamino-5, 6-dimetil payrimidin- 4-il dimetilkarbamat	0,4	1,7	3000	7–234

2.2.2.3 Organoklorlular

Bu insektisitler üç tür kimyasal ile DDT türevleri, benzen hegzaklorür (BHC) izomerleri ve siklodien bileşikleri ile karakterize edilir. DDT suda çözünmezliği ve çok düşük buhar basıncı sebebi ile temas etkili insektisitler arasında en kalıcı ve sürekli olanıdır. DDT farklı böcek ailelerinde geniş spektrumlu etkiye sahiptir. BHC izomerleri çok çeşitli haşerelere karşı aktiftir. Siklodien bileşikleri temas etkisi ve uzun kalıcılık gerektiğinde etkilidir. Bu bileşikler geniş spektrum özelliğine sahiptir ve meyvelerde, sebzelerde haşereleri, pamukta toprak böceklerini kontrol etmekte kullanılır. Kalıcılıkları ve toksikliklerinden dolayı bu organo klorlu bileşikler yasaklanmış veya sınırlandırılmıştır. Bu gruba ait Endosulfan ve p,p' – DDT nin molekül yapıları Şekil 2.18 de verilmiştir. Bu sınıfa ait insektisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.15 de verilmiştir.



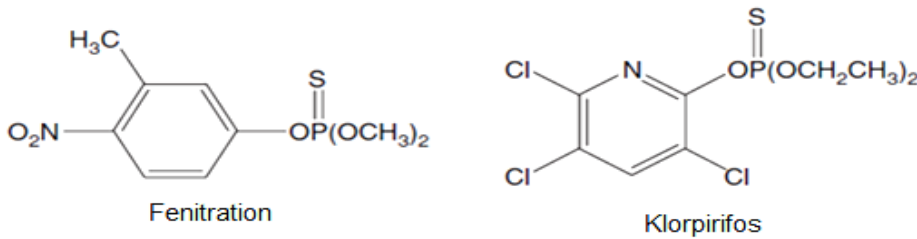
Şekil 2.18: Endosulfan ve p,p' – DDT nin molekül yapıları.

Çizelge 2.15: Organoklorlu insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Aldrin $C_{12}H_8Cl_6$	1,2,3,4,10,10-Heksakloro-1,4,4a,5,8,8a-heksahidro-ekso-1,4-endo-5,8-dimethan naftalen	3,08	5,0–7,4	<0,05	365
p,p' –DDT $C_{14}H_9Cl_5$	1,1,1-Trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)ethane	0,025	6,19–6,91	0,0055	2000
Dieldrin $C_{12}H_8Cl_6O$	1,2,3,4,10,10-Heksakloro-6,7-epoksi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidro-endo-1,4-ekso-5,8-dimethanonaftalen	0,4	4,32–5,40	0,186	1000
Dicofol $C_{14}H_9Cl_5O$	2,2,2-Trikloro-1,1-bis(4-klorofenil)etanol	0,053	4,28	0,8	45
Endosulfan $C_9H_6Cl_6O_3S$	(1,4,5,6,7,7-Heksakloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ilenebismetilene) sulit	0,83	4,74	0,32	30–70
g-HCH $C_6H_6Cl_6$	1,2,3,4,5,6-Heksaklorosikloheksan	4,4	3,5	8,5	400
Metoksiklor $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	1,1,1-Trikloro-2,2-bis(4-metoksifenil)etan	<1	—	0,1	120
Tetradifon $C_{12}H_6C_{14}O_2S$	4-Klorofenil-2,4,5-triklorofenilsulfon	$3,2 \times 10^5$	4,61	0,078	—

2.2.2.4 Organofosforlu insektisitler

Organofosforlu insektisitler moleküllerinde bir ya da daha fazla fosfor atomu içeren hidrokarbon bileşikleridir. Bu bileşikler biyolojik sistemlerde nispeten kısa ömürlüdür. Organo fosforlu insektisit tiplerinin çeşitliliği onları en kullanışlı grup yapar. Kalıntı etkisi olmayan, uzun süreli etkisi olan, geniş spektrumlu ve oldukça seçici etkisi olan bileşikler vardır. Genelde suda çözünürler ve kolayca hidroliz olurlar ve uygulamadan birkaç hafta içinde topraktan dağılırlar. Düşük kalıcılıkları ve yüksek verimliliklerinden dolayı bu bileşikler bitki, hayvan ve toprak uygulamalarında sistemik insektisit olarak yaygın olarak kullanılırlar. Bu gruba ait fenitroton ve klorpirifos un molekül yapıları Şekil 2.19 de verilmiştir. Bu sınıfa ait insektisitlerin adları ve kimyasal özellikleri de Çizelge 2.16 da verilmiştir.



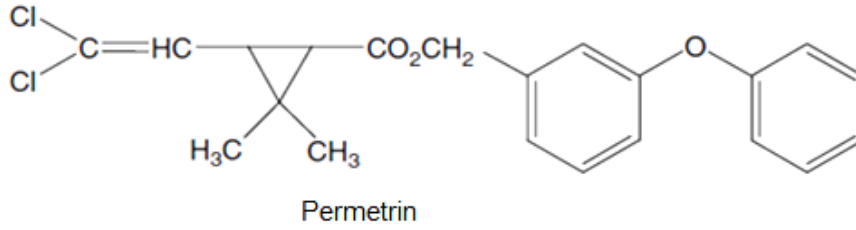
Şekil 2.19: Fenitroton ve Klorpirifos un molekül yapıları.

Çizelge 2.16: Organofosforlu insektisirlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Azinfos-metil C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	S(3,4-Dihidro-4-oksobenzo[d]-[1,2,3]triazin-3-ilmetil) O,O-dimetil fosforo dithioat	5 × 10 ⁴	2,96	28	10–40
Klorfenvinfos C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	2-Kloro-1-(2,4-dikloro fenil)vinil dietilfosfate	1	3,85	145	—
Klorpayrifos C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	O,O-Dietil O-3,5,6-trikloro-2-payridil fosforothioat	2,7	4,7	1,4	35–56
Klorpayrifos-metil C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	O,O-Dimetil O-3,5,6-trikloro-2-payridil fosforothioat	3	4,24	2,6	1,5–33
Coumafos C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	O-3-Kloro-4-metil-2-okso-2H-kromen-7-il O,O-dietil fosforothioat	0,013	4,13	1,5	—
Diazinon C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	O,O-Dietil O-2-isopropil-6-metilpayrimidin-4-il fosforo dithioat	12	3,30	60	11–21
Diklorvos C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	2,2-Diklorovinil dimetil fosfat	2,1 × 10 ³	1,9	18,00	0,5
Dimethoat C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	O,O-Dimetil S-metil karbamoilmetil fosforo dithioat	0,25	0,704	23,80	2–4
Fenitrotion C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	O,O-Dimetil O-4-nitro-m-tolil fosforothioat	18	3,43	14	12–28
Fenthion C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	O,O-Dimetil O-4-metilthio-m-tolil fosforothioat	1,4	4,84	4,2	34
Malation C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	S-1,2-Bis(etoksikarbonil) etil O,O-dimetil fosforo dithioat	1,1	2,75	145	1
Methamidofos C ₂ H ₈ NO ₂ PS	O,S-Dimetil fosfor amidothioat	2,3	0,8	>2 × 10 ⁵	6
Methidathion C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	S-2,3-Dihidro-5-metoksi-2-okso-1,3,4-thiadiazol-3-il metil O,O-dimetil fosforodithioat	0,25	2,2	200	3–18
Oksidemeton-metil C ₆ H ₁₅ O ₄ PS ₂	S-2-Etilsulfinitetil O,O-dimetil fosforothioat	3,8	0,74	1 × 10 ⁶	2–20
Fosmet C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	O,O-Dimetil S-ftalimido metil fosforodithioat	0,065	2,95	25	4–20
Pirimifos-metil C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	O-2-Dietilamino-6-metil payrimidin-4-il O,O-dimetil fosforothioat	2	4,2	10	3,5–25
Profenofos C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	O-4-Bromo-2-klorofenil O-etil S-propil fosforothioat	0,12	4,44	28	7
Triklorfon C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	Dimetil 2,2,2-trikloro-1-hidroksietilfosfonat	0,5	0,43	1,2 × 10 ⁵	5–30

2.2.2.5 Payretroidler

Pyrethrinler, krizantemin belirli türlerinin çiçeğinden izole edilen pyrethrum dan elde edilen doğal insektisitlerdir. İnsektisit özellikleri çiçeklerde çoğunlukla bulunan beş ester den dolayıdır. Bu esterler asimetrik karbon atomları ve alkolik ve asit kısımlarında çift bağlara sahiptir. Doğal olarak oluşan formları esterler (+) trans asitten ve (+) cis alkollerden dir. Sentetik pyrethrinler pyrethroidler olarak adlandırılırlar ve doğal olanlardan daha geniş haşere spektrumu için daha iyi etki gösterirler. Böceklere karşı seçici etki gösterirlerken kuşlara ve memelilere düşük toksiklik gösterirler. Pyrethroidler temas etkili olarak değerlendirilirler ve böceğin sinir sistemini etkileyip neuronal membranları bozarlar. Bu bileşikler toprakta bozunup toprak florasin da olumsuz etkiye sebep olmazlar. Ayrıca evlerde sinek ve sivrisinekleri kontrol altında tutmak için kullanılırlar. Bu gruba ait permethrin in molekül yapısı Şekil 2.20 de verilmiştir. Bu sınıfa ait insektisitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.17 da verilmiştir.



Şekil 2.20: Permetrin in molekül yapısı.

Çizelge 2.17: Payretroid insektisitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

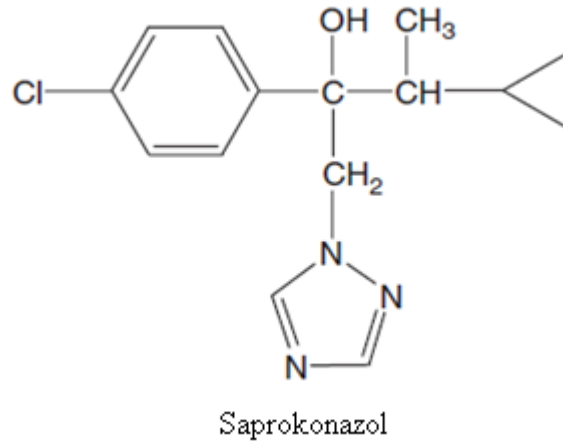
Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Akrinatriin C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO ₅	(S)- α -Siyano-3-fenoksi benzil (Z)-(1R,3S)-2,2-dimetil-3-[2-(2,2,2-trifluoro-1-trifluorometil etoksi karbonil) vinil] siklopropan karboksilat	4,4 x 10 ⁻⁵	5,6	0,02	5–100
Sayflutrin C ₂₂ H ₁₈ C ₁₂ FNO ₃	(RS)- α -siyano-4-fluoro-3-fenoksi benzil (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetil siklo propan karboksilat	stereoisomer I: 9,6 x 10 ⁻⁴ II: 1,4 x 10 ⁻⁵ III: 2,1 x 10 ⁻⁵ IV: 8,5 x 10 ⁻⁵	I: 6, II: 5,9 III: 6 IV:5,9	I: 2,2 x10 ⁻³ II: 1,9 x10 ⁻³ III: 2,2x10 ⁻³ IV: 2,9x10 ⁻³	56–63
Saypermetrin C ₂₂ H ₁₉ C ₁₂ NO ₃	(RS)- α -Siyaano-3-fenoksibenzil(1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetil siklopropan karboksilat	2 x 10 ⁻⁴	6,6	0,004	60
Deltametrin C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	(S)- α -Siyano-3-fenoksibenzil(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetil siklopropan karboksilat	1,24 x 10 ⁻⁵	4,6	<0,2x10 ⁻³	23
Esfenvalerat C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	(S)- α -Siyaano-3-fenoksibenzil-(S)-2-(4-klorofenil)-3-metilbutirat	2 x 10 ⁻⁴	6,22	0,002	35–88
Tau-fluvalinat C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	(RS)- α -Siyano-3-fenoksibenzil-N-(2-kloro- α , α , α -trifluoro-p-tolil)-D-valinat	9 x10 ⁻⁸	4,26	0,001	12–92
Permetrin C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	3-Fenoksibenzil-(1RS,3RS;1RS,3SR)- 3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetil siklo propan karboksilat	cis: 0,0025 trans: 0,0015	6,1	6 x 10 ⁻³	<38

2.2.3 Fungisitler

Fungisitler tarımda bitki hastalıklarını kontrol etmek için kullanılırlar, farklı kimyasal sınıflara aittirler. Bu bileşiklerin çok çeşitli fiziko kimyasal özellikleri kimyasal yapılarına göre gözlemlenebilir. Bazı fungusitler steryo izomerdir ve normal olarak bu izomerlerin karışımı olarak satılırlar. Fungisitler tahılları, meyveleri ve sebzeleri fungal hastalıklara karşı korumak için hasat öncesinde ya da sonrasında kullanılabilirler.

2.2.3.1 Azoller

İmidazol halkası biyolojik olarak aktif birçok bileşikte mevcuttur diğerleri ise triazole halkasına sahiptir. Bu bileşikler birçok bitki hastalığı yapan fungi, tohum sarıcı, yaprak fungusitlere karşı etkili ve meyvelere hasat sonrası uygulanan sistemik etkili fungusittir. Suda hemen hiç çözünmezken tuzları suda çözünürler. Bu gruba ait cyproconazole un molekül yapısı Şekil 2.21 de verilmiştir. Bu sınıfa ait fungusitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.18 de verilmiştir.



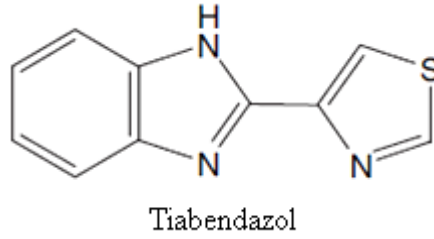
Şekil 2.21: Saprokonazol un molekül yapısı.

Çizelge 2.18: Azol fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktak i yarı-ömürü (Gün)
Saprokonazol C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	(2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-Klorofenil)-3-siklopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol	0,04	2,91	140	90
Flusilazol C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	Bis(4-fluorofenil)(metil)(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)silan	0,04	3,74	54	95
Heksaconazol C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	(RS)-2-(2,4-Diklorofenil)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)heksan-2-ol	0,018	3,9	17	—
Imazalil C ₁₄ H ₁₄ C ₁₂ N ₂ O	(±)-1-(b-Alliloksi-2,4-diklorofeniletıl)imidazol	0,158	3,82	180	150
Prokloraz C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	N-Propil-N-[2-(2,4,6-trikloro fenoksi) etıl]imidazol-1-karboksamid	0,09	4,12	34,4	120
Propikonazol C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	(±)-1-[2-(2,4-Diklorofenil)-4-propil-1,3-dioksolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol	0,03	3,72	100	110
Tebukonazol C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	(RS)-1-p-Klorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol	0,002	3,7	36	—
Triadimefon C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	(1-(4-Klorofenoksi)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-on	0,02	3,11	64	6–60

2.2.3.2 Benzimidazoller

Benzimidazoller tipi fungusitler sistemik etkiye sahip fungusitlerdir. Genellikle bitkinin kökleri tarafından alınır ve aktif madde ksilem boyunca aşağıdan yukarıya yapraklara taşınır. Bu bileşikler bitki korumasında çözünür tuzları şeklinde kullanılırlar. Bunlar yaprak ve toprak fungusitleridir geniş ve çok özel etki alanıyla ayrıca tohum ve hasat sonrası uygulamalarında da kullanılırlar. Bu gruba ait tiabendazol un molekül yapısı Şekil 2.22 de verilmiştir. Bu sınıfa ait fungusitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.19 da verilmiştir.



Şekil 2.22: Tiabendazol un molekül yapısı.

Çizelge 2.19: Benzimidazol fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Benomil C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Metil 1-(butil karbamoil) benzimidazol-2-ilkarbamat	<0,005	1,37	0,003	67
Karbendazim C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	Metil benzimidazol-2-il karbamat	0,15	1,51	8	120
Thiabendazol C ₁₀ H ₇ N ₃ S	2-(Thiazol-4-il) benzimidazol	4,6x10 ⁻⁴	2,39	30	33–120

2.2.3.3 Ditiokarbamatlar

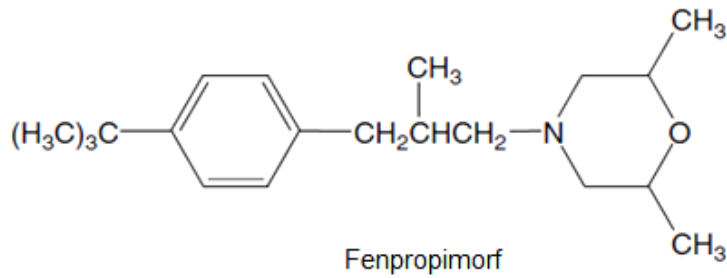
Etilenbisditiokarbamatlar etilendiamin H₂N-K₂-K₂-NH₂ den hazırlanırlar. Bu bileşikler etilenbisditiokarbamatın metal tuzlarıdır ve bu tuzlar beklenmedik bir şekilde kararlı ve fungusit olarak kullanışlıdır. Ditiokarbamat fungusitler en yaygın olarak kullanılan organik fungusitlerdir ve meyve, sebze ve süs bitkilerinde yaprak spreyi ve tohum koruyucu olarak geniş spektrum etkisine sahiptirler. Bu gruba ait mancozeb in molekül yapısı [SC(S)NHC₂H₄NHCSSMn]xZny şeklindedir. Bu sınıfa ait fungusitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.20 de verilmiştir.

Çizelge 2.20: Ditiokarbamat fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Mankozeb (C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄) _x (Zn) _y	Manganes etilenebis (ditiokarbamat) (polimerik) çinko tuzu ile kompleks	<1	1.8	6.2	6–15
Maneb C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄	Mangane etilenebis (ditiokarbamat)	<0.01	0.45	257	25
Metiram (C ₁₆ H ₃₃ N ₁₁ S ₁₆ Zn ₃) _x	Çinko amoniat etilenebis (ditiokarbamat)- poli(etilenethiuram disulfid)	<0.01	0.3	0.1	20
Nabam C ₄ H ₆ N ₂ Na ₂ S ₄	Disodium etilenebis (ditiokarbamate)	İhmal edilebilir	—	2 x105	—
Zineb (C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn) _x	Çinko etilenebis (ditiokarbamate) (polimerik)	<0.01	1.3	10	23
Ziram C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn	Çinko bis (dimetilditiokarbamat)	<0.001	1.23	1.58–18.3	2

2.2.3.4 Morfolinler

Morfolinler tozsuz küf fungusine karşı çok özel sistemik fungusitlerdir ve hastalığı kontrol etmek için tahıllarda, salatalıkta elmada ve benzeri ürünlerde kullanılırlar. Bu bileşikler bitkilerde kökten ve yapraklardan yayılır ve bitkiyi hastalığa sebep olan fungiye karşı korur. Toprakta belirli kalıcılığa sahiptirler. Bu gruba ait fenpropimorph'un molekül yapısı Şekil 2.24 de verilmiştir. Bu sınıfa ait fungusitlerin adları ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.21 de verilmiştir.

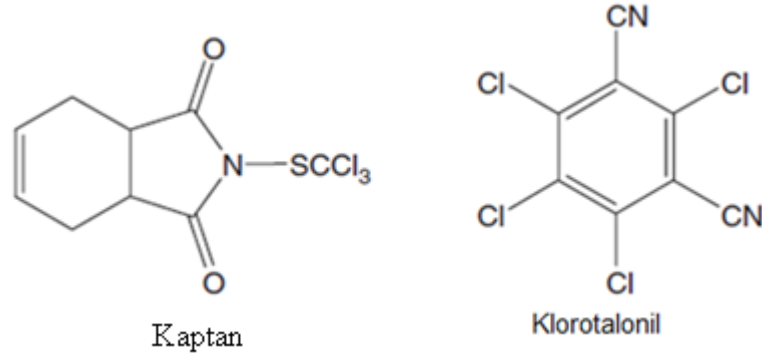


Şekil 2.23: Fenpropimorph bileşiğinin molekül yapısı.

Çizelge 2.21: Morfolin fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K_{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Dodemorf $C_{18}H_{35}NO$	4-siklododesil- 2,6-dimetil morpholin	0.48	4.14	<100	73
Fenpropimorf $C_{20}H_{33}NO$	(±)-cis-4-[3-(4-tert- Butilfenil) 2-metilpropil]- 2, 6-dimetilmorfolin	3.5	4.2	4.3	15–93
Tridemorf $C_{19}H_{39}NO$	2,6-Dimetil-4-tridesil morfolin	12	4.2	1.1	14–34

2.2.3.5 Diğer pestisit türleri



Şekil 2.24: Captan ve Klorotalonil in molekül yapıları.

Captan ve folpet meyvelerde, sebzelerde ve süs bitkilerinde yaprak uygulamalarında, toprak ve tohum uygulamalarında hatta hasat sonrası uygulamalarda kullanılan fungusitlerdir. Prosimidon ortalama sistemik etkisiyle dikarboksimid türevi fungusittir. Sadece kökler tarafından değil ayrıca gövde ve yapraklar tarafından da hızlı bir şekilde absorplanır. Meyvelerin ve sebzelerin depo köklerini kontrol etmek için kullanılır ve tahılların tohum giydirilmesinde etkilidir. Kaptan ve klorotalonil in molekül yapıları Şekil 2.25 te verilmiştir. Çizelge 2.22 sıklıkla kullanılan farklı kimyasal sınıfa ait fungusitlerin özelliklerini özetler [13].

Çizelge 2.22: Çeşitli fungusitlerin kimyasal isimleri ve özellikleri.

Genel Adı	IUPAC isimlendirmesi	Buhar Basıncı, mPa	K _{ow} , logP	Sudaki çözünürlüğü, mg/L (25°C)	Topraktaki yarı-ömrü (Gün)
Azoksistrobin C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	(E)-2-{2-[6-(2-syanofenoksi)pirimidin-4 -iloksi] fenil}-3-metoksiakrilat	1,1 x 10 ⁻⁷	2,5	6	7-56
Kaptan C ₉ H ₈ C ₁₃ NO ₂ S	N-(Triklorometiltio)sikloheks-4-ene-1,2-dikarboksimid	<1,3	2,8	3,3	1-10
Klorotalonil C ₈ Cl ₄ N ₂	Tetrakloroisoftalonitril	0,076	2,92	0,81	5-36
Sayprodinil C ₁₄ H ₁₅ N ₃	4-Siklopropil-6-metil-N-fenilpirimidin-2-amin	0,51	4	13	20-60
Fenheksamid C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	N-(2,3-Dikloro-4-hidroksi fenil)- 1-metil sikloheksan karboksamid	4,0 x 10 ⁻⁴	3,51	20	1
Folpet C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S	N-(Triklorometiltio) ftalimid	2,1 x 10 ⁻²	3,11	0,8	4,3
Iprodione C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	3-(3,5-Diklorofenil)-N-isopropil-2,4-diokso imidazolidene-1-karboksamid	5 x 10 ⁻⁴	3	13	20-160
Metalaksil-M C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Metil-N-(metoksi asetil)-N-(2,6-ksilil)-D-alaninat	3,3	1,71	26000	5-30
Ofurak C ₁₄ H ₁₆ ClNO ₃	(±)-α-(2-Kloro-N-2,6-ksilil asetamido)-g-butirolakton	2 x 10 ⁻²	1,39	146	26
Orthofenilfenol C ₁₂ H ₁₀ O	Bifenil-2-ol	—	—	700	—
Purosimidon C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	N-(3,5-Diklorofenil)-1,2-dimetilsiklopropan-1,2-dikarboksimid	18	3,14	4,5	7-21
Payrimetanil C ₁₂ H ₁₃ N ₃	N-(4,6-Dimetilpirimidin-2-il)anilin	2,2	2,84	121	7-54
Tolilfluaniid C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	N-Diklorofluorometiltio-N',N' -dimetil-N-p-tolilsulfamid	0,2	3,90	0,9	2-11
Triforin C ₁₀ H ₁₄ Cl ₆ N ₄ O ₂	N-N' -[Piperazine-1,4-diilbis [(triklorometil)metilen] diformamid	80	2,2	9	21

2.3 Etki Şekli

Pestisitlerle haşere kontrolü bu bileşiklerin etki şekli, ekinin bulunduğu safhaya, nem, toprak çeşidi, sıcaklık gibi çevre koşulları gibi birçok faktöre bağlıdır.

2.3.1 Herbisitler

2.3.1.1 Aminoasit sentezi engelleyiciler

Aminoasit sentezi engelleyiciler normal bitki büyüme ve gelişiminde yapı taşı olan belirli aminoasit üretimini engellemek için belirli bir enzim üzerine etkirler.

Herbisitlerin bir çeşidi dallanmış zincirli amino asit biyosentetik yolunda en yaygın enzim olan asetolaktat sentaz (ALS) nin engellenmesine sebep olur ALS engelleyiciler sulfonil üre herbisit ailesini kapsar. Bu bileşikler seçicilikte oldukça meşhurdurlar ve bazıları oldukça etkilidir. Aromatik halkalı aminoasitler triptofan, fenilalanin ve tyrosine bitkiler tarafından shikimik asit yoluyla sentezlenir. Bu yolu engelleyen sadece bir pestisit glifosat ticari olarak satılmaktadır. Glifosat'ın etki şekli 5-enolpiruval-şikimat-3-fosfolat sentaz (EPSPS) enziminin engellenmesidir. Bu enzim bitkilerde, funguslarda ve bakterilerde mevcut olup hayvanlarda bulunmaz ve bu aminoasidi üretmedikleri için dietleri vastasıyla almak zorundadırlar.

Herbisitler tarafından hedef olarak alınan aminoasit sentezinde yer alan enzim glutamine synthase (GS) glutamat ve amonyaktan glutamin yapar. Bu enzim bitkilerde mevcuttur. Azot özümlemesinde önemli rol oynar. Hayvanlarda da glutam neurotransmitterdir ve GS tarafından etkisiz hale getirilebilir. Herbisit glufasinate in etki şekli enzim glutamine synthase in engellenmesidir.

2.3.1.2 Hücre bölünmesi engelleyicileri

Bu çeşit herbisitler ökoryotik hücrelerde iç hücre iskeletinin yapımında önemli olan tubulin proteini ile reaksiyona girer. Bu bileşikler tubulin e bağlanarak normal hücre bölünmesini arızaya uğratar. Hücre bölünmesini engelleyen herbisitler dinitroanilinler, benzoik asidler ve piridinler gibi çeşitli kimyasal sınıflara aittir.

2.3.1.3 Fotosentez engelleyiciler

Fotosentez bitkiler için anahtar süreçtir dolayısıyla birçok herbisit için ana hedefdir. Fotosentezin engellenmesinde serbest radikal üreticiler, elektron taşıma sisteminin engellenmesi ve koruyucu pigmentlerin engellenmesi gibi farklı mekanizmaları içerir. Fakat genelde herbisitlerin çoğunluğu elektron transferini düzenleyen çok özel proteine bağlanarak plastoquinone havuzuna elektron taşınmasını engeller.

Fotosentez engelleyici olarak etki eden herbisitler farklı kimyasal bileşimden azot içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler fenil üreler, triazinler, pyridazinler, fenilkarbamatlar, nitriller ve amidler gibi birçok herbisit ailesini kapsar.

2.3.2 İsektisitler

2.3.2.1 Sinir sisteminde sinyal bozucular

Sinyal sistemini bozan kimyasallar genellikle kuvvetli zehirlerdir. Piretroidler de organo klorlu insektisitler bu sınıftaki en önemli insektisirlere dir. Bunların etki şekli, voltaj-girişli sodyum kanallarına etki ederek kanalların uygun biçimde kapatılmasını engellemektir. Pyrethroidler böceğin merkezi sinir sisteminde sinir uyarılarının ileriye nakledilmesini sinir membranının sodyum ve potasyum geçirgenliğini bozarak değiştirir. Organo klorlular böcek sinirinin lipoprotein yapısının gözenekleriyle etkileşerek bozunmaya ve sonuçta sinir impulse iletiminin uyarılmasına sebep olur. Lindane gibi klorlu siklodien insektisitlerin toksik özelliği γ -aminobutirik asid geçişli klor kanallarının etrafına yerleşir ve böcekte kasılma üretir.

2.3.2.2 Kolinesteraz engelleyiciler

Birçok insektisitinin hedefi asetilkolinesteraz (AKE) enzimidir. Bu enzim sinir sisteminin önemli bir bileşenidir ve hayvanlarda önemli rol oynar fakat bitkiler sinir sistemine sahip olmadığı için bitkilerde önemli değildir. Organofosforlu insektisitlerin AKE nin esteratik aktif kısmını fosforilatlama kapasitesi vardır. Fosforilatlanmış enzim geri dönüşümsüz olarak engellenmiştir ve normal fonksiyonu olan astilkoline in hızlı giderilmesini yerine getiremez. Sonuç olarak AKE sinir sisteminin normal işlemlerini bozar. Karbamatlarda kuvvetli AKE engelleyicilerdir ve asetilkoline alıcıları üzerinde direk etkisi vardır.

2.3.2.3 Kitin sentezini engelleyiciler

Kitin doğada oldukça baskın bir polisakkarittir. Eklembacaklılarda ve mantarlarda bulunurken bitki ve memelilerde bulunmaz.

Benzoilürele böceğin epiderminde kitin sentezini N-asetilglukozamine ünitelerinin kitin zincirine katılmasını bozarak etkiler bu sayede böceğin normal kabuk değiştirme işlemi engellenir.

2.3.3 Fungisitler

2.3.3.1 Sülfhidril reaktifleri

Sülfhidril (SH) grupları birçok enzimin aktif kısmında bulunan oldukça önemli reaktif gruplardır. Ditiyokarbamat fungusitler fungal hücrelerin SH içeren enzim ve co-enzimleriyle reaksiyona girer. Enzim engellenmesi metal içeren enzimlerin metal atomuyla aktif maddenin kompleks oluşumuyla da gerçekleşebilir.

Perhalojen merkaptanlar, captan ve folpet birçok enzimin sülfhidril grubuyla reaksiyona giren pestisitlere güzel örnektir. Bu fungusitler hücre membranının yapısını ve fonksiyonlarını etkiler ve enzim sistemini engelleyerek mitokondride tümöre neden olur.

2.3.3.2 Hücre bölünmesi engelleyiciler

Benzimidazole fungusitler, hücrelerde iç hücre iskeletinin yapı taşı olan tubulin proteini ile reaksiyona girer. Hücre bölünmesindeki bozulma çoğu durumda mikro tüplerin oluşumunun engellenmesiyle oluşturulur. Benomil, karbendazim ve tiobendazole gibi benzimidazoller ve karbamat gibi diğer fungusitler bu etki şekline sahiptir.

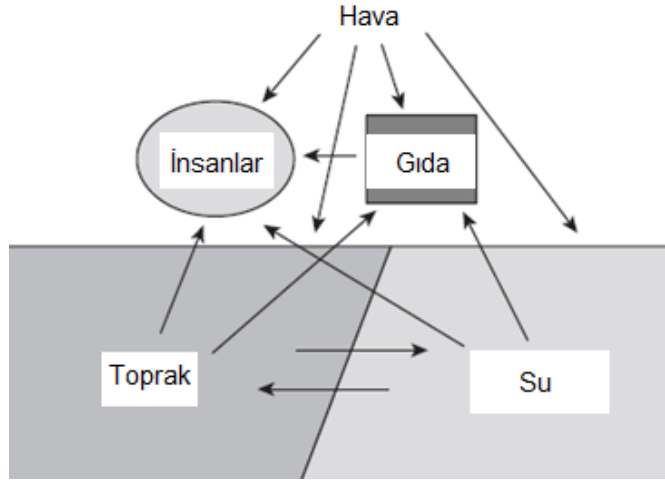
2.3.3.3 Ergosterol sentezi engelleyiciler

Ergosterol engelleyici fungusitler çok farklı mantarlara karşı aktiftirler. Yüksek bitkilerde sterol ve gibberallin sentezini bozmasına rağmen fitotoksiklileri düşüktür. Sterol sentezi oldukça komplekstir ve farklı grup fungusitler bu sentezde farklı hedefler üzerine etkir. Geniş bir grup fungusit demetilase engelleyiciler olarak adlandırılan azoller, morfolinler, piridinler ve pioerazinler gibi -N- içeren aromatik halkaya sahip çeşitli bileşikler kapsar.

2.4 Toksiklik ve Risk Değerlendirme

Pestisitler insanlara ve çevreye yan etkisi olabilecek toksik bileşiklerdir. Bir bileşiğin toksikliği zararlı etki üretme kapasitesi olarak tarif edilir, diğer terim kimyasalların risk değerlendirmesi zarara ve riske sebep olma ve zararın ihtimaliyeti olarak tarif edilir. Risk karakterizasyonu; insan, hayvan ve çevreye gerçek ya da tahmini maruz kalmasından dolayı yan etkinin sıklığını ve şiddetinin tahminidir.

İnsanlar pestisitlere doğrudan ya da dolaylı yoldan maruz kalırlar doğrudan ya da birincil maruz kalma normalde bu bileşiklerin uygulanması sırasında, dolaylı ya da ikincil maruz kalma çevre kaynaklı ya da gıdaların aracılığı ile olur. Şekil 2.26 pestisitlerin doğrudan olmayan yollarını özetler.



Şekil 2.25: Pestisitlerin direkt olmayan yolları.

İnsan sağlığı açısından toksikolojik çalışmalar aşağıdaki testleri kapsamalıdır.

A: Akut toksiklik: bir organizmada tek ve kısa süreli maruz kalmanın zararlı etkilerini kapsar ve aşağıdaki çalışmaları kapsar.

1-) Dermal toksiklik testi; yüzey toksikliği için tavşanlar en çok kullanılan türdür. Domuz, fareler ya da sıçanlar da kullanılır. Sonuçlar LD₅₀ olarak ifade edilir. Bu değer test koşulları altında deney hayvanlarının 50% sinin öldüğü doza karşılık gelir.

2-) Mukus membran ve göz toksikliği testi; deney hayvanlarının tavşan ve maymunun göz konjiktivi ve vaginal organı kimyasal maddenin mukus membranındaki toksik veya tahriş edici etkileri için kullanılır.

3-) Soluma toksikliği testi; Gazların, tozların, sislerin ya da buharların soluma yoluyla potansiyel zararlarının değerlendirilmesi işlemi pestisit fiziksel doğasına (çözünürlük, partikül boyutu) oldukça bağlıdır.

4-) Oral toksiklik testi; işlem normalde diette ya da sonda ile mide içine uygulanmasıyla yapılır. Bunun avantajı vücut ağırlığına göre günlük dozun kesin ölçümüne izin verir. Oral toksiklik genellikle 3 adımda gerçekleşir; Akut (kısa süreli) subakut (subkronik) ve kronik (uzun süreli).

B:Tekrar eden doz testi; deney hayvanlarında tekrar eden günlük dozlama ile veya bir pestisite yaşam süresinin kısa bir süresinde maruz kalmasıyla oluşan yan etkileri kapsar.

C: Çoğalma ve teratoloji; endokrinolojik dişilerde üreme çevrimiyle alakalı ve embriyolojik ve fetal büyüme oluşturan anabolik sistemlerin dahil olduğu çalışmadır.

D: Kanserojenlik; laboratuvar hayvanlarında pestisit kanserojenlik potansiyelinin belirlenmesidir. Çalışma oluşturulan tümörün türünü ve organ seçiciliğini ve doz – cevap ilişkisini ortaya koyacak kadar yeterli olmalıdır. Genetoksik olmayan kanserojenler için yan etkisi olmayan doz tespit edilir.

Yan etki gözlemlenmeyen seviyenin (NOAEL) ya da mümkün olduğunda yan etkinin gözlemlendiği en düşük dozun (LOAEL) in belirlenmesi pestisitlerin toksikolojik risk değerlendirmesinin kritik adımıdır[1,14-18].

2.5 Pestisit Kalıntı Analizi İçin Kalite Kontrol

2.5.1 Akreditasyon

Akreditasyon Sisteminin en önemli gereksinimlerinden bir tanesi de işin prensiplerini ve nasıl yapılacağını anlatan standart işlem prosedürü (Standart operation procedure SOP) lerin kullanımınıdır. Akreditasyonun ilk yıllarında kalıntı analizlerinde katı kurallar/yaklaşımlar vardı. Bu yaklaşımda yaşanan problem kapsamın her genişletilmek istenmesinde yani, yeni bir konsantrasyon, yeni bir matris, yeni bir analit baştan validasyon gerektirmekteydi. Bu sebeple Jenerik akreditasyon tanımı ortaya atılarak kullanılmaya başlandı. Akredite edilmiş kullanılan teknikte yeni ilaveler performans kriterleri çalışılarak ilave edilir[19].

2.5.2 Numune alma, taşıma, işleme ve saklama

2.5.2.1 Örneklem

Pestisit kalıntıları genellikle örneklenen numunelerin genelinde değişken konsantrasyon göstermektedir. Genellikle sebze, meyve, tahıllar ve hayvansal ürünlerin örneklenmesi için verilen tavsiye rastgele seçilen noktalardan artımlı şekilde olmasıdır. Dünya da yaygın olarak kodeks tavsiyesi ise örneklenen numune yığınının iyice homojen edilmesinden sonra örnek alınması şeklindedir [20,21].

2.5.2.2 Numunenin laboratuara transferi

Numuneler temiz ve güvenli kaplarda taşınmalıdır. Polietilen çantalar özellikle hava sirkülasyonlu olanlar birçok numune için uygundur. Fakat düşük geçirgenliğe sahip çantalar (naylon-film) fumigantların analizi yapılacak numuneler için kullanılmamalıdır. Kolay bozunabilir numuneler dondurulup katı buz ile transfer edilmelidir. Soğutma ile zarar görebilecek numuneler (muz) düşük ve yüksek sıcaklıktan korunmalıdır. Numunenin laboratuvara transferi yaklaşık olarak satışa sunulma süresine yakın olmalıdır. Numunelerin kimliklendirilmesi açık ve anlaşılır bir şekilde olmalıdır. Organik çözügen içeren kalem kullanımından özellikle fumigant kalıntısı yapılacak numunelerde uzak durulmalıdır.

2.5.2.3 Numune hazırlanması ve analiz öncesi işlenmesi

Her laboratuvar numunesi standart bir kodlama sistemi ile kodlanmalıdır. Eğer maksimum kalıntı limitine (MRL) uygunluk kontrol edilecekse analiz edilecek kısım ve ürüne uygun şekilde numune hazırlanması yapılmalıdır. Bu tür tanımlar/tarifler ulusal düzenlemeler ya da kodeksten elde edilebilir. Fakat bu yapılacak işin amacına göre değişkenlik gösterebilir. Mesela kodeks tavsiyeleri MRL kontrolü yapılacağından (ürünün üretimindeki GAP uygulamalarının Kontrolü için) analiz edilecek kısım tüm ürünü (yenen ve yenmeyen kısımları) kapsarken, analiz müşteri maruz kalmaları için mesela toplam diet çalışması içinse sadece yenebilir kısımlar kullanılır.

Numunenin hazırlanması, işlenmesi, alt örnekleme yapılması numune görünür bir şekilde bozulmadan yapılmalıdır. Kutulanmış, kurutulmuş ya da benzer şekilde işlenmiş numuneler derin dondurucuda saklanmadıysa raf ömrü geçmeden analiz edilmelidir.

Numune işlenmesi ve saklanması prosedürünün numune üzerindeki kalıntılar üzerinde etki etmediğinin ispatlanması gerekmektedir.[21-25]

2.5.3 Pestisit Standartları, kalibrasyon çözeltileri ve benzeri şeyler

2.5.3.1 Standartları saflığı ve kimliği

Standartlar bilinen saflıkta alınmalıdır. Standartlar alınma tarihi ve son kullanma tarihini içerecek şekilde etiketlenmelidir. Son kullanma tarihinden sonra saflığının kabul edilebilir düzeyde olduğu gösterilirse yeni tayin edilecek son kullanma tarihine kadar kullanılabilir saflık kontrolü yeni ve eski standartların taze hazırlanmış çözeltilerinin detektör cevapları karşılaştırılarak yapılabilir. İdeal olarak saf standardın saflığı laboratuara yeni geldiğinde kontrol edilmelidir.

2.5.3.2 Referans standartların saklanması

Saf standartların saklanması sağlayıcı tavsiyesine göre yapılmalıdır. Genellikle düşük sıcaklıklarda (buzdolabı ya da derin dondurucu) ve karanlıkta saklanması uygundur. Kaplar nemin içeri girmesini engelliyecek şekilde kapalı olmalıdır.

2.5.3.3 Stok ve çalışma standartlarının hazırlanması ve kullanımı

Stok standartlar saf standarttan doğrudan hazırlanan standartlar, çalışma standartları kalibrasyon ve geri kazanım ölçülmesinde kullanılan ileri seyreltmelerle hazırlanan standartlardır. Stok standartlar genellikle tek analit için hazırlanırken çalışma standartları birden fazla analit içerebilir. Standardın kimliği, kütlesi (ya da yüksek uçuculuğa sahip bileşikler için hacmi), solventin kimliği, uygulanan hacim ve seyreltme işlemleri kayıt edilmelidir. Şişelerin üstüne tam bilgileri yazmak mümkün değildir. Bu bilgiler başka bir yerde tutulabilir.

Analit çözgenle reaksiyona girmemeli ve yeterli çözünürlüğe sahip olmalıdır. Polar analitler protik çözgenlerde (su ve metanol gibi) bozunabilirler, bu yüzden asetonitrilde çözülebilirler. Hidroliz ya da oksijenden korunmak için uygun pH ayarlaması yapılabilir ya da anti oksidan kullanılabilir. Pyrethroidler ve dicofol birçok çözgünde hatta sulu olmayan solventlerde bile hafif asidik ortamda tutulmalıdır.

Saf standartlar 5-10 mg dan daha az tartılmamalıdır. Gazlar (Fumigantlar) çözgenin içine baloncuklama ile verilip tartılabilirler ya da gaz tutucu şırınga ile seyreltilirler.

Analit çözeltileri son kullanma tarihlerine kadar kullanılmalıdır. Son kullanma tarihinde yeni hazırlanan standart çözelti ile kıyaslamak iyi olur. Eğer eskiden

hazırlanmış ile yeni hazırlanmış arasında %5 ten fazla fark yoksa son kullanma tarihi uzatılabilir. Fark %10 dan fazla ise son kullanma tarihi kısaltılmalıdır. Çözünmeyen dithiokarbomatların sulu süspansiyonları ve uçucu fumigantların gaz seyreltmeleri her kullanımda taze hazırlanmalıdır.

Çözeltiler soğukta, nem girmeyecek ve solventin uçmayacağı şekilde saklanmalıdır. En iyisi çözeltilere iç standart ilavesidir.

2.5.4 Ekstraksiyon ve konsantrasyon

2.5.4.1 Ekstraksiyon koşulları ve verimi

Ekstraksiyon verimini arttırmak için test kısmının tamamı ekstraksiyon süresince kullanılmalıdır. Sıcaklık ve pH gibi ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler varsa bunlar kontrol edilmelidir.

2.5.4.2 Ekstrat konsantrasyonu ve hacme tamamlama

Ekstrat kuruluğa kadar uçurulacağı zaman dikkatli olunmalıdır. Az miktardaki iyonik olmayan analitler bu esnada kaybedilebilir. Kaynama noktası yüksek bir solvent koruyucu olarak kullanılabilir. Yinede uçurma sıcaklığı mümkün olduğunca düşük olmalıdır. Azot ile ya da vakum santrifüjssel buharlaştırma tercih edilmelidir.

Ekstratkar hacmine tamamlanırken kalibreli kaplar kullanılmalı ve 1 ml den küçük hacimli kaplar tercih edilmemelidir.

2.5.4.3 Bulaşma, girişimler ve analitin doğal kaynakları

Bulaşma: Numuneler taşınırken, saklanırken ve laboratuarda birbirlerinden ayrı tutulmalıdır. Volumetrik malzemelerin temizliği titizlikle yapılmalıdır. Mümkün olduğunca standartlar ve ekstraktlar için ayrı malzemeler kullanılmalıdır. İç standartın ekstrakta ya da ekstaktın iç standarda bulaşması engellenmelidir. Özellikle dithiokarbamat ve difenilamine analizlerinde kauçuk malzemelerden kaçınılmalıdır [26].

Girişimler: Girişimler sadece numuneden gelmez. Cihazdan, kaplardan çözenlerden, kimyasallardan, süzme araçlarından kaynaklanabilir. Kauçuk ve plastik malzemeler (eldiven, yıkama şişeleri) de girişime sebep olabilir. Pestisit analizinde en önemli girişimler ftalatlar, silikon ve uzun zincirli hidrokarbonlardır. Bunlar binaların

yapımında ahşap malzemelerde hatta cihazın kendisinde bile vardır. Vial septumları kauçuk olduğu durumlarda PTFE-kaplı olmalıdır. Silikon kauçuk malzemeler daha az girişime sebep olur fakat onlarda düşük molekül ağırlıklı silikon girişimlere sebep olur. Reaktif Kör (Reagent blank) analizi girişimin nereden geldiğini bulmaya yardımcı olur. Pestisit kalıntısı analizinde yan ekstraktlardan kaynaklanan (co-ekstrakt) girişimlere sıkça rastlanır. Eğer girişim analitle örtüşen bir sinyal (response) veriyorsa farklı bir temizlik (clean up), kromatografi ya da dedektör kullanılabilir. Ayrıca çoklu kalıntı analizlerinde analitler arasında interferanslar oluşmaktadır.

Analitin doğal kaynağı: Analitin doğal olarak oluştuğu, üretildiği durumlarda örneğin her türlü matriste inorganik brom ve toprakta kükürt gibi. pestisit kullanımından dolayı kalıntılar doğal seviyelerden ayırt edilemez.

2.5.5 Kalibrasyon ve kromatografik integrasyon

2.5.5.1 Kütle spektrometrik dedektörün kütle kalibrasyonu

Doğru kütle spektrumu elde etmek ve miktar tayinini mümkün olduğunca güvenilir ve hassas yapmak için iyi bir kütle kalibrasyonu önemlidir.

2.5.5.2 Kalibrasyon için genel gereksinimler

Doğru miktarsal kalibrasyon analitin doğru tanımlanmasına bağlıdır. Ayrıca dedektör sisteminin kalibrasyon fonksiyonunu ve dinamik aralığının iyi bilinmesi gerekir.

Bütün dedektör sistemlerinin konsantrasyon ya da kütle cevapları (response) kısa zaman aralıklarında bile değişkenlik gösterir. Böyle durumlarda harici standart yöntemi yeterli olmaz, bunun yerine izotopik işaretlenmiş (isotope labelled) iç standart kullanılmalıdır. Standart ekleme yöntemi de diğer bir seçenektir.

İç standart üç şekilde kullanılır; birincisi tespit basamağından hemen önce ekstrakta ilave edilir. Bunun amacı ekstrakt hacminde oluşabilecek değişikliklerden etkilenmemek içindir. Analit/iç standart oranı rutin olarak kalibre edilir. İkincisinde analitle fiziksel ve kimyasal bütün özellikleri aynı olan iç standart kullanılır. Bu durumda analit/iç standart oranının uzun süre aynı kaldığı kabul edilir ve sık kalibre edilmesine gerek kalmaz. Standart ekleme ve izotopik işaretlenmiş standartlar bu kategoridedir. Üçüncü olarak iç standart analizin başında eklenir. Analitin miktarı cevap (response) oranlarından hesaplanır. Cevap oranlarının sabit kaldığı bu

yaklaşım içinde gereklidir. Bu yöntem ayrıca hem kalibrasyon sağlar hem de geri kazanım düzeltmesi.

Bracketing Kalibrasyon (numunenin okunmasından önce ve sonra kalibrasyon eğrisi oluşturulması) dedektörde zamana veya kullanıma bağlı değişiklik gözleniyorsa kullanılmalıdır. Bu yöntem HPLC-UV için gerekmezken LC-MS için uygun olur.

Dedektörün sinyali sapma gösterme eğiliminde ise tek noktadan kalibrasyon eğrisi daha iyi sonuç verebilir. Çok noktalı kalibrasyon çizildiğinde kalibrasyon eğrisi sıfırdan geçmeye zorlanmamalıdır. Analiz serisindeki numune sayısı dedektör sinyalinin değişkenlik göstermeyeceği büyüklükte olmalıdır.

Matris etkisi ve matris eşleşmeli (Matched) kalibrasyon: Numunenin içinde bulunan kimyasallar (doğal kaynaklı) analitin ölçülmesi sırasında olumsuz etki yapabilir. Headspace tekniği numune matrisinin doğasından ve analitin sıvı/katı faz ilgisinden dolayı etkilenir buda kullanılan dedektör sisteminin fonksiyonu olmadığı için analizi olumsuz etkiler. Matris etkisinden kaynaklanan olumsuzlukları engellemenin bir yolu matris-eşleşmeli (matris-matched) kalibrasyondur. Tespit sistemi uygun kör (blank) ekstrakta eklenen analit miktarı ile kalibre edilir. Fakat bu beraberinde ilave zaman ve maliyeti de getirir. Eğer matris etkisi az ya da tahmin edilebilir ise tek bir matriste ya da solventte kalibrasyon yapmak kabul edilebilir. Matris eşleşmeli kalibrasyonu da bazen hatalara neden olur. Matris etkisini engellemenin en iyi yolu standart ekleme ya da izotopik olarak işaretlenmiş iç standart kullanmaktır [27-28].

Pestisit karışımlarının kalibrasyona etkisi: Çoklu kalıntı analizlerinde kullanılan pestisitlerinin dedektör cevaplarının (response) birbirine yakın olması gerekir. Eğer cevaplar birbirinden çok farklı ise ayrı bir kalibrasyon eğrisi ile analiz edilmelidir.

İzomer karışımı ya da farklı bileşen içeren pestisitler için kalibrasyon: Pestisit izomer karışımı olduğunda dedektör cevabının her bileşen için benzer olduğu varsayılır.

Türev ya da bozunma ürünlerini kullanarak kalibrasyon: Analit bozunma ürünü ya da türevi olarak tespit ediliyorsa kalibrasyon mümkün olduğu durumlarda bozunma ürünü ya da türevinin saf standardı kullanılarak yapılmalıdır.

Kromatografik veri toplama oranı, gürültü ve integrasyon: Data toplama oranı ölçümün belirsizliğini etkileyebilir. Eğer veri toplama hızı çok yavaş olursa pikin zirvesi kaçırılabilir, pikin şekli düzgün olmayabilir ve pik alanı veya yüksekliği yanlış bulunabilir. Eğer veri toplama çok hızlı olursa sinyal/gürültü oranı çok düşük olabilir.

İzomer karışımları toplam pik alanı ya da yüksekliği olarak değerlendirileceği gibi ayrı ayrı da değerlendirilebilir bu daha kesin sonuç verir.

2.6 Analitik Metotlar ve Analitik Performans

2.6.1 Analitik metotların kabul edilebilirliği

Analitik metotların kabul edilebilir olması için kullanılan en yaygın kriter uygun konsantrasyonlarda her bileşen için 70-110% arasında geri kazanıma sahip olmasıdır. Geri kazanım analiz edilecek test örneğine ekstraksiyondan önce ilave edilen analitin son tespit aşamasında kalan miktar oranı olarak tarif edilir.

Bazı tekniklerde (spme, Headspace, flow injection analiz) geri kazanım yapmak anlamsızdır. Çünkü yapılan işlem kalibrasyon işleminden farksızdır. İç standart kullanıldığında geri kazanımı rutin olarak ölçmek gerekmez.

2.6.1.1 Performansın kabul edilebilirliğinin tespiti için geri kazanım

İdeal olanı her set analizde geri kazanım çalışmaktadır. Ancak bu işlem hem zaman hem de maliyet açısından uygun değildir. Buna alternatif olarak özellikle numuneler belli bir limitin altında ya da üstünde pestisit içerip içermediğine bakıldığı durumlarda geri kazanım ve kalibrasyon kalitatif tespitle birleştirilebilir. Kör numune limit düzeyinde standart eklenir, bu hem kalibrasyon eğrisi için hem de geri kazanım için kullanılır. Numunedeki kalıntılarda limitin altında ya da üstünde diye değerlendirilir. Bu alternatif teknik bu şekilde çalışıldığında tespit edilen pestisit için harici kalibrasyon eğrisi hazırlanarak kantitatif analize dönüştürülür. Gerçek anlamda kör bulunamadığı durumlarda veya kör numunede kabul edilebilecek kadar düşük düzeyde interferans varsa geri kazanım için eklenen standart ≥ 5 yani kör numunede bulunan miktardan beş kat fazla olmalıdır.

2.6.1.2 Yeterlilik testi ve referans malzeme analizi

Geri kazanımı çalışmak sadece kısmi bir bilgi sağlar. Biasın belirlenmesinde laboratuvar yeterlilik testlerine katılmalıdır. Analitik performansın izlenmesi için laboratuvarın kendisine ait referans malzemeler düzenli olarak analiz edilmelidir.

2.6.1.3 Sonuçların doğrulanması

Sonuçların doğrulanmasında iki beklenti vardır. Tanımlamanın doğrulanması ve miktarın doğrulanması. Tanımlamanın doğrulanması birçok farklı teknikle yapılabilir. Miktarın doğrulanması ise analizin tekrar edilmesiyle yapılır.

Negatif (pestisit bulunmadığı) sonuçlar geri kazanım ve en düşük konsantrasyon limiti (LCL) düzgün sonuç verdiyse doğrulanmış sayılır. Pozitif sonuçlarda ilave doğrulama gerekir [29].

MS ile Doğrulama: Kalıntı analizlerinde GC-MS, LC-MS teknikleri en kullanışlı ve güçlü doğrulama tekniğidir. İyon oranlarını bozmamak için iyon kaynağına giren analit miktarı fazla olmamalıdır.

Spektranın veri toplaması ile uygulanan elektron impakt EI, ya da tandem kütle hem tanımlama hem de miktar tayini için yeterli veri sağlar. Kimyasal iyonizasyon (CI) ya da atmosferik basınç iyonizasyon (API) ile yapılan tek basamak kütle analizlerinde elde edilen spektralar tanımlama için yetersiz kalır. Bu durumda eğer analitin karakteristik izotop piki yoksa i-) farklı kromatografik yöntemle, ii-) farklı iyonizasyon tekniği ile iii-) MS/MS, iv-) orta/yüksek çözünürlükte MS, v-) LC-MS te cone voltaj ile oynayıp parçalanmayı değiştirme teknikleri ile yapılabilir.

2.6.1.4 Sonuçların yazılması

Sonuçlar MRL de belirtildiği gibi raporlanmalıdır. (mg/kg). LCL nin altındaki sonuçlar < LCL mg/kg olarak raporlanmalıdır.

2.6.1.5 Sonuçların hesaplanması

Genel olarak pestisit kalıntısı verileri geri kazanımla düzeltilmez. Birden fazla paralel çalışıldığında en kesin sonuçların ortalaması alınır. Numune iyi homojen edildiğinde sonuçlar arasındaki RSD %30 u aşmamalıdır. Bu değer LOD civarında biraz yüksek olabilir [30].

2.7 Numune İşleme Ve Temizlik (clean up) Prosedürü: Yeni Gelişmeler

Pestisit kalıntısı analizlerinde analit konsantrasyonu genellikle çok düşüktür ve numuneler ön numune hazırlama işlemi olmadan analiz edilemeyecek kadar karmaşıktır. Ölçümler düşük miktarlarda yapıldığı için matriks etkileşimler problem oluşturur. Dolayısı ile numune hazırlamanın en temel amacı ilgilenilen tüm analitler açısından zenginleştirilmiş ve ekstrakta olması muhtemel girişim yapan matris bileşenlerinden mümkün olduğunca temizlenmiş numune kısmı oluşturmaktır. Bu aşamada gerçekleşecek analit kaybının telafisi ileriki adımlarda mümkün değildir. Dolayısıyla numune hazırlama bütün analitik prosesin önemli bir parçasıdır.

Numune hazırlama numunenin işlenmesiyle başlar ve enstrümantal analiz için kullanılacak son ekstraktın oluşturulması ile biter. Ekstraksiyon basamağında analit numuneden ekstraksiyon edileceği ortama geçer. Bu işlemi potansiyel girişim yapan ekstraktların uzaklaştırılması (saflaştırma ya da clean up) takip eder. Geleneksel metodoloji, numune işleme, süzme, hacim transferi, kolon kromatografisi, uçurma ve tekrar çözme gibi birçok adımdan oluşur. Bu adımlar metodun karmaşıklığını arttırmanın yanı sıra metodu zaman alıcı, sistematik ve rastgele hatalara eğilimli yapar. Dolayısıyla uzun süre numune hazırlama kalıntı analizinin dar boğazı olarak düşünüldü.

1990 ların başından itibaren laboratuvar harcamalarının hızlı artışı, kalıntı kontrol analizlerinin artışı ve kimyasal atıkların azaltılması yönündeki eğilim sayesinde numune hazırlama istenmeyen zorunluluktan laboratuvar verimliliğini geliştirmek için ilgi çekici bir araştırma alanına dönüştü. Bundan itibaren basitleştirme, otomatikleştirme ve küçükleştirmenin yanı sıra kromatografik analize bağlamaya odaklanan birçok yeni numune hazırlama yöntemi geliştirildi [31].

2.7.1 Geleneksel MRM lerdeki son yenilikler

Organik solventle ekstraksiyonu takip eden sıvı sıvı dağılım (likit-likit partition) basamakları temizleme maksadıyla, uzun geleneksel olarak kalıntı analizlerinde yaygın olarak kullanılan standart bir yöntemdir. Bu yöntemin diğer yeni tekniklere göre önemli avantajı iyi bilinen ve tanımlanmış prensiplere dayanması, pahalı ve karmaşık cihazlar gerektirmemesi, ve kolay temin edilebilen yüksek saflıkta solvent kullanmalarıdır. Bugün sebze ve meyve analizinde kullanılan MRM lerin çoğunda

aseton asetonitril ya da etil asetat ile ilk ekstraksiyonu gerçekleştirdikten sonra LLP uygulanır. Burada ilgilenilen analitler organik faza transfer olurken istenmeyen hidrofilik yan ekstraktlar ve polaritesi yüksek pestisitler sulu fazda kalır. Hidrofobik olan etilasetat kullanıldığında organik fazın ayrılması kendi kendine olur. Asetonitril ve asetonda ise bunlar su ile karışabildiklerinden faz ayrımı için polar olmayan (non-polar) organik solvent ve/veya tuz ilavesi gerektirirler.

Solventin ve tuzun çeşidi ve miktarı bileşiklerin kısımlandırılmasını doğrudan etkilediği için sonuçta da metodun seçiciliğini etkiler. LLP yi takip eden saflaştırma genellikle size exclusion kromatografisi (SEC, GPC nin diğer adı) veya normal ya da ters faz adsorpsiyon kromatografisi gibi bir ya da iki temizlik (clean up) basamağını içerir. Geleneksel numune hazırlama yaklaşımları çoğunlukla oldukça zahmetlidir. Bu yöntemlerin en önemli dezavantajları

i:Çok fazla zahmetli ve hataya yol açabilecek numune hazırlama basamaklarından (öğütme, uçurma, kurutma, faz ayrımı) oluşması

ii:Çok miktardaki toksik ve yanabilir solvent kullanımı

iii:Çok sayıda cam malzeme kullanımı (yıkama gereksinimi ve kırılmadan kaynaklanan kayıplar)

iv:Çeker ocak, büyük miktarda depo ve tezgâh alanı gerektirmesi.

Bununla birlikte birçok geleneksel yöntem önemli analitleri kapsayacak kadar geniş kapsamlı değildir. Bu metodların verimsizliği ve karmaşıklığı daha önceden bahsedilen gereksiz sorunlara yol açan makro tasarımlarıdır.

Çoklu analiz yöntemleri (MRM) her zaman analitik performansı ve temizlik verimliliğini arttırmayı, numune hazırlamayı basitleştirmeyi, otomasyona uyumluluğu arttırmaya ve solvent kullanımı ve el ile yapılan işleri azaltmayı hedefleyen iyileştirmelere konu olmuştur.

Modern analitik cihazların genişletilmiş olanaklarını kullanan son MRM ise ekstraktların GC ve HPLC cihazlarına birlikte uyumlu olan QUEKERS metodudur. Bu metodun geliştirilmesi sırasında zaman alıcı ve pratik olmayan adımların mümkün olduğunca kaldırılmasına ya da basitleştirilmesine önem verildi. Metod önemli miktarda polar matris bileşenini uzaklaştıran $MgSO_4$ ve $NaCl$ ilavesinden sonra asetonitril ile ilk ekstraksiyonunu LLP, takiben ekstraktın SPE sorbent ile

karıştırılarak yapılan (dispersif SPE) basit bir temizlik basamağını içerir.

Bu metodun avantajları

A: Çabukluğu (daha önceden homojen edilmiş 8 numune 30 dakikada ekstrakte edilebilir).

B: Basitliği

C: Güvenilirliği ve Robustluğu (birkaç basit adım)

D: Düşük maliyet

E Düşük solvent tüketimi (10 ml asetonitril)

F: Cam malzeme gerektirmemesi

G: Asetonitril ekstraktının hem GC ye hem de LC ye uygun olması

H: oldukça geniş bir pestisit aralığını kapsaması (bazik, asidik ve oldukça polar pestisitler)

Laboratuvar içi validasyon çalışmalarında çok iyi geri kazanım değerleri ve çok düşük sapmalar elde edildi [32-47].

2.8 Katı Destek Malzemesi Yardımıyla Ekstraksiyon ve Kısımlandırma

Ayırma hunisi kullanılan geleneksel LLP prosedürlerinin sakıncalarından dolayı, numuneyi (ya da numune ekstraktını) ayırmak için ekstraksiyonu ve/veya LLP yi kolaylaştırmak amacıyla adsorban kullanan yöntemler geliştirildi. Bu prosedürler fosilli toprak gibi büyük gözenekli normal faz adsorbanlar ya da silika içerebilirler. Tipik uygulamada numune sorbentle karıştırılarak akıcı bulamaç haline getirilir ve uygun solventle elue edilmek üzere kolona doldurulur. Alternatif olarak sıvı örnekler ya da ekstraktlar solventle doldurulmuş kolona dökülebilirler.

2.8.1 Makroporöz destek malzemesi yardımıyla ekstraksiyon ve kısımlandırma

Biyolojik numunelerin ekstraksiyonunda fosilli toprak, selit, florosil, silika jel ve deniz kumu kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir. Bu genellikle sorbent numune karışımının kolona doldurulup organik çözücü ile yürütülmesi ile yapılır. Pestisit analizlerinde bu yöntem süt ve süt ürünleri gibi hayvansal kaynaklı gıdaların

analizlerinde kullanılmakla beraber sebze ve meyveler içinde zamanla yaygınlaşmıştır.

2.8.2 Ekstraktın destek malzemesine dağılımı

Yukarıda bahsedilen makroporöz normal faz destek malzemeleri sadece homojenize edilmiş numunelerin doğrudan dispersiyonunda değil, geleneksel yöntemlerle üretilen ham numune ekstraktın dispersiyonu içinde kullanılmıştır. Böylece ayırma hunisinde yapılan zahmetli ve zaman alıcı temizlik aşamasından uzak durulmuş olunur. Bu yöntemde ham numune ekstraktı makroporöz destek malzemesi içeren kolona dökülür, solvent azot akışı ile tasfiye edilir, daha sonra kolan bol miktarda tercihen su ve yağ fazı ile karışmayan solvent ile yıkanır [48].

2.8.3 Matris katı faz dispersiyon (MSPD)

MSPD uygulaması az miktarda (0,5 gr) numunenin yarı kuru akıcı toz haline getirilmek üzere ters faz silika temelli sorbentle karıştırılıp daha sonra kolona doldurulup küçük miktarda solventle elue edilmesini kapsar.

MSPD oldukça doğru ve basit bir ekstraksiyon tekniğidir. Karmaşık ya da pahalı düzenekler gerektirmez, fazla solvent tüketimi yoktur ve geleneksel yöntemlere göre ekonomik ve hızlıdır. Fakat çok düşük miktarda numune (0,1-2 gr) ile çalışıldığı için numune iyi homojen edilmelidir [49].

2.9 Adsorptif Ekstraksiyon Teknikleri

Adsorptif ekstraksiyon teknikleri analitin sıvı ya da gaz bir faz ile adsorbent yüzeyi arasında dağılmasına dayanır. Adsorbentler genellikle analit ile etkileşebilecek grupları olan, yüzey alanı büyük (1200 m²/g a kadar) poröz (gözenekli) malzemelerdir. Yüzeye analit adsorpsiyonu genellikle ters işlemle takip edilir (küçük miktarda uygun solvent kullanarak desorpsiyon). Sorbent, tutma ve serbest bırakma koşullarını seçerek işlemin geri kazanımını ve seçiciliği değiştirilebilir.

Farklı yüzey kimyası ve ısı kararlılığı gösteren birçok adsorbent çeşidi vardır.

i-) Karbon temelli inorganik adsorbentler; aktif karbon, (grafite edilmiş) karbon siyah, organik (özellikle aromatik) bileşiklere karşı yüksek ilgi gösterir. Değişikliğe uğramadan 450 °C ye kadar ısıtılabilir.

ii-) Metal-oksit bazlı adsorbanlar; silika ve alimuna; polar bileşiklere yüksek ilgi gösterirler 400 – 600 °C ye kadar kararlıdır.

iii-) Modifiye (bağlanmış) silikalar; bunlar farklı lipofilik ya da hidrofilik fonksiyonlar içeren organik parçalarla kaplanırlar ve termal olarak kararsızdırlar.

iv-) Polimerik adsorbanlar; bunlar farklı sentetik ya da doğal (co)-polimerlerdir. Orta polar poliamide (PA-6), polistirene-divinilbenzene (PS-DVB) modifiye edilmediği takdirde oldukça lipofildir. Birkaç istisna haricinde (örneğin Tenax) polimerik adsorbanlar termal olarak kararsızdır.

Pestisit analizlerinin başlamasından itibaren adsorptif kısımlandırma teknikleri; matris bileşenlerinin seçici olarak uzaklaştırılması (clean-up) analitin zenginleştirilmesi, solvent değişimi (sudan-organiğe) ve numune ekstraktının saklanması ve taşınması amaçları ile numune hazırlamada oldukça sıklıkla kullanılmaktadırlar.

2.9.1 Katı faz ekstraksiyon (SPE)

SPE katı bir adsorbent ve sıvı bir fazı kapsayan fiziksel ekstraksiyon işlemidir. Teknik bazen sıvı katı ekstraksiyon ya da sorbent-ekstraksiyonu olarakta adlandırılır. Analiti sıvı ekstraktan seçici olarak ekstrakte etmek, konsantre etmek, ve saflaştırmak için kullanılır. SPE adsorbentleri için analit ve matris bileşenleri ile kuvvetli, zayıf veya seçici olarak etkileşen yüzeylerinde çok çeşitli aktif kısımlar olan birçok seçenek vardır. Seçicilik ya da ayırım analit ve matris bileşenlerinin hareketli ve sabit faza farklı ilgilerinden ileri gelir. İstenen ayırma ulaşmak için, bu etkileşimlerin uygun şekilde nasıl kontrol edileceğinin bilinmesi gerekir [50].

2.9.1.1 Metot geliştirme

Metot geliştirme öncelikli olarak, analitin ve numunenin kimyasal yapısını dikkate alarak en uygun alıkonma (retention) mekanizmasının tespit edilmesini kapsar. Sorbentin yüzey kimyası ve bunu çevreleyen sıvı fazın kompozisyonu aynı derecede önemlidir. Matrisin yapısındaki, mobil fazdaki ve adsorbentdeki küçük değişiklikler analitin kromatografik davranışında çok ciddi farklılıklara neden olur.

2.9.1.2 Etkileşim mekanizmaları

Sorbent analit etkileşimleri üç ana sınıfta ele alınır. Hidrofobik (non-polar), polar ve iyonik. Prensip olarak tüm bu etkileşim türleri çeşitli elektrostatik güçleri kapsar ve tam olarak açıklanamaz.

Hidrofobik ya da dispersif etkileşimler olarak adlandırılan etkileşim, moleküller arasında geçici olarak oluşan indüklenmiş dipole (Van-der Waals kuvvetleri) elektrostatik kuvvetlere dayanır. Ancak bu etkileşimler hidrofobik moleküllerin sorbentin non-polar kısımlarıyla olan kuvvetli etkileşimini açıklayamayacak kadar zayıftır. Bu etkileşim daha ziyade, non-polar analiti sulu fazdan ayırmaya zorlayan ve kendini sorbentin non-polar kısmına konumlandıran analit ile su molekülleri arasındaki kuvvetli etkileşimlerdir.

II - II etkileşimi olarak adlandırılan etkileşim orta kuvvette etkileşimlerdir ve bazıları tarafından hidrofobik bazıları tarafından da polar etkileşim olarak değerlendirilir. Moleküldeki doymamış (çift bağ, aromatik halka) yapılarındaki elektron bulutları arasındaki dispersif kuvvetlere dayanır.

Polar etkileşimler kalıcı dipole sahip moleküller arasında oluşur. Proton verici ve proton alıcı (örnek alkol, amin) moleküller yapıda bulunduğu zaman bu etkileşimler hidrojen köprüleri vasıtasıyla oluşur. Bu etkileşimlerde orta kuvvette etkileşim olarak kabul edilir ve İyonik etkileşimlerden 10 kat daha zayıftır.

Kapsanan etkileşimin mekanizmasına bağlı olarak çeşitli ayırma prensiplerinden bahsedilebilir. Örneğin normal faz SPE; adsorbanın mobil fazdan daha polar (hidrofilik) olduğu ve analitin öncelikli olarak analit ve sorbent arasındaki polar etkileşimleri kapsar. Ters faz (reversed Phase)-SPE de adsorban mobil fazdan daha lipofiliktir ve analitler öncelikli olarak hidrofobik mekanizmaya göre alıkonurlar. İyonik etkileşimde analitler İyonik etkileşimlere göre alıkonurlar.

İmmunosorbent (IS) ve MIP lerde ise sorbentte bulunan farklı fonksiyonel gruplar benzer yapıdaki molekülleri seçici olarak tutabilmesini sağlayacak sterik düzenlemede yapılırlar.

2.9.1.3 SPE işlemi

SPE adsorbanları toz olarak ya da kolon halinde kullanılabilir. Toz olarak kullanıldığında (dispersive SPE) analiti içeren çözeltinin içine dökülür ve çalkalanır

daha sonrada santrifüj ya da süzme ile ayrılır [51]. Dolayısıyla dağılma dengesini tahmin etmek kolon işleminden daha kolay ve basit olur. Fakat kolon modu farklı yürütme stratejilerinin uygulanabilmesi ile çok yönlü olması ve otomatikleştirilebildiği için daha çok kullanılmaktadır.

Analizcinin amacı ilgilendiği analiti konsantre olarak karmaşık numune matrisinden ayırmaktır. Bunu yapabilmek için iki yol vardır birincisi sorbent numune matrisine ilgi gösterir ve onu tutar böylece analit ilk önce elue olur ve ayrılır, ikincide adsorban hedef analiti tutar böylece safsızlıklar yıkanır. Bunlardan hangisinin seçileceği analitin moleküler yapısına, numunenin yapısına ve tespit etme basamağına bağlıdır. İlk yaklaşım (matrisin sorbentle tutulduğu) gıdalarda çoklu kalıntı analizlerinde ekstraktan istenmeyen matris bileşenlerinin uzaklaştırılmasında kullanılır (örneğin; normal faz sorbentin polar yapıları fraksiyonlu elüasyon ile uzaklaştırıldığı geleneksel kolon kromatografisi). Bu yaklaşım en basit hali ile safsızlıkları tutan kimyasal filtre gibi davranır. İkinci yaklaşım ise sulu örneklerde ters faz sabit faz üzerinde pestisitlerin zenginleştirilmesinde kullanılır. Ayrıca bu yaklaşım sebze ve meyve numunelerine ait ham MRM ekstraktlarında pestisitlerin zenginleştirilmesi için kullanılır. Spe kolon prosedürü aşağıdaki adımlardan oluşur.

1-) Şartlandırma ve denge: bu adım genellikle metanol gibi orta polar bir solventin kartuştan geçirilmesinden sonra sorbentin dengeye gelmesi için numunenin çözücüsüne benzer bir sıvı fazın kartuştan geçirilmesine dayanır(sulu numunelerde su, normal faz uygulamalarda non-polar solvent). Düşük geri kazanıma ve kötü tekrarlanabilirliğe yol açan hata kaynağı adsorbanın vakum altında kalarak korunması sonucunda şartlanmanın bozulmasıdır (de-conditioning).

2-) Numune yükleme (alikonma): daha önceden uygun şekilde hazırlanan numune şartlandırılmış kartuşun üzerine uygulanır (dökülür). Analit ve bazı matris bileşenleri alıkonur.

3-) İnterferansların elue edilmesi: kartuştan uygun solventler geçirilerek interfereans yapan bileşikler yıkanır. Bu sırada analit solvent geçişinden etkilenmez.

4-Kurutma: ters faz uygulamalarda son yürütücü olarak su ile karışmayan bir solvent ise analitin daha iyi erişimi için kurutma gerekebilir.

5-) Analitin elue edilmesi: seçilen solvent, analit-sorbent etkileşimini bozarak analitin seçici olarak elue olmasını sağlamalı ve bir sonraki numune hazırlama ya da

tespit etme adımına uygun olmalıdır. Ayrıca fraksiyonlu toplamada yapılabilir ve normal faz uygulamalarda oldukça kullanılır. Geri dönüşümsüz adsorpsiyondan, sorbentin deaktive olmasından ya da yan-ekstraktlardan dolayı pestisit kayıplarının olabileceğine dikkat etmek gerekir.

2.9.1.4 Sorbentler

Ters Faz Silikalar: Uzun yıllar n-Alkil silikalar evrensel spe sorbentleri oldular unlar açısından oktadesil silan (C18) ile modifiye edilmiş olanlar yüksek kapasitelerinden dolayı yaygınlaşmışlardır. Bununla birlikte sulu numunelerde polar analitlerin ($pK_{aw} < 1,5$) alıkonmalarını arttırmaya yönelik bütün çabalara rağmen alkil silikalar henüz yeteri kadar kuvvetli değil ve polar pestisitler içeren sulu numunelerde nadiren kullanılmaktadırlar. Bağlanmış (bonded) silikaların diğer bir kullanım sınırlamasıda belirli pH aralığında kararlı olmalarıdır. pH 2 nin altında siliil bağı hidroliz olabilir ve pH 8 in üzerinde de silika taban çözülmeye uğrayabilir. Fakat bunlar spe de elue etme süresi kısa ve tek kullanımlık oldukları için pek problem olmaz.

Polimerik Sorbentler: Spe benzeri prosedürlerde polimerik reçinelerin kullanımı yeni değildir. Polistiren-divinilbenzene (ps-dvb) tabanlı gibi yüksek hidrofobik reçineler su örneklerinde bulaşanları (kontaminantları) gidermek için 1960 lardan beri kullanılmaktadır. Bu polimerik sorbentlerin alıkonma kuvvetleri hidrofobik mekanizmalar ve π - π etkileşimlerinin birleşiminin sunucudur. Bu ilk nesil ps-dvb reçinelerin polar analitleri alıkoyma kapasiteleri C18 siliklara göre daha iyidir. Fakat düşük yüzey alanları sebebiyle çoklu kalıntı analizlerinin gereksinimlerini karşılayabilecek kadar yeterli değildir. Bunun sonucunda yüksek gözenekliliğe ve büyük spesifik yüzey alanı olan yüksek çapraz bağlı ps-dvb reçineler geliştirilerek yüksek kapasitede sorpsiyon ve önemli miktarda etkileşim alanı sağlandı ve bu birçok çalışmayla da doğrulandı. Hatta bir çalışma yüksek çapraz bağlı polimer reçinelerin su örneklerinden iyonik türdeki moleküllerin lipofilik kısımlarının kuvvetli etkileşimi ile tutulabildiğini göstermiştir.

Birçok yazar polimerik reçinelerin alkil silikalara göre daha fazla polar bileşen içeren ekstrakt verdiğini rapor etmiştir. Bu durumun üstesinden numuneye az miktarda organik solvent ekstraksiyondan ve/veya takip eden yıkama adımından önce ilave edilmesiyle giderilebilir. Bu sadece analitin interfereanslardan daha iyi tutunduğu

(daha az polar) zamanlarda geçerlidir. Bu yaklaşım pyrethroid ve organo klorür pestisitlerin (bunlar kaplara ve tüplere çökme eğiliminde olduklarından sorun çıkarabilirler) analizinde de işe yarar [52-55].

Yüksek derecede çapraz bağlı ps-dvb lere paralel bir gelişmede fonksiyonellendirilmiş polimer reçinelerdir. Ps-dvb polimerlere acetyl, hidroksimetil, sulfonil, o-karboksibenzoil ve benzoil'i de içeren birçok fonksiyonel grup ilave edildi. Bu fonksiyonel gruplar sulu numunelerle teması geliştirdi ve birçok çalışma polar analitlerin geri kazanımlarının modifiye edilmemiş türlerine göre daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu polimerlere alternatif türde N-vinilpirolidone (NVP) gibi polar bir monomer ile ko-polimerleşme ile üretilirler. Bu tip bir ko-polimer Oasis HLB (waters) patenti alınmıştır. Bu polimerin çok iyi su ıslanabilirliği vardır ve bipolar solventle ön şartlandırmaya gerek duymaz. Diğer sorbent üreticileri de yüksek spesifik yüzey alanı olan polar gruplu polimerler sunmaktadır, absolut Nexus (varian) strata x (fenomenex) H₂O-philic DVB (JT Baker) ve ENV+(IST) bunların çoğunun kimyasal yapısı açıklanmamaktadır[55-56].

Karbon tabanlı adsorbanlar: Bu sorbentler benzersiz alıkoyma özelliklerinden dolayı çok önemli bir yer işgal ederler. Geçmişte karbon kimyacılar arasında çok çeşitli tiplerde olmasından kaynaklanan tekrarlanabilirliği düşük sonuçlar vermesinden dolayı kötü olarak anılmaktaydı. Fakat bu karbon-siyahının 2700-3000 °C de inert atmosferde ısıtılmasıyla elde edilen grafitleştirilmiş karbon siyahının geliştirilmesiyle değişmiştir.

Bunlar aslında poröz (gözenekli) olmayan yüzey alanı 100 m²/g olan hegzogonal halkalardan oluşan sorbentlerdir. Analitler π - π ve hidrofobik etkileşimle tutunurlar ve fonksiyonel yapılarından ziyade biçimlerine bağlıdır. Dekolize olmuş kimyasal bağlar içeren planar(düzlemsel) yapılar ve çoklu yüzey temas noktalarına sahip hidrokarbonlar için kuvvetli alıkonma gösterirler.

Karbonlar normal ya da ters olarak kullanılabilirler karbon-temelli sorbentlerin bir dezavantajı bazı analitlere çok kuvvetli hatta bazen geri dönüşsüz bağlanmasıdır. Tipik spe eluenti olan asetonitril ve metanol bazen zayıf kalırlar ve metilen klorür, tolüen ya da tetrahidrofuran etkileşimi kırmak için kullanılmak zorundadır. Diğer dezavantajı ise düşük mekanik kararlılığından dolayı hplc kolon malzemesi olarak kullanılamamasıdır[57].

İnorganik normal faz adsorbanlar: Normal faz sorbentler en yüksek alıkoyucu gücünü non-polar solventler gibi dielektrik sabiti düşük aprotik ortamlarda gösterirler ve esas olarak bu tür solventlerde çözünen numune ekstraktlarının temizlenmesinde kullanılırlar. Elue olma sıralaması polaritesi artan solvent karışımları ile fraksiyonlu olarak polariteye göre gerçekleşir. Geleneksel MRM lerde NP malzemeler genellikle tek kullanımlıdır, çünkü polar yan ekstraktlar yüzeylerine bağlanırlar ve bunları uzaklaştırmak zordur.

Fraksiyonlu eluasyon oldukça non-polar pestisitleri (organo klorlu) elue eden oldukça non polar olan solventle başlar, böylece onları daha fazla polar olan trigliserit fraksiyonun dan ayırır. Daha sonra eluasyon polaritesi artan solvent karışımları ile devam eder ve böylece daha polar pestisitlerin yürümesi sağlanır. Çoklu kalıntı yaklaşımında pestisitler genellikle çok geniş bir polarite aralığına sahiptir. Dolayısıyla pestisitleri gruplara ayırarak elde etmek imkânsızdır. Temelde, bu yaklaşım sadece pestisitleri ve matris bileşenlerini polaritelerine dayanarak farklı fraksiyonlara ayırır. Dolayısıyla NP temizliği, yağ ve pigmentleri büyüklüklerine göre ayıran moleküler size exclusion prensibine dayanan GPC yi takiben kullanılır [58].

2.9.1.5 Uygulamalar

Tarif edilen numune hazırlama teknikleri içerisinde spe pestisit kalıntısı analizlerinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Burada spe matris bileşenlerini seçici olarak uzaklaştırıp analitin geçmesine izin veren kimyasal filtre gibi davranır.

2.9.2 İmmünosorbentlerle SPE

İmmüno sorbentler yüzeyleri moleküler tanımlamayı sağlamak için yüzeyleri antibodylerle kaplanmış spe ekstraksiyon malzemeleridir, dolayısıyla yüksek derecede seçiciliğe sahiptir. Bu özellikleri onları özellikle tekli kalıntı ya da yarı spesifik uygulamalarda zenginleştirme ve temizlik amacıyla kullanılmalarını uygun kılar. Klasik spe ile karşılaştırıldığında IS ler daha az yan ekstraktlar içeren ekstraktlar verir. Dolayısıyla kromatografide daha az interfereans anlamına gelir. Analitin karmaşık sulu çevre numunelerinden ekstraksiyonu ve konsantre edilmesi. Yüksek hacimli örneklerde tek bir basamakta yapmak mümkündür.

2.9.3 Moleküler hafızalandırılmış polimerlerle SPE (MISPE)

MIP ler analitin fonksiyonel gruplarının üç boyutlu şekli ve pozisyonunu tamamlayan moleküler tanımlama kümelerine sahip sentetik polimerlerdir. MIP ler polimerlerin daha sonradan uzaklaştırılarak geride oldukça seçici uygun bağlanma kümeleri bırakan kalıp molekülün (hedef analit) varlığında sentezlenir. Hafızalandırılmış polimerler analiti tanımlama ve seçici olarak tutma kabiliyetleri IS lerle aynıdır. Prensipde MIP ler herhangi bir hedef analit için hatta immüno affinity için çok küçük olan analitler için bile hazırlanabilir. Üstelik sert çalışma şartlarına, organik solventlere dayanıklı olmalarından dolayı spesifik adsorbanlar arasında oldukça çekicidirler.

Pestisit kalıntı analizlerinde normalde sadece tek bir analit incelenmez, hafıza ilgilenilen bileşiklerin ortak yapısına seçici olmalıdır. Çoklu analite uygun MIP üretmek için kalıp moleküllerin karışımı kullanılabilir.

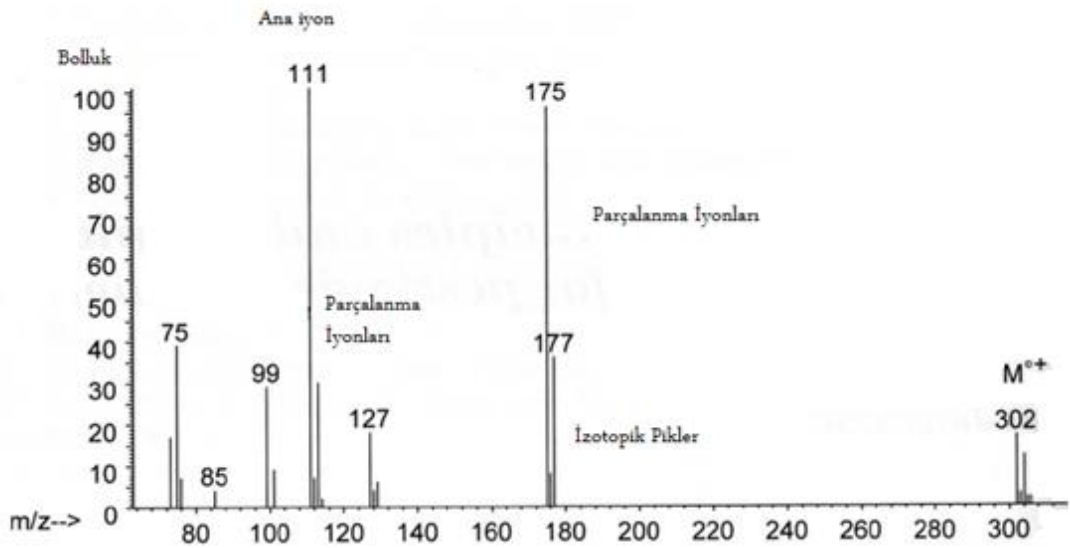
3. GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ

3.1 Giriş Ve Kapsam

Kütle spektrometrisi organik kimyasal analizin birçok alanında çok önemli bir konuma gelmiştir. Teknik biyolojik, çevre ve gıda örneklerinde eser analizler için uygulanan en önemli kromatografik ayırma teknikleri ile birleşebilmektedir. GC-MS ve LC-MS günümüzde pestisitlerin ve çevremizdeki diğer kirleticilerin hassas pozitif yapısal tanımlamaları için zorunludur. Bu teknikler Avrupa Birliği ya da diğer kanun koyucu otoriteler tarafından gıdalardaki pestisitler için belirtilen düşük maksimum tolerans değerlerini karşılayabilecek analitik metotların geliştirilebilmesi için oldukça değerlidir. Günümüzde, neredeyse kütle spektroskopik doğrulama içermiyorsa hiçbir analitik sonuç güvenilir olarak düşünülmemektedir.

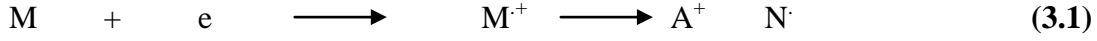
3.2 Kütle Spektrumu

Kütle spektrumu şiddetin kütle/yük oranının bir fonksiyonu olarak çizimidir. Spektrumdaki en şiddetli pik esas pik olarak adlandırılır. Genellikle spektrum esas pike göre normalize edilir ve sonuçta göreceli şiddetler elde edilir. Örnek spektrum Şekil 3.1 de verilmiştir

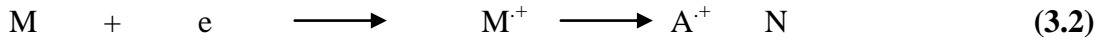


Şekil 3.1: Kütle spektrumu.

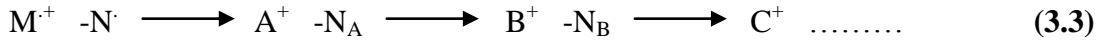
Bir molekül iyonlaştırıldığı zaman, bir moleküler iyon M^+ oluşturulur. Ve bu nötral parçacık fırlatarak/çıkartarak parçalanma iyonu A^+ ya da A^+ oluşturabilecek iç enerjiye sahiptir. Orijinal analit molekülü moleküler iyon olarak radikal katyon verir. Ve parçalanma iyonu katyon ya da radikal iyon olabilir. Çıkartılan nötral parçacık N, radikal ya da nötral molekül olabilir.



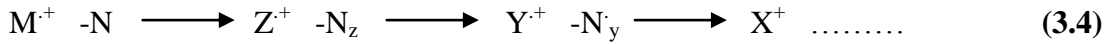
Ya da



Eğer parçalanma iyonu yeterli iç enerjiye sahipse parçalanma iyonlarından oluşan bütün bir seri oluşturarak ileri parçalanmalar gerçekleşebilir.



Veya



Kütle spektrometresinden elde edilen böyle bir parçalanma serisine parçalanma yolu denir. Görüldüğü üzere moleküler iyon M^+ birden fazla yolu izleyerek parçalanabilir. Farklı parçalanma yolları hep birlikte incelenen bileşiğin parçalanma deseni karakteristiğini oluşturur.

Parçalanma yolu boyunca hangi parçalanmanın gerçekleşeceği moleküler iyon M^+ verilen ilk enerjiye ve onun yapısına bağlıdır. Dolayısıyla kütle spektrumu sadece basit bir parçalanma şablonu olmayıp, iyonlaştırıcı, iyonlaşan elektronların ve iyonlaşmanın olduğu sıcaklığa da bağlıdır.

Elektron impact işleminde iyon oluşumunun iyonlaştırıcı elektronların enerjisinin fonksiyonu Şekil 3.2 de gösterilmektedir.

Elektronlar vakum altındaki iyon kaynağından ısıtılan filament ile sağlanır, bir potansiyel boyunca hızlandırılırlar ve analit molekülleri ile çarpıştığı odaya doğru yönlendirilirler. Potansiyel 0 ve 100 eV un üzerindeki bir aralıkta aralıksız olarak değişkendir. Moleküler iyonlar 10 eV civarında gözlemlenmeye başlanır (iyonizasyon enerjisi ya da görünme potansiyeli). 10-15 eV arasında parçalanma iyonları da oluşmaya başlar. Standart kütle spektrumu 70 eV ta elde edilir. Çünkü maksimum iyon verimi (toplam iyon akımı TIC) bu değerde elde edilir ve kütle

spektrumu bu değerde tekrar üretilebilir ve iyonlaşan molekülün karakteristiği cihazın türünden ve yapımından neredeyse bağımsızdır.

3.3 Yapısal Bilgi

Pestisit kalıntısı analizlerinde pestisitlerin yapısal tanımlanması genellikle standart molekülün referans spektrumu yardımıyla yapılmasına rağmen güvenilir sonuçlar üretmek için kütle spektrumu verilerinin yorumunun temel düzeyde bilinmesi kesinlikle gereklidir.

3.3.1 Moleküler iyon

Bir kütle spektrumunda genel yapısal bilginin birçok önemli türü mevcuttur. Bir kütle spektrumunun verebileceği en önemli bilgi muhtemelen moleküler kütedir. Molekül ağırlığı molekülde ve sonuçta moleküler iyonunda bulunan atomların en çok bulunan izotoplarının kütlelerinin tam sayısı olarak hesaplanmasıyla bulunur. Moleküler iyon ya da bazen ana iyon diye de adlandırılır ve genellikle spektrumdaki izotop kümesi içerisindeki en yüksek kütleyle karşılık gelen kütedir. Buna rağmen bazı durumlarda bu piki kesin olarak tanımlamak zordur. Böyle durumlarda molekül ağırlığının göstergesi olan iyonlar üretilebilmek için yumuşak iyonlaştırma teknikleri kullanılır. Pestisit kalıntı analizlerinde protonlanmış molekül $[M+H]^+$ üretimi için kimyasal iyonizasyon en çok kullanılan yumuşak iyonlaştırma tekniğidir. Bir elektron iyonizasyon (EI) kütle spektrumunda, parçalanma iyonları moleküler iyon ile tutarlı olmalıdır, $[M-1]^+$, $[M-15]^+$, $[M-18]^+$ ve $[M-20]^+$ moleküler iyonun tayinini doğrular. Çünkü bunlar sırasıyla $H^+ \cdot K_3$, H_2O ve HF yapılarının moleküler iyondan kayıplarını gösterir. Bu tür küçük nötral kayıplara ait pikler moleküler yapıyı tanımlayabilmek için büyük öneme sahiptir [62-63]. Diğer taraftan 3-14 ve 21-25 amu kayıpları ana iyondan parçalanma ile oluşan iyonlar değildir ve yanlış tanımlamayı ya da safsızlığı işaret ederler.

Moleküler iyonun yanı sıra parçalanma ve izotopik pikler gözlemlenen diğer iki çeşit piktir.

3.3.2 İzotopik pikler

İzotopik pikler her bir elementin doğal izotoplarının bulunmasından dolayı oluşan ve oldukça belirtici olabilen piklerdir. Örneğin doğal klorür %75 ^{35}Cl izotop ve %25

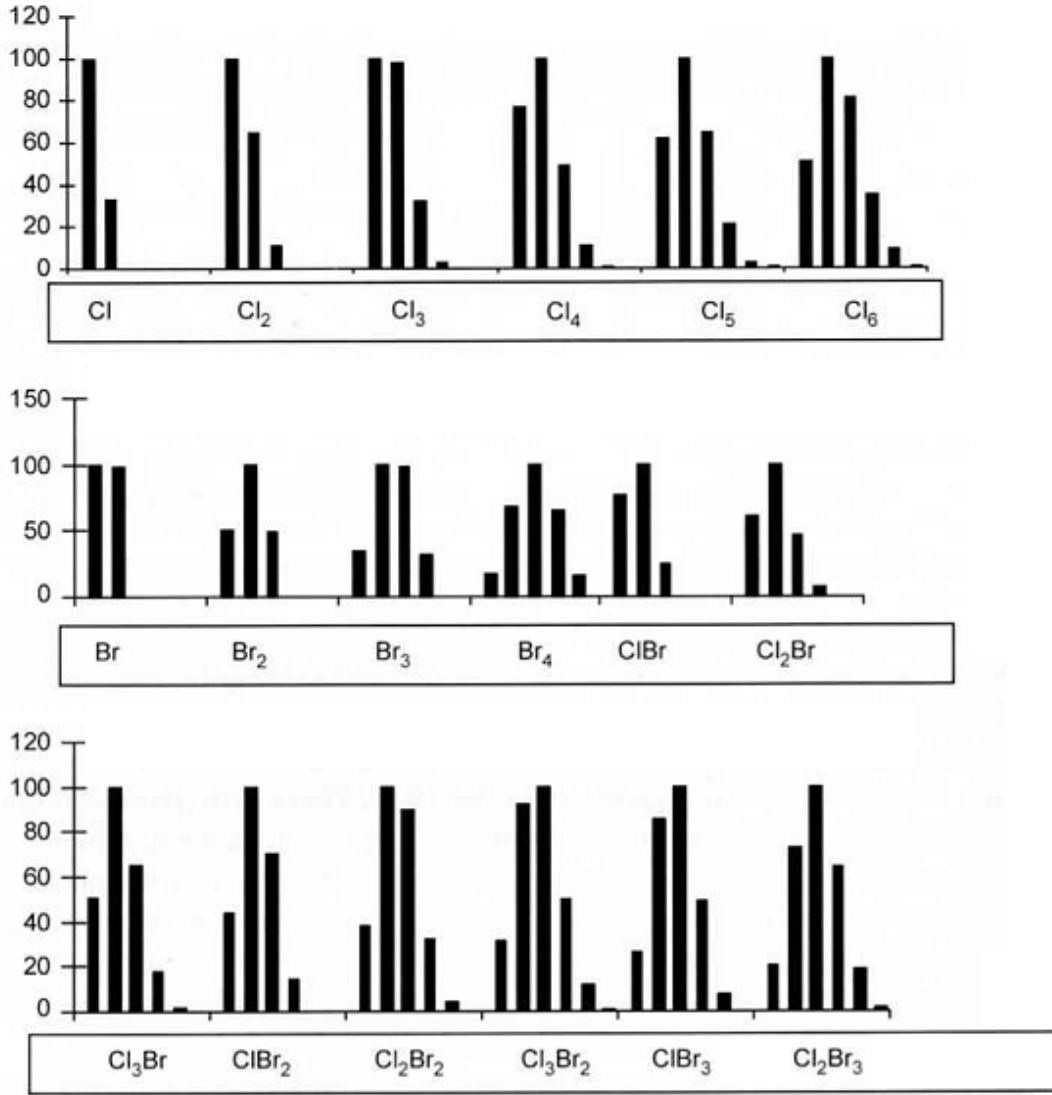
^{37}Cl izotopu olarak bulunur. Dolayısıyla klorür içeren her bir ana ya da parçalanma iyonu klorürün tipik izotopik kümesinden kolaylıkla tanımlanabilir.

Pestisitlerde yer alan elementlerin izotoplarının birim çözünürlükteki bollukları Çizelge 3.1 de verilmektedir.

Çizelge 3.1: Yaygın elementlerin doğal bulunma oranları.

Element	Kütle	%	Kütle	%	Kütle	%	Tür
H	1	100	2	0,015			A
C	12	100	13	1,1			A+1
N	14	100	15	0,37			A+1
O	16	100	17	0,04	18	0,20	A+2
F	19	100					A
Si	28	100	29	5,1	30	3,4	A+2
P	31	100					A
S	32	100	33	0,79	34	4,4	A+2
Cl	35	100			37	32,0	A+2
Br	79	100			81	97,3	A+2
I	127	100					A

Flor, iyot, fosfor, hidrojen gibi mono- izotopik elementlerde vardır. Bunlar A- elementler olarak ifade edilirken diğerleri tipik ilave izotopik pikler verirler, klor, brom, kükürt 2 kütle birimi fazla izotopik pik verir ve A + 2 elementler olarak belirtilirler. Dolayısıyla birden fazla brom ya da klor içeren moleküler ya da parçalanma iyonları Şekil. 3.3 de verilen karakteristik spektrumu verirler.



Şekil 3.2: İzotopik piklerin karakteristiği.

3.3.3 Parçalanma reaksiyonları

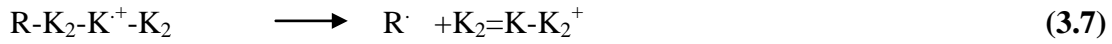
EI iyon kaynağında oluşturulan moleküler iyonlar çok çeşitli düzeyde iç enerjiye sahiptir ve bunların çoğu parçalanma için eşik değerin üzerindedir.

Kütle spektral reaksiyonlar tek molekülle reaksiyonlardır. EI iyon kaynağında basınç çarpışma reaksiyonlarını önleyecek kadar düşük düzeyde tutulur. Kütle spektrumu iyon kaynağında meydana gelen ardışık reaksiyonların sonuçlarını yansıtır. Reaksiyonların ana iyondaki pozitif yük için eşleşmemiş elektron tarafından başlatıldığı düşünülür. Moleküler iyondaki en çok tercih edilen radikal ya da yüklü kısım molekülün en düşük seviyedeki elektronun kaybedilmesinden kaynaklandığı düşünülür. İyonizasyon için tercih sırası $\sigma < \pi < n$ elektronları sigma bağı, çift bağlar (olefenik, fenil) ya da bağı yapmamış elektronlar.

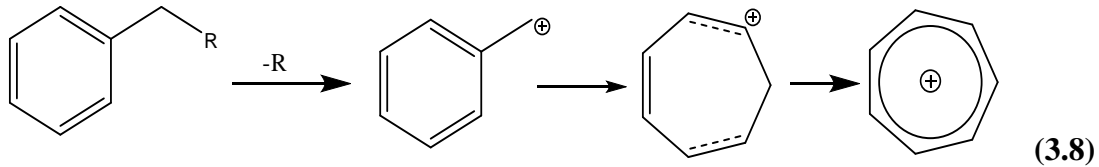
Sigma bağı parçalanması alkan parçalanmaları için tipiktir. Elektron kaybı doymuş bir bağdan gelir. En çok oluşan parçalanma türevi pozitif yükü en iyi kararlı hale getiren yapı olacaktır. Dallanmamış alkanlarda sigma bağları bağ kuvveti açısından hemen hemen birbirine eşittir. Sonuç olarak elde edilen kütle spektrumunda bolluk açısından düzenli olarak değişen birçok pik elde edilirken çok küçük bir moleküler iyon elde edilir bazen de gözlemlenmez. Alkan spektrumu kütle farkı 14 (K_2) olan iyon serisinden kolaylıkla anlaşılabilir.



Radikal kısımda reaksiyonun başlaması elektronu çiftlemek için olan kuvvetli eğiliminden kaynaklanır. Elektron komşu atoma yeni bir bağ oluşturmak üzere verilir. Bu başka bir bağın parçalanmasını beraberinde getirir. Bu reaksiyon genellikle α parçalanması olarak adlandırılır. İyi bilinen bir örneği allilik çift bağdan elektron kaybıyla iyonizasyon ile allilik parçalanmadır.

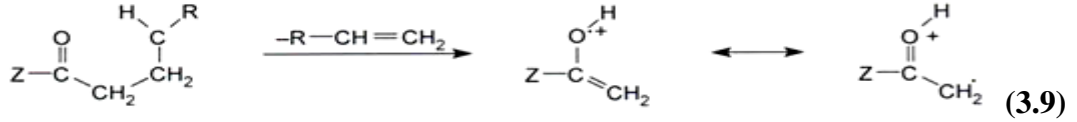


Başka bir karakteristik örnek alkil sübstütiye aromatik bileşiklerden benzilium ya da tropilium iyonu oluşumudur.



Hetero atomun bağ yapmamış elektronlarından iyonlaşma tercih edildiği için böyle yarıma reaksiyonlarından kaynaklanan parçalanmalar bulunur. Yarıma reaksiyonu elektron çiftini çeken pozitif yük tarafından başlatılır. R^+ oluşturma eğilimi R-Y deki Y nin indüktif etkisiyle paraleldir. Dolayısıyla indüktif yarıma olarak adlandırılır.

Basit bağ parçalanmalarının yanı sıra düzenlenme reaksiyonları da gözlemlenir. Özellikle, radikal kısımda başlayan hidrojen atomu düzenlenmeleri önemli bir sınıfı oluşturur. 6 üyeli ara yapı üzerinden gerçekleşen hidrojen düzenlenmeleri McLafferty düzenlenmesi olarak adlandırılır. Karbonil grubu gibi doymamış fonksiyonel yapı içeren bileşikler için γ hidrojen atomu siterik olarak uygun olan geçiş yerine transfer olur.



Özetle oluşan iyonun bolluğunu etkileyen en önemli faktör rezonans kararlılığı (alil ya da benzil katyonu) ya da açıl iyonunda olduğu gibi hetero atomun bağ yapmamış orbitalini kapsayan elektron paylaşımı $\text{R}-\text{C}^+=\text{O} \longleftrightarrow \text{R}-\text{C}=\text{O}^+$ gibi sebeplerden kaynaklanan kararlılıktır. Diğer bir itici güçte küçük, kararlı, yüksüz yapıların H_2O , C_2H_4 , CO , K_3OH , HCl ve CO_2 gibi oluşumların beraberinde getirdiği daha kararlı radikal iyon oluşumudur [59-60].

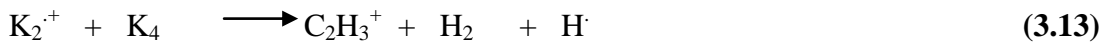
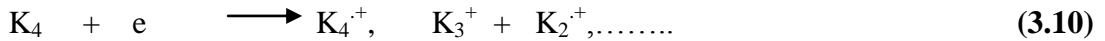
3.4 Kimyasal İyonizasyon

Kimyasal iyonizasyon (CI) kromatografik dedektör olarak kütle spektrometrelerine uygulanabilen tercih edilen metottur. LC-MS lerde CI temel iyonizasyon tekniğidir. EI da moleküler iyon vermeyen birçok molekül CI da moleküler iyonu gösteren iyonlar oluştururlar. Üstelik CI şartları ECD ile pestisit analizine benzer şekilde, elektron yakalama ile yüksek elektron ilgisi olan moleküllerden yüksek verimli negatif iyonlar oluşturan bol termal elektronlar üretir.

CI için iyon kaynağına reaktif gaz yüksek konsantrasyonda analit konsantrasyonuna oranı $10^4/1$ olacak şekilde verilir. Reaktif gaz EI da olduğu gibi iyonlaşır. Primer (ilk) iyonların oluşumunu takiben bu primer iyonlar ile nötral gaz arasında iyon molekül reaksiyonları ile kimyasal iyonizasyon reaktiflerini ya da çeşitli bu tür reaktif iyonlarla birlikte termal elektronlar oluşur [61].

3.4.1 Pozitif iyonlar

En sık olarak kullanılan reaktif gaz metan dır çünkü neredeyse bütün organik yapıları iyonlaştırır. Reaktif türler aşağıdaki reaksiyonlar ile oluşur.



1 torr basınç altında iyon popülasyonunun %90 ı K_5^+ , $C_2H_5^+$ ve $C_3H_5^+$, sırasıyla $M/Z= 17, 29, 41$ iyonlarından oluşur. K_5^+ brönsted asidi gibi davranarak protonlanmış moleküler iyon vermek üzere ekzotermik olarak neredeyse tüm organik moleküllerle reaksiyona girer.



Görülebilecek diğer reaksiyonlar,



Son iki reaksiyon çift moleküllü birleşme reaksiyonlarını gösterir ve genellikle gaz fazda çözme işlemi olarak sınıflandırılırlar.

Diğer yaygın reaktif gazlar izobütan ve amonyaktır. Bunlar yumuşak reaktif gazlardır çünkü bütün organik molekülleri iyonlaştırmaz ve daha az parçalanmaya sebep olurlar.

Kimyasal iyonizasyon asidik reaktif gazdan analite proton transferi ile olduğu zamanlarda proton-transfer reaksiyonunun ekzotermikliği protonlanmış moleküler iyonun iç enerjisini ve dolayısıyla parçalanmanın kapsamını belirler.

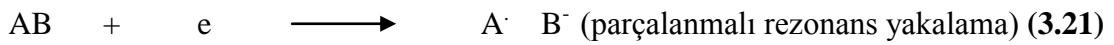


Proton-transfer reaksiyonunun ekzotermikliği direk olarak proton ilgisine bağlıdır [62].

CI-MS in bir analitin moleküler kütlelerini doğrulamak için uygun olmasının iki sebebi vardır. Güya-moleküler iyonunda $[M+H]^+$ iç enerjinin hatta metan reaktif gaz olarak kullanılsa bile 400 kJ/mol den daha fazla olması pek muhtemel gözükmemektedir. Sonuçta bol iyonlar moleküler iyon bölgesinde olacaktır. Kararsız moleküller için iyonizasyonun ekzotermikliği yumuşak reaktif gaz seçilerek azaltılabilir. Bununla birlikte, tek sayılı elektron $[M+H]^+$ iyonları EI ile oluşturulan radikal M^+ iyonlarına göre doğal olarak kendiliğinden bir kararlılığa sahiptir.

3.4.2 Negatif iyonlar

EI koşullarında filament tarafından yayılan yüksek enerjili elektronlar sadece az bollukta negatif iyonlar üretir. CI koşullarında ise nötral gaz molekülleri ile çarpışarak ve pozitif iyon oluşumunu sağlayarak enerji kaybederler. Oluşturulan düşük enerjili elektronlar bir numune molekülü AB ile üç farklı mekanizma ile etkileşebilir.



Oldukça düşük enerjili (~ 0 ev) “yakın termal” elektronlar AB nin pozitif elektron ilgisi olduğu varsayılarak rezonans yakalamaya uğrayabilirler. AB nin elektron yakalaması için büyük bir ilave kesit ile böyle bir negatif iyon spektrası diğer iyonizasyon teknikleri ile elde edilenlerden daha hassas olarak elde edilebilir. Buna rağmen fevkalade hassasiyetler sadece analit molekülünün yapısına göre olan uygun şartlar altında elde edilebilir. Diğer taraftan bu tür bilgiler CI ölçümleriyle birlikte negatif iyon okuma yeteneği olan cihazlarla sağlanır. En çok tercih edilen cihaz kromatografik analizde pozitif ve negatif iyonları hemen eş zamanlı olarak değişimli olarak okumaya imkân tanıyandır.

Elektron yakalama negatif kimyasal iyonlaştırma (ECNCI) düşük iç enerjili fakat tek elektron iyonun kendinden kaynaklanan kararlılığı ile negatif moleküler iyon radikalleri oluşturur. Bu yüzden, moleküler iyonun bolluğu moleküldeki bütün rezonans kararlılığı ihtimallerine bağlıdır. Sıklıkla bol kararlı bir anyon tüm kütle spektrumunu tayin eder. ECNCI ye ters olarak negatif CI özel reaktif gazlar kullanılarak uygulanabilir. Brönsted bazları, pozitif iyon oluşumunda brönsted asitlerinin oynadığı rolü oynar

Örneğin K_3O^- brönsted bazı olarak davranıp $[M-H]^-$ iyonlarını molekülden bir hidrojen alarak üretir. İyonizasyon tekniği parçalanma eğilimini az olan düşük enerji ile tek elektronlu moleküler iyonlar oluşturur. Dolayısıyla güya-moleküler iyon olan $[M-H]^-$ iyonu spektrumdaki en şiddetli piki oluşturur [63].

PCI ve ECNCI için kullanılan reaktif gazları kullanmak kolay olmadığı için bu metotlar birçok uygulamada çok açık faydaları olmasına rağmen henüz yaygınlaşmamıştır.

3.5 Tamamlayıcı Bilgiler

Aynı molekülün farklı iyonizasyon teknikleri ile alınan kütle spektrumları birbirlerini tamamlayıcı yapıya sahiptir. EI ile iyonizasyon işlemi sırasında oluşan ana iyon radikal ya da tek-elektron iyon olmasından kaynaklanan kendiliğinden gelen bir kararsızlığa sahiptir. Dolayısıyla seri parçalanmalar yaygındır buda yapısal bilgi sağlar. Moleküler iyonun bolluğu düşük olabilir. CI molekül ağırlığı bilgisi sağlamanın kredisine sahiptir. Çünkü gaz faz reaksiyonunda proton transferi ile güya-moleküler iyon $[M+H]^+$ çift elektron ana iyonlarını oluşturması baskın mekanizmadır. Bu çift sayılı elektronlar genellikle oldukça kararlıdır ve çok az parçalanırlar. Buna rağmen proton transferinin farklı ekzotermikliği kütle spektrumunun farklı gözükmesine neden olabilir. Reaktif gaz metan olduğunda moleküler ağırlığını tarif eden iki iyon vardır bunlar $[M+29]^+$ ve $[M+41]^+$ genellikle gözlemlenir ve güya moleküler iyonu daha güvenilir yaparlar. ECNCI ile sonradan gelen parçalanmalar ile negatif tek elektronlu moleküler iyonlar oluşur ve kütle spektrumu birkaç iyonun baskın olduğu bir hal alır. Organa fosforlu pestisitler ile sıklıkla organofosfat grubundan kaynaklanan tek bir parçalanma iyonu gözlemlenir. Dietil tada dimetildithio fosfat olarak organofosfatların alt grubunun tarif edicisidir [64-65].

3.6 Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi

HRMS bir iyonun kesin kütlelerinin ölçülmesine olanak sağlar. Dolayısıyla elemental bileşimini kesin bir biçimde tanımlanmasını sağlar. Bu yüksek çözünürlük çift odaklanmalı kütle spektrometresiyle ya da FT-ICR cihazları ile sağlanabilir. Elemental bileşim bilgisinin kullanılabilirliği kütle artmasıyla artar. Teknik temel araştırmada kimyasal yapısı bilinmeyen moleküllerin yapısı aydınlatılacağı zaman büyük önem kazanır. Çevre analizlerinde GC-HRMS poliklorlu dioksinlerin (PCDDs) ultra eser analizlerinde kullanılmaktadır. Çizelge 3.2 de en önemli klorlu Dioksin olan 2,3,7,8 tetra klorodibenzo-p-dioksin (2,3,7,8 TCDD) için muhtemel interfereanslar verilmiştir. Yaygın olan düşük çözünürlük kütle spektrometresi

(LRMS) GC kullanıldığında ana iyon olan $M/Z=322$ seçilmiş iyon gösterimi modunda (SIM) izlendiğinde 2,3,7,8 TCDD yi Çizelge 3.2 deki interfereanslardan ayırt etmek mümkün olmayacaktır [66].

Çizelge 3.2: 2,3,7,8 TCDD nin muhtemel interfereanslarını ayırmak için HRMS in uygulanması.

Bileşik	Formül	Girişim yapan iyonun kütlesi	Gereken çözünürlük
2,3,7,8 TCDD	$C_{12}H_4O_2Cl_4$	321,8936	
Heptaklorobifenil	$C_{12}H_3Cl_7$	321,8678	13000
Nonaklorobifenil	$C_{12}HCl_9$	321,8491	7300
Tetraklorometoksibifenil	$C_{13}H_8OCl_4$	321,9299	8900
DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	321,9292	9100
DDE	$C_{14}H_8Cl_4$	321,9292	9100

LRMS uygulandığında bu interfereanslar kromatografik olarak kesinlikle ayrılmak zorundadır. Öteki takdirde 2,3,7,8 TCDD ile birlikte elue olan herhangi bir bileşik yanlış pozitif tanımlamaya neden olur. Uzak durulacak bir diğer problem birlikte yürüyen interfereansların kütle/şiddet oranının tanımlayıcı iyonların $M/Z=320$, 322 ve 324 yanlış olmasına ve dolayısıyla yanlış negatif sonuca ulaşılmasına sebep olması.

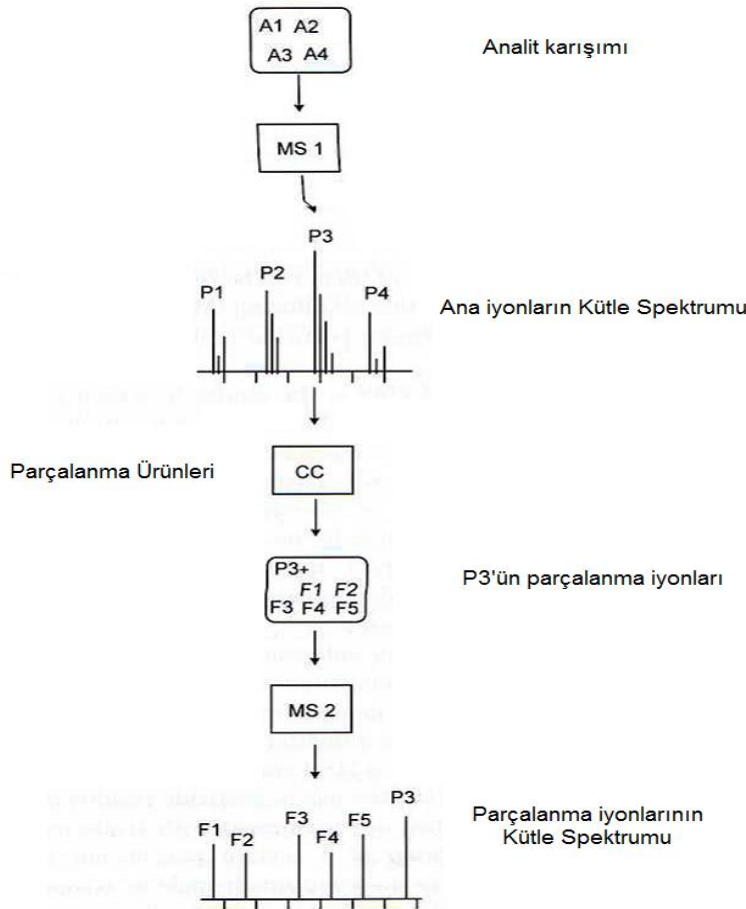
PCDD kalıntılarının izlenmesi femtogram seviyesinde yapıldığından SIM modunda GC-MS gerekli tespit hassasiyetini sağlayabilen tek metottur. Pozitif ya da negatif sonuçlar başka bir analitik teknik ile kanıtlanamaz.

3.7 Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS)

Kütle spektrometresiyle elde edilen yapısal bilgiye iki kütle spektrometresinin bir cihazda birleştirilerek daha ileri bir boyuta götürülebilir. Bu teknik kütle spektrumunda seçilen pikin parçalanma iyonlarını (daughter) ölçmeye izin verir. Birinci kütle spektrometresi karışımlar için ayırıcı cihaz olarak kullanılır (GC-MS ya da LC-MS teki ayrılmamış pikler gibi). Seçilen bir iyon ayrıldıktan sonra ikinci kütle analizöründe ayrılmak üzere bu iyon enerji uygulanır ve parçalanma iyonları oluşturulur. Bu kütle spektrum daha sonra seçilen iyon (parent) için yapısal karakterizasyonda kullanılır. Teorik araştırmada bu method yapıyı ve molekülün parçalanma iyonlarının kararlılıklarını araştırmak için kullanılırken, kalıntı analizlerinde teknik CI gibi yumuşak iyonlaştırma teknikleriyle oluşturulan moleküler türlere uygulanabilir. Tarif edildiği gibi PCI $[M+H]^+$ üretir ve genellikle çok az parçalanmaya uğrar. Buda molekül ağırlığının tespitinde kullanışlı olurken

yapısal bilgi sağlamaz. MS/MS ölçümlerinde kullanılan ilk cihazda 3 quadrapole bir araya getirilmişti. Bu yüzden üçlü-kuad olarak adlandırılmıştı. İlk kuadrapole $[M+H]^+$ için ayırma cihazı olarak ve üçüncüde parçalanma işleminin ürünlerini izlemek için kütle analizörü olarak kullanılır. Bu parçalanma merkez kuadrapolde hedef gaz ile çarpışma sonucunda oluşturulur ve çarpışma aktivitesine (CA) ya da çarpışma kaynaklı parçalanma (CID) ya denk gelir. Böyle bir CID kütle spektrumu EI spektrumunun olduğu kadar bileşiğin yapısı ya da kimliği için tanımlayıcıdır. MS/MS cihazı GC ve LC ler ile normal bir kütle spektrometresinin birleştirildiği gibi birleştirilebilir böylece pestisit analizi için en teferruatlı cihaz elde edilir. Cihaz tamamen bilgisayar kontrolü altında olduğundan özel teknikler uygulanabilir.

Tandem kütle spektrometresi başlıca iki şekilde uygulanabilir. İki ayrı spektrometre kullanılarak (çoklu sektör ya da çoklu kuadropole cihazlar) uzayda ardışık olarak ya da aynı kütle ayırma sistemini iki kere kullanarak (iyon trap pestisit analizlerinde pek kullanılmayan FT-IRC) zamanda ardışık olarak yapılır[67-70]. Uzayda ardışık ayırma daha kolay anlaşılırdır ve Şekil 3.4 de gösterilmektedir.



Şekil 3.3: Uzayda ardışık ayırma.

Bileşiklerden oluşan karışım iyonlaştırılır. Ve kütle analizöründe ayrılır. MS1 sadece bir iyon (parent) CID in gerçekleştiği çarpışma hücresine yollanır. Oluşan parçalanmalar (daughter ya da product) iyonlar kütle analizöründe ayrılır. MS2. Monoizotopik iyonlar seçilerek sadece monoizotopik daughter iyonlar elde edilebilir. Bu yüzden daughter iyon spektrumu izotopik kümeden yoksundur. Daughter iyonun Md^+ nı parent iyondan Mp^+ oluşumunu açıklayan temel denklem nötral Mn in kaybedilmesidir.



Parent iyon MS1 de seçilir, daughter iyonda MS2 de tespit edilir ve Mn farka tekabül eder. MS/MS ölçümlerinde bu üç türde bağımsız değişken olarak belirlenebilir.

MS/MS teki en basit reaksiyon parent iyonun daughter iyonlara ve nötral parçalara ayrılmasıdır. Bu, ürün (daughter) iyon taramasına tekabül eder ve tüm ürün iyon spektrumu ile birçok bilgi sağlar. Ürün iyon MS/MS te seçilen bir bileşik için en düşük tespit limitini sağlayabilmek için tek reaksiyon izleme (single reaction monitoring) SRM uygulanır. Bu teknikte bütün değişkenler sabittir. Bunun anlamı birinci kütle analizörü parent iyonu geçirmeye ayarlanırken ikinci kütle analizörü belirlenen daughter iyonu iletmeye ayarlanır. Bu SRM tekniği GC-MS teki tek iyon izleme (single iyon monitoring SIM) modunun bir benzeridir. GC-MS/MS te ve LC-MS/MS te SRM nin anlamı MS/MS spektrumunda kimyasal gürültüyü bertaraf etmektir. Bu teknik LC-MS ile gıda numunelerinde pestisit analizlerinde çok öneme sahiptir. SRM tüm MS/MS spektrumuna göre daha az bilgi vermesine rağmen, tek adımlı kütle spektrometrik analiz üzerinden seçiciliği oldukça arttırmaktadır. SRM modunda GC-MS/MS te pik üretimi için üç bağımsız kriter karşılanmalıdır. Alıkonma zamanı, ana (parent) iyonun kütlesi ve ürün (product) iyonun kütlesi seçilen değerleri karşılamalıdır. Çoklu pestisit analizlerinde böyle tek bir SRM ölçümü yapılmak zorunda değildir. Tek bir alıkonma zamanı penceresinde çoklu reaksiyon izlemeye (MRM) olarak adlandırılan birden fazla SRM tekrarlanarak yapılabilir. Bu LC-MS/MS ile gıda numunelerinde çoklu pestisit kalıntısı analizi yapmanın en verimli ve yaygın yoludur.

MS/MS in benzersiz bir yönü bileşik sınıflarını hızlı bir şekilde tarama yeteneğidir. Temel MS/MS reaksiyonuna tekabül ederek Üç türden herhangi birisi MS/MS deneyinde bağımsız değişken olarak tasarlanabilir. Eğer product iyon Md^+ ya da

nötral parça Mn, bağımsız değişken olarak tanımlanırsa başka hiçbir analitik tekniğin sağlamadığı yeni bir bilgi sağlanır. Fakat bu teknik buna rağmen pestisit analizi için pek önem taşımaz çünkü hedef bileşik yani pestisitler bilinen ve çoklu bileşik sınıflarına aittir.

Md⁺ nin bağımsız değişken olduğu ölçümler parent (precursor) iyon taraması olarak bilinir eğer bir bileşik sınıfı çok kararlı bir iyon oluşturan alt özel bir yapı içeriyorsa parent iyonlar genel daughter iyon oluşturma eğilimi olan bu alt yapı ile bu sınıfın üyelerinden türetilirler. MS2 bu daughter iyon ve MS1 in taramaya sabitlendiği zaman bütün parent iyonlar tespit edilebilir. Bu teknik pestisit analizinde sınırlı kullanıma sahiptir.

MS/MS analizi tarif edildiği üzere, bir parent iyonun birinci kuadrapolde ayrılmasından sonra CID çarpışma hücresi olarak hizmet veren ikinci kuadrapole veya oktapolde gerçekleştirilir. Sonuçta oluşan product iyonlar üçüncü kuadrapolde ölçülür. Tandem MS in bu düzenlemesi genellikle alanda MS/MS olarak tarif edilir. MS/MS ayrıca bütün bu deneysel basamakların birbirinin ardından iyon tuzağının alanında gerçekleştiği iyon trap cihazlarında da yapılabilir. Bu yüzden bu teknik zamanda MS/MS olarak tarif edilir. Birinci adımda precursor iyon izole edilir ve tuzakta biriktirilirken diğer iyonlar çıkartılır. Daha sonra izole edilen precursor iyon hızlandırılır ve tuzaktaki helyum ile çarpışarak product iyonları oluşturur. Bu iyonlarda kütle spektrumunu üretir. İyon trap ile üçlü-kuadrapole cihazlar arasındaki fark iyon trap cihazlarda sadece product iyon taraması mümkündür parent iyon ya da nötral kayıp taramaları yapılamaz. Buna rağmen bu önemli bir dezavantaj olarak düşünülmemelidir. Çünkü bu iki teknik pestisit analizinde önem taşımaz. Diğer taraftan iyon trap cihazlar product iyonun tuzakta alıkondduğu ve başka set parçalanma iyonlarının oluşumuna imkân tanıyan MSⁿ ya da çok basamaklı MS analizlerine imkân tanımaktadır. Bu işlem her basamaktaki en bol iyonun seçilerek alıkonulup parçalanması için otomatik hale getirilebilir. Bu peptit gibi moleküllerin yapılarını belirlemek için oldukça iyi bir tekniktir. Fakat pestisit kalıntısı analizlerinde şuana kadar kullanımına rastlanmadı.

3.8 GC-MS İle Çoklu Pestisit Taraması

3.8.1 GC-MS ile çoklu pestisit taramasına giriş

Birkaç on yıldır gıda numunelerinde ısısal olarak kararlı 400 ün üzerinde pestisitsin çoklu tarama prosedürü gaz kromatografik tespiti dayanmaktadır. ECD, FPD, NPD gibi yaygın olarak kullanılan seçici dedektörlerden ya da AED gibi element seçici dedektörlerden elde edilen sonuçlar GC-MS te doğrulama gerektirmektedir[71-74].

İlk zamanlardan itibaren pestisit alanında baskın olarak kullanılan doğrulama yöntemi GC-MS tir. Bu teknik fused-silika kapiler kolonların ve küçük pahalı olmayan kütle spektrometrelerinin gelişmesinin avantajını yaşamıştır. Günümüzde GC-MS kalıntı analizi yapanların elinin altında mutlaka bulunması gereken bir cihazdır.

Gıda numunelerindeki düşük seviyedeki pozitif tanımlamalar analizciye problem olur. Toplam iyon spektrumu mümkün olduğu durumlarda alınmalıdır. Modern GC-MS cihazlarının yüksek hassasiyeti ve seçiciliği matrise ve daha ziyade pestisitsin kimyasal yapısına bağlı olarak hemen her durumda 0,01 mg/kg ın altında bunu mümkün kılar birçok cihazla toplam iyon spektrumu düşük ng seviyelerinde değerlendirilebilir. Örneğin 1 ya da 10 pg analit GC-MS sistemine numuneyle enjekte edilir. Bu gıda numunelerine en az temizlik uygulanarak elde edilen ekstraktlarla gerçekleştirilebilir. Spektral ortalama ya da zemin çıkartımı özellikleri data sistemi tarafından sağlanır ve matristen gelen ya da tam ayrılmamış bulaşanları uzaklaştırmak için kullanılır. Buna rağmen oldukça zayıf spektralarla data işleme prosedürü düzeltilen kütle spektranın geçerliliğine şüfeli bakılmasına neden olur işte bu nokta analizcinin tanımlanan hedef bileşiklerin iyonlarının daha gelişmiş tespit limitleriyle daha düşük sayıda kütle kanalının kullanıldığı seçilmiş iyon gösterimi SIM moduna geçmesi gereken noktadır.

3.8.2 GC-MS cihazı

Kapiler GC en büyük ayırma gücüne sahip olan analitik metottur. MS moleküler analizin molekül ağırlığı hakkında bilgi vermesinin yanı sıra analit yapısı hakkında da bilgi veren en hassas metottur. Bu iki metot bir tek GC-MS sisteminde bir araya getirildiğinde, bu sistemin kapasitesi sadece bu iki analitik metodun yeteneklerinin toplamı olmaz, analitik bilgidaki artış üstel olur. Gıda ve çevre numunelerinde hedef

bileşiklerin taranmasında en çok önemli olan seçicilikte en son noktaya ulaşılabilir. GC-MS sisteminde tek bir analizde üretilen çok yüklü miktardaki veri, bilgisayarı cihazın vazgeçilmez parçası yapar. Oto örnekleyiciler splitless, programlanabilir sıcaklık buharlaştırıcı (PTV), yüksek hacimli enjeksiyon (LVI) ya da yazılım tarafından kontrol edilen başka bir modülle enjeksiyon işlemini gerçekleştirir. Son zamanlarda ise zorlu matris girişi (DMI) enjektör ya da temizleme aşaması için gereken zamanı oldukça azaltması bakımından oldukça umut vaad eden özel sürekli numune hazırlama ara yüzleri geliştirildi [76].

3.8.3 Kütle spektrometresi

Bir molekül vakumda iyonlaştığı zaman farklı kütlelerde bir karakteristik iyon grubu oluşturulur. Bu iyonlar ayrıştırıldığında bunların göreceli bolluklarına karşı kütle grafiği kütle spektrumunu oluşturur.

Kütle spektrometresi iki temel işleme bölünebilir; iyonlaşma ve kütle ayrımı ya da oluşan iyonların kaydedilmesiyle birlikte filtreleme.

Günümüzde kütle spektrometreleri tamamen bilgisayar kontrolü altında olan oldukça karmaşık cihazlardır. Temel olarak beş kısımdan oluşur. Numune girişi, iyonlaşma, kütle analizi, iyon tespiti ve veri işleme.

3.8.3.1 Numune girişi

Kapiler GC-MS lerde numune girişi günümüzde silika kolonunun sonunun direk olarak iyon kaynağına ısıtılan transfer hattı boyunca girmesiyle olur. Modern kütle spektrometreleri genellikle geniş çaplı kapiler kolon kullanıldığı zamanlarda görülen 20 ml/dk lık taşıyıcı gaz akışına kadar uyumlu olan verimli pompalarla donatılmaktadır. Narrow-bore kolonlar ise genellikle 2 ml/dk dan az taşıyıcı gaz akışı ile çalışırlar.

3.8.3.2 İyonlaşma

Analitler çok çeşitli yollarla iyonlaştırılabilir, fakat otomatik tarama analizleri için sadece elektron iyonlaşma hedef analizlerinin diğer iyonlaşma teknikleri ile mümkün olmasına rağmen yaygın olarak kullanılır.

3.8.3.3 Kütle analizörü

İyonlar iyon kaynağında oluşturulduktan sonra kütle analizöründe kütle/yük (M/Z) oranına göre analiz edilir. Beş çeşit kütle analizörü günümüzde kullanılır; manyetik sektör, kuadrapole kütle filtresi, iyon tuzağı (trap), uçuş süresi (time of flight, ToF) ve iyon cyclotron rezonans cihazları. Geçen 30 yıl boyunca kuadrapole ve iyon trap cihazlar pestisit analizi alanını domine ettiler. Buna rağmen son zamanlarda ToF cihazları GC cihazlarına bağlanarak uygun kolonlarla çok daha hızlı GC-MS analizine imkân tanırılar.

Manyetik sektör cihazlar: Organik MS te ilk çalışmalar ve GC-MS te ilk dolgu kolon ile iyon kaynağına özel bir ara yüzle ki bu ara yüz taşıyıcı gaz moleküllerini uzaklaştırarak analit iyonlarını iyon kaynağına ulaştırmaktadır. Bu ilk çalışmalar manyetik sektör kütle spektrometresi ile gerçekleştirildi. Kütle tespiti için iyonların ayrılması için elektromıknatis kullanılır. Tek odaklamalı sektör cihazlarda kütlesi m , ve z ilk yüklü iyonlar kaynağın çıkışına doğru kaynaktaki hızlandırıcı voltaj yardımıyla yüksek bir enerji yardımı ile hızlandırılırlar ve manyetik alan boyunca uçarlar. Burada belirli bir M/Z oranına sahip olan iyonlar dedektörden hemen önceki yarıktaki dar bir hatta odaklanır. Manyetik alanı değiştirecek (ya da hızlandırıcı voltajı) farklı M/Z oranında iyonlar dedektöre ulaşarak sabit bir pozisyondaki dedektörde zamanda ayrılarak tespit edilir.

Manyetik ve elektrostatik sektörlerin bir arada bulunduğu cihazlara çift odaklamalı kütle spektrometreler denir. Bunlar yüksek çözünürlükte kütle tespiti yeteneğine sahiptir. Aynı molekül kütlesine sahip farklı iyonları ayırır ve genel olarak bilinmeyen bileşiklerin yapısını açıklamak için kullanılır. Gıda analizlerinde ve rutin pestisit analizlerinde bu cihazlar çok nadir kullanılır. Fakat bunlar poliklorlu dibenzodioxin ve dibenzofuranların eser analizlerinde bilimin ulaştığı gelişme seviyesidir.

Kuadrapol cihazlar: Kuadrapole kütle analizörleri aslında bir kütle filtresidir. Radyal düzende paralel olarak yerleştirilmiş dört çubuktan oluşur. Karşıt çubuklar ard ardına salınan radyo frekansına bağlı olarak pozitif ya da negatif DC voltajı ile yüklenirler. İyonlar kuadrapole alanına 10-20 v arasındaki hızlandırıcı potansiyel sayesinde girerler. Çubuk boyuna dik bir şekilde salınmaya başlarlar. Salınmanın kararsız olduğu zaman filtreyi geçemezler çünkü salınımın genliği sonsuz olur.

Kararlı yörünge sağlandığında iyonlar dedektöre doğru iletilirler. Dolayısıyla kuadrapole filtre genellikle belli bir M/Z oranındaki (unit kütle çözünürlüğü) iyonları iletmeye ayarlanmış band geçiş filtresi gibi davranır. Kütle taraması elde etmek için DC ve radyo frekansı voltajı birbirlerine oranları sabit kalacak şekilde değiştirilir. Kuadropole kütle spektrometreleri yüksek hassasiyete ve milisaniye aralığında çok çabuk tarama yapabilme kabiliyetine sahiptir. Bu özellikler GC de üretilen dar pikleri tarayabilmek için oldukça ideal yapar.

İyon tuzağı (Trap) dedektörler: İyon trap kapiler GC için geliştirilen kuadrapole benzeri bir dedektördür. En önemli özelliği iyon kaynağı ve analizör bölgesinin aynı olmasıdır. İyon trapler göreceli olarak yüksek basınçta (0,1 Pa He) çalışırlar.

Tuzağa giren moleküller geleneksel elektron etki ile iyonlaşırlar. İlgilenilen M/Z oranındaki tüm iyonlar tuzakta tutulur. Bunlar end-cap elektrodlar ve halka elektrod arasında uygulanan radyo frekansı voltajı ile oluşan kuadrapole alanda tutulurlar. RF potansiyeli yükseltilerek belli bir M/Z ye ait salınımlar kararsız hale getirilir. Kararsız iyonlar end-cap elektrod kısmından trap i hemen terk ederler çünkü alttaki end-cap deliklidir. Bütün kütle spektrometreleri arasında full scan modunda en düşük tayin sınırı (LOD) seviyelerine iyon tuzağı ile ulaşılır fakat sim modunda kuadrapolde ya da manyetik sektör cihazlarda görülen hassasiyetin artmasına rastlanmaz.

Uçuş süresi dedektörler (Time of flight): Uçuş süresi (ToF) kütle spektrometresinde darbeli iyon demeti potansiyeli yardımı ile uçuş tüpünün içine doğru hızlandırılırlar ve dedektöre ulaşmaları için gereken zaman ölçülür. İyon kaynağı öyle bir şekilde darbelendirilir ki diğer darbenin (pulse) ilk iyonu dedektöre ulaşmadan bütün kütle spektrumu kaydedilir. ToF cihazların önemli bir karakteristik özelliği yüksek iyon geçirgenliğidir. Sonuç olarak ToF-MS lerin tespit limitlerinin kuadrapole MS ten daha iyi olması beklenir ve öylede rapor edilmiştir. Çözünürlük sınırlı olmasına rağmen bu konuda reflectrons kullanılarak önemli gelişmeler elde edildi. Bu tip ToF kütle spektrometreleri plazma ve lazer desorpsiyon teknikleri ile protein gibi büyük moleküllerin çalışılmasında kullanılır. Bu cihazlar son zamanlarda GC ve LC ile de bağlanmaktadır. İki beklenti vurgulandı; hem moleküler hem de parçalanma iyonlarının elemental kompozisyonu için bilgi sağlayan kesin kütle ölçümü ile geliştirilmiş çözünürlük ve birde saniyede 500 full range kütle spektrumu alabilen yüksek hızlı veri toplama sistemi ile hızlı veri toplama. Genişliği 100 ms

olan dar piklerin elde edildiği hızlı GC lerde böyle bir dedektör alıkonma zamanının ve kesin pik alanının hesaplanabilmesi için yeterli veri noktalarını elde edecek kadar yeterlidir.

Fourier dönüşümlü iyon hızlandırıcı rezonans (FT-ICR) cihazlar: Fourier-transform iyon cyclotron rezonans kütle spektrometrelerinde kütle analizi manyetik alana yerleştirilen kübik bir hücrede gerçekleştirilir. Hücre, iki tane karşılıklı tuzak plakası, iki tane karşılıklı uyarma plakası ve iki tane karşılıklı alıcı plakadan oluşur. İyonlar tuzanın içinde cyclotron hareketinde tutulabilir ve artan bir yarıçap fazında hareket etmek üzere radyo frekansı pulse ile uyarılabilirler. İyonların tutarlı hareketi alıcı plakalarda bir görüntü oluşturur ve bu sonuçta fourier transform uygulanarak normal kütle spektrumuna dönüştürülür. FT-ICRMS in en önemli özelliği oldukça yüksek çözünürlüğü ve hassasiyette çalışabilir olmasıdır.

3.8.3.4 İyon Tespiti

Günümüzde gaz kromatografisine bağlanan tüm kütle spektrometreleri elektron çoğaltıcı kullanır. Böyle bir elektron çoğaltıcıda iyon demeti basamak basamak arttırılan elektron demetine dönüştürülür. Analog tespitte çoğaltıcının sinyali voltaja dönüştürülür, ileriki aşamada şiddetlendirilir ve son olarak bilgisayar tarafından işlenebilen dijital sinyale dönüştürülür. Genellikle elektron çoğaltıcılar pozitif iyonları tespit etmek üzere yapılırlar fakat elektron çoğaltıcının önüne dönüştürücü dynode konularak negatif iyonlarda tespit edilebilir. Negatif iyonların etkisi ile dynode pozitif iyon oluşturur ve daha sonra tarif edildiği gibi şiddetlendirilir. ToF cihazlar mikro kanal plaka dedektörler kullanır. Bunlar benzer prensiple çalışırlar fakat çok yüksek zaman çözünürlüğüne sahiptir.

3.8.3.5 Veri toplama ve işleme

Pestisit kalıntı analizlerinin otomatik izlenmesinde iki işlem modu kullanılır; döngülü tarama ya da full scan modu olarakta tarif edilen tekrarlı tarama ve SIM. Full scan modda veri toplamsı GC kolonu eluentinin solvent piki geçtikten sonra başlayan tüm analiz süresi boyunca sürekli tekrarlı tarama ile gerçekleştirilir. Tarama oranı operatör tarafından önceden belirlenir. Kapiler kolonlar ile 0,5-1 s/tarama arasında değişir fakat kısa kolonlar ve hızlı GC lerle daha dar GC piklerinden daha kesin pik görüntüleri elde etmek için daha yüksek tarama oranları gerektirebilir. Modern quadrapole cihazlar ile saniyede 20 tarama oranı mümkündür. Fakat yüksek tarama

oranlarında cihazın görülen tespit hassasiyeti düşer çünkü S/N her bir iyonun dwell zamanına bağlıdır. Dolayısıyla saniyede 10 tarama oranı pestisit kalıntısı analizlerinde kabul edilebilir görülmektedir [23].

4. TEZ ÇALIŞMALARI

4.1 Kullanılan Cihazlar

Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi: Perkin Elmer Clarus 500 kuadrapole

Santrifüj: SED

Girdaplı Karıştırıcı: VWR

Saf Su Cihazı: Milli Q

Hassas Terazı: GEC Avery

Mikropipetler: Eppendorf

4.2 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

4.2.1 Kimyasallar

a) Pestisit Standartları

Çizelge 4.1: Çalışmada kullanılan pestisitlere ait bilgiler.

Pestisit	Katalog No	Saflık (%)
Amitraz	C10230000	97
2,4 Dimetilaniline (DMA)	C12724500	98,5
N-2,4 Dimetilfenil formamide(DMF)	C12737000	96,5
N-2,4-Dimetilfenil-N-metil- formamidine (DMPF)	L12738000AC	100
Klorpirifos	C11600000	98
Trifluralin	C17850000	98

b) Analitik Saflıktaki Kimyasallar

Asetonitril : Merck 1.00030.2500

Magnezyum Sülfat : Merck 1.06067.1000

PSA : Varian Bond Elut

Aktif Karbon : Varian Bond Elut

C18 Sorbent : Varian Bond Elut

Sodyum Sitrat tribazik dihidrat: Sigma S4641

Sodyum hidrojen sitrat sesquihidrat: Sigma S43364

4.2.2 Sarf Malzemeler

5, 1, 0.1 ml lik otomatik pipet uçları

50 ve 15 ml lik polipropiilen santrifüj tüpleri

1,5 ml lik GC Vialleri

10 µl lik enjektör

GC-MS Kapiler Kolon:HP 50 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film kalınlığı

4.2.3 Çözeltiler

a) Pestisit Çözeltileri

2000 ppm (mg/L) stok pestisit standartı çözeltileri: 0,02 g (standartların saflık dereceleri dikkate alınarak) pestisit standardı 10 ml lik balon jøjeye tartılarak asetonitrilde çözüldü ve hacmine asetonitril ile tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltiler amber şişelerde -18 °C de 3 ay süreyle saklandı. Amitraz standardı kullanılmadan önce taze olarak hazırlandı.

500 ppm (mg/L) ara stok Amitraz standart çözeltisi: Hazırlanan 2000 ppm lik stok çözeltiden 2,5 ml alındı ve asetonitril ile 10 ml ye seyreltildi.

10 ppm lik pestisit standart çözeltisi: Hazırlanan 2000 ppm lik stok pestisit standardından 50 µl alınarak asetonitril ile 10 ml ye tamamlandı.

Çalışma standartları: Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için her bir pestisit standardından Çizelge 4.2 de verilen miktarlarda alınarak hazırlandı.

Çizelge 4.2: Çalışma standartlarının hazırlanması.

Derişim (ug/ml)	A	B	C	D
0,05	50	400	400	10
0,1	100	400	400	10
0,2	200	400	400	10
0,3	300	400	400	10
0,4	400	400	400	10
0,5	500	400	400	10
1,0	1000	400	400	10

A: 10 ppm lik standarttan alınacak miktar (μ l)

B: İç standart 1 den alınacak miktar (μ l)

C: İç standart 2 den alınacak miktar (μ l)

D: Son hacim (ml)

4.3 Araştırmada Kullanılan Numuneler

Çalışmada kullanılan salatalık ve ayva numuneleri yerel marketten satın alınmıştır. Alınan numuneler çalışılmadan önce analiz edilerek pestisit kalıntısı olup olmadığı kontrol edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Türkiye’de Avrupa birliğine oranla daha az miktarda pestisit kullanılmasına rağmen rastlanan pestisit kalıntısı sorunu daha fazladır. Meyve ve sebzelerdeki hastalık ve zararlılara karşı yapılan bilinçsiz mücadele çalışmaları sonucunda yetiştirilen ürünlerde pestisit kalıntılarında rastlanmakta buda ürünlerimizin ihracatını önemli bir şekilde tehlikeye sokmaktadır.

Çalışmamız meyve ve sebzelerdeki kalıntı sorununu gündeme getirmekle beraber, ülkemizde kullanımı yasak olmasına rağmen her yıl ihraç ettiğimiz ürünlerde rastlanıp sorun oluşturan amitrazın salatalık ve ayvada ki farklı sıcaklıklardaki kararlılığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

Amitraz ve bozunma ürünlerinin; DMA, DMF, DMPF in tayini için GC-MS metodu geliştirilmiştir. GC metodunda PTV enjeksiyon şekli en uygun enjeksiyon türü olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresinde SIM modu kullanılmış olup her pestisit için bir hesaplama birde doğrulama iyonu kullanılmıştır.

Amitrazın salatalık ve ayvadan alınması için quekers metodundan faydalanmıştır. Metotta numuneler asetonitril ile magnezyum sülfat ve tuz varlığında ekstrakte edildikten sonra santrifüj edilip üst fazdan alınan 1 ml lik kısma MSPD uygulanmıştır. Bu metot valide edilerek analitik gereksinimleri karşıladığı görülmüştür.

Metodun valide edilmesinden sonra üzerlerine amitraz uygulanan salatalık ve ayva numuneleri farklı sıcaklıklarda saklanarak bozunma süreci izlenmiştir. Amitrazın sıcaklık arttıkça daha hızlı bozunduğu ve temel olarak 3 bozunma ürününün DMA, DMF, DMPF in oluştuğu ayrıca bu üç bozunma ürününün haricinde iki adet daha bozunma ürününün oluştuğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak yaş sebze ve meyve yetiştiriciliği açısından önemli bir merkez olan ülkemizde ciddi pestisit kalıntısı sorunları yaşanmaktadır. Özellikle son yıllarda ihraç ettiğimiz ürünlerde amitraz a rastlanmasından dolayı çeşitli ülkelerle sorun yaşanmaktadır. Amitraz kullanımı ülkemizde yasak olmasına rağmen çeşitli

ürünlerde bilinçsizce kullanılmaktadır. Amitrazın tayini için kullanılan analitik yöntemlerin birçoğu sadece diğer pestisitlerin yanında amitrazın tespitine odaklanmıştır. Oysaki amitraz hızlı bir şekilde farklı bileşiklere parçalandığından kullanılan analitik metotların bunların tespitini içerecek şekilde güncellenmesi gerekmektedir.

Çalışmada Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS Cihazı kullanıldı. Cihazın uygun şartlarda çalışması için kütle spektrometresinin lens, multiplier ayarları ve diğer değişkenler cihazın yazılımında olan oto tune ile optimize edilmiştir.

5.1 Çalışma Metotunun Belirlenmesi

5.1.1 GC-MS çalışma koşullarının belirlenmesi

Uygun çalışma koşullarının belirlenmesi için farklı fırın sıcaklık programları denendikten sonra Çizelge 5.1 de verilen fırın koşullarında çalışmanın uygun olacağı görülmüştür.

Çizelge 5.1: Gaz kromatografisi fırın programı.

İlk sıcaklık (°C)	Artış (°C/dk)	Son sıcaklık (°C)	Bekleme (dk)	süresi
50	-	50	4	
50	15	150	2	
150	10	250	8	
250	30	280	2	

Yukarıdaki fırın koşulları ile pestisit standartları tek tek cihaza enjekte edilerek alı konma zamanları belirlenmiştir. Pestisitlere ait alı konma süreleri Çizelge 4.4 te, bu pestisitlere ait kromotogramlar da Şekil 5.1 de verilmiştir.

Çizelge 5.2: Pestisitlerin alı konma zamanları.

Pestisit	Alı konma Zamanı (dk)
2,4 Dimetilaniline (DMA)	10,80
2,4 Dimetilformamidin (DMF)	16,14
Klorpirifos	16,21
N-2,4-Dimetilfenil-N-metil-formamidin(DMPF)	16,72
Trifluralin	21,52
Amitraz	29,73

5.1.2 Enjeksiyon şekli

Gaz kromatografisi ile yapılan çalışmalarda yaygın olarak iki tür enjeksiyon kullanılmaktadır. Bunlar split/splitless ve programlanabilir sıcaklık buharlaştırması (PTV) dir. Programlanabilir sıcaklık buharlaştırması ile enjeksiyon daha fazla analitin kolona girmesine olanak sağladığından kalıntı analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Dolayısıyla çalışmada gerçekleştirilen enjeksiyonlar programlanabilir sıcaklık valfi modunda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.3 te çalışmalarda kullanılan enjeksiyon koşulları verilmektedir.

Çizelge 5.3: PTV şartları.

İlk sıcaklık(°C)	Artış oranı(°C/dk)	Son Sıcaklık(°C)	Bekleme süresi(dk)
50	-	50	1,5
50	200	250	4

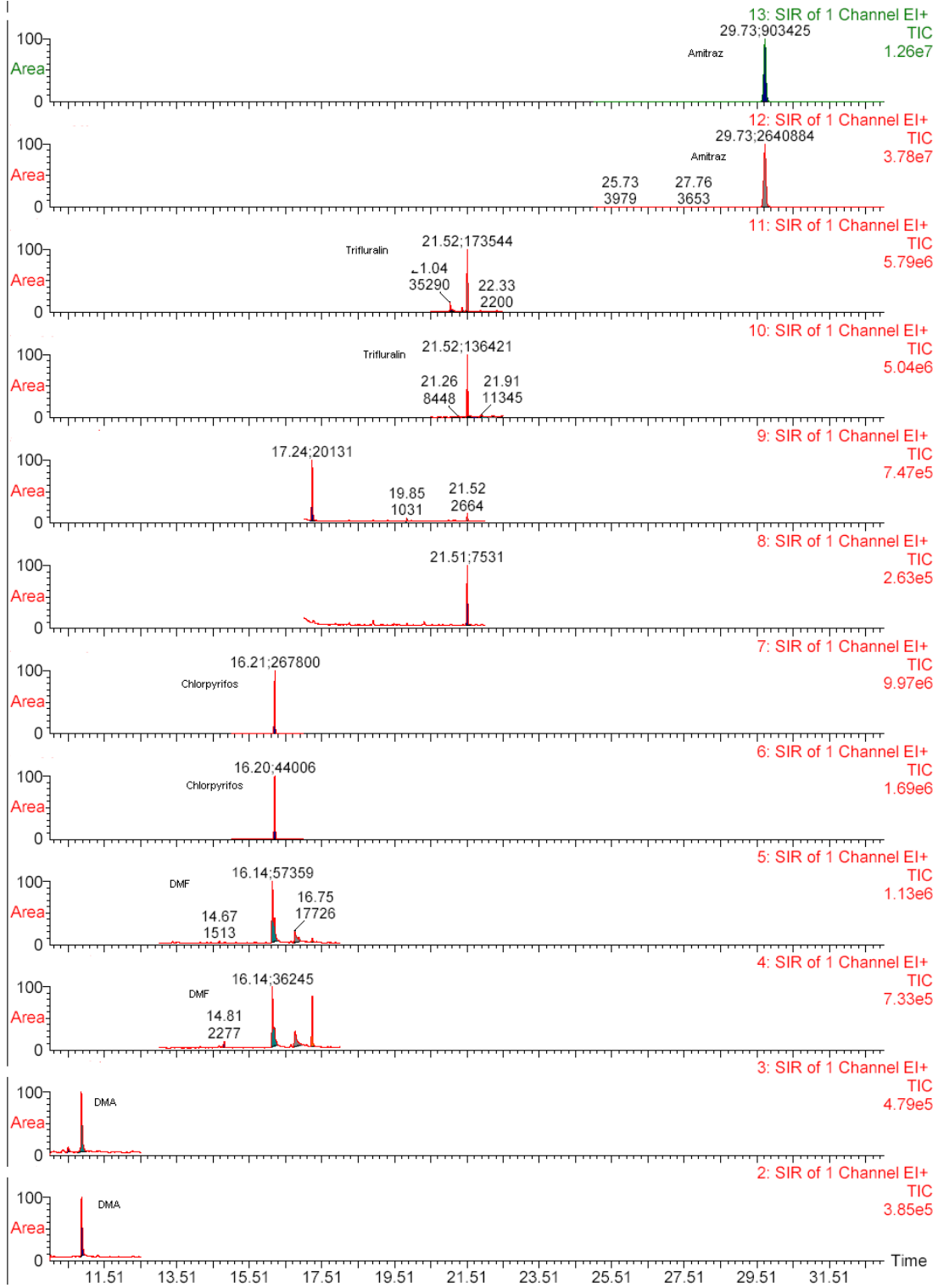
PTV programının ilk 2 dakikasında split açık konumda tutularak buharlaşan çözgenin kolona gitmeden uzaklaşması sağlandı. Daha sonra split kapatılarak artan enjektör sıcaklığıyla analitlerin kolona girmesi sağlandı. Enjeksiyon sırasındaki split programı Çizelge 5.4 de verilmiştir.

Çizelge 5.4: Enjeksiyon sırasındaki split programı.

Zaman(dk)	Split Durumu
0-2	Açık (oran: 80)
2-6	Kapalı
6-33	Açık (oran:20)

5.1.3 Kütle spektrometresi koşulları

Çalışmamızda numunelerden ayrıştırılan pestisitler gaz kromatografisinde yukarıda verilen koşullarda bileşenlerine ayrıldıktan sonra kütle spektrometresinde tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrofotometresinde miktar tayini seçilmiş iyon gösterimi modunda gerçekleştirilirken aynı zamanda her enjeksiyonda birde toplam iyon modunda tarama yapılarak molekül ağırlığı 50- 350 amu arası olan bileşiklerin taraması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1: Pestisit standartlarının alıkonma zamanları.

2.sır dma 106 iyonu, 3.sır dma 121 iyonu, 4.sır dmf 106 iyonu, 5.sır dmf 120 iyonu, 6.sır klorpyrifos 290 iyonu, 7.sır klorpyrifos 264 iyonu, 8.sır dmpf 162 iyonu, 9.sır dmpf 132 iyonu, 10.sır trifluralin 197 iyonu, 11.sır trifluralin 97 iyonu, 12.sır amitraz 162 iyonu, 13.sır amitraz 293 iyonu.

Kütle spektrometresinde kullanılan metot da ara geçiş hattı sıcaklığı 220 °C, ion kaynağı sıcaklığı 220 °C, olarak ayarlandı. İyonlaşma türü olarak elektron impact pozitif (70 eV) tekniği kullanıldı. Kütle spektrometresinde kullanılan metot a ait tarama programı Çizelge 5.5 te verilmiştir.

Çizelge 5.5: Kütle spektrometresi tarama programı.

	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
Taramasız zaman																	
Toplam İyon																	
SIM 1																	
SIM 2																	
SIM 3																	
SIM 4																	
SIM 5																	
SIM 6																	
SIM 7																	
SIM 8																	
SIM 9																	
SIM 10																	
SIM 11																	
SIM 12																	

Kütle spektrometresinde her bir bileşen için 2 iyon kullanıldı. Kullanılan iyonlardan bir tanesi hesaplama için kullanılırken diğeri doğrulama için kullanıldı. Her bir pestisit için kullanılan iyonlar Çizelge 5.6 da verilmiştir.

Çizelge 5.6: Kütle spektrometresinde pestisitler için kullanılan iyonlar.

Pestisit	Hesaplama İyonu	Doğrulama İyonu
DMA	106	121
DMF	120	106
Klorpirifos	264	290
DMPF	162	132
Trifluralin	97	197
Amitraz	162	293

5.1.4 Ekstraksiyon metodunun belirlenmesi

Çalışmada kullanacağımız metodu belirlemek için pestisit kalıntısı analizlerinde yaygın olarak kullanılan 3 farklı metodun karşılaştırılması yapıldı. Denenen ilk metod FDA tarafından geliştirilen ve pestisit analizinde uzun bir süre standart metod olarak kullanılan PAM 302 metodudur. Bu metodun akış şeması Şekil 5.2 de verilmiştir.

- 100 g numune tartılır
- 200 ml aseton ilave edilerek 2 dakika karıştırılır
- Vakum Altında Bunker hunisinde süzülür
- Süzüntüden 80 ml ayırma hunizisine alınır
- 100 ml petrol eter ve 100 ml diklormetan ilave edilerek ekstrakte edilir
- Su fazı ayrılarak üzerine 100 ml diklormetan ilave edilerek tekrar ekstrakte edilir
- Su fazı ayrılıp tekrar 100 ml diklormetan ile ekstrakte edilir
- Organik fazlar birleştirilerek sodyum sülfattan süzülerek kurutulur
- Rotary evaparatörde vakum altında 2 ml ye konsantre edilir
- Aktive edilmiş florosil cam kolona doldurularak 50 ml petrol eter ile yıkanır
- 2 ml ye konsantre edilen örnek kolana uygulanır
- 200 ml %15 etil eter/petrol eter ile yürütülür
- 200 ml %50 petrol eter/dietil eter ile yürütülür
- Toplanan faz rotary evaparatörde 1 ml ye konsantre edilir.
- Cihaza Enjekte edilir

Şekil 5.2: PAM 302 metoduna ait akış şeması.

İncelenen ikinci metot DFG S19 adı ile bilinen özellikle Almanya' da yaygın olarak kullanılan jel geçirgenlik kromatografisi yöntemine dayanan metottur. Bu metoda ait akış şeması Şekil 5.3 te verilmiştir.

100 g numune tartılır
200 ml aseton ilave edilerek 2 dakika karıştırılır
35 gr sodyum klorür ilave edilerek karıştırılır
100 ml %50 etilasetat/siklohegzan ilave edilir ve 1 dk karıştırılır
Organik faz ayrılarak sodyum sülfattan süzülerek kurutulur
Vakum altında rotari evaporatörde 7,5 ml ye konsantre edilir.
5 gr sodyum klorür ve 7,5 ml siklohegzan ilave edilerek süzgeç kağıdından süzülür
5 ml alınarak GPC cihazına enjekte edilir
Rotary evaporatörde vakum altında 2 ml ye konsantre edilir
17 dakika %50 etil asetat/siklohegzan ile yürütülür bu faz toplanmaz atılır
20 dakika %50 etil asetat/siklohegzan ile yürütülür bu faz toplanır
Toplanan faz 1 ml ye rotary evaporatörde konsantre edilir.
Cihaza enjeksiyon yapılır

Şekil 5.3: DFG S19 metoduna ait akış şeması.

İncelenen son metot ise son bir kaç yıldır yaygın olarak kullanılmaya başlanan Quechers metodudur. Bu metda ait akış şeması Şekil 5.4 te verilmiştir.

- 10 gr numune polipropilen santrifüj tüpüne tartılır
- 10 ml asetonitril, 4 g magnezyum sülfat 1 g sodyum klorür 1 gram trisodyum sitratdihidrat 0.5 g disodyum hidrojen sesquihidrat ilave edilerek el ile hızlı bir biçimde çalkalanır
- 10 dk 4000 rpm de santrifüj edilir
- Üst fazdan 1 ml santrifüj tüpüne alınıp üzerine 25 mg PSA, 150 mg magnezyum sülfat ilave edilerek çalkalanır
- 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilir
- Üst fazdan alınarak cihaza enjekte edilir

Şekil 5.4: Quechers metoduna ait akış şeması.

Üç farklı metodun karşılaştırılması sonucunda elde edilen sonuçlar ve metodların diğer açılardan karşılaştırılması Çizelge 5.7 de verilmiştir.

Çizelge 5.7: Pam, Dfg S19 ve Quechers metotlarının karşılaştırılması.

Kriter	PAM	DFG S19	Quenkers
Tekrarlanabilirlik %RSD	10-35	10-22	10-20
Geri kazanım%	45-105	65-110	75-110
Analizin uzunluğu (1 numune çalışılması)	6 saat	4 saat	0.5 saat
Harcanan çözen miktarı	1050 ml	500 ml	10 ml

Sonuç olarak pam metodu oldukça zaman alıcı ve çok fazla el ile yapılan basamak içermesinden dolayı tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değeri düşük sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Ayrıca analiz boyunca oldukça fazla miktarda solvent harcanmaktadır. DFG S19 metodu ise pam metoduna göre temizlik aşamasının GPC cihazında yapılmasından dolayı daha az el ile yapılan işleme sahiptir. Analizdeki bu otomatikleştirme tekrarlanabilirliğin ve geri kazanımın pam metoduna göre daha iyi çıkmasına sebep olmuştur. Ayrıca pam metoduna göre daha düşük çözen sarfiyatına gereksinim duymasının yanı sıra diklormetan gibi oldukça toksik olan çözen kullanımı içermemektedir.

Son olarak test edilen quechers metodu diğer metotlara göre çok kısa numune hazırlama süresine ve çok az sayıda el ile yapılan işleme sahip olmasından dolayı daha tekraredilebilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında oldukça düşük solvent sarfiyatı gerektirmesi de oldukça büyük avantajdır.

Yukarıda yapılan çalışmaların sonucunda çalışmamızın geri kalan kısmında quechers metodunun kullanılması uygun olacağı tespit edilmiştir.

5.2 Metod Validasyonu

5.2.1 Doğrusallık çalışmaları

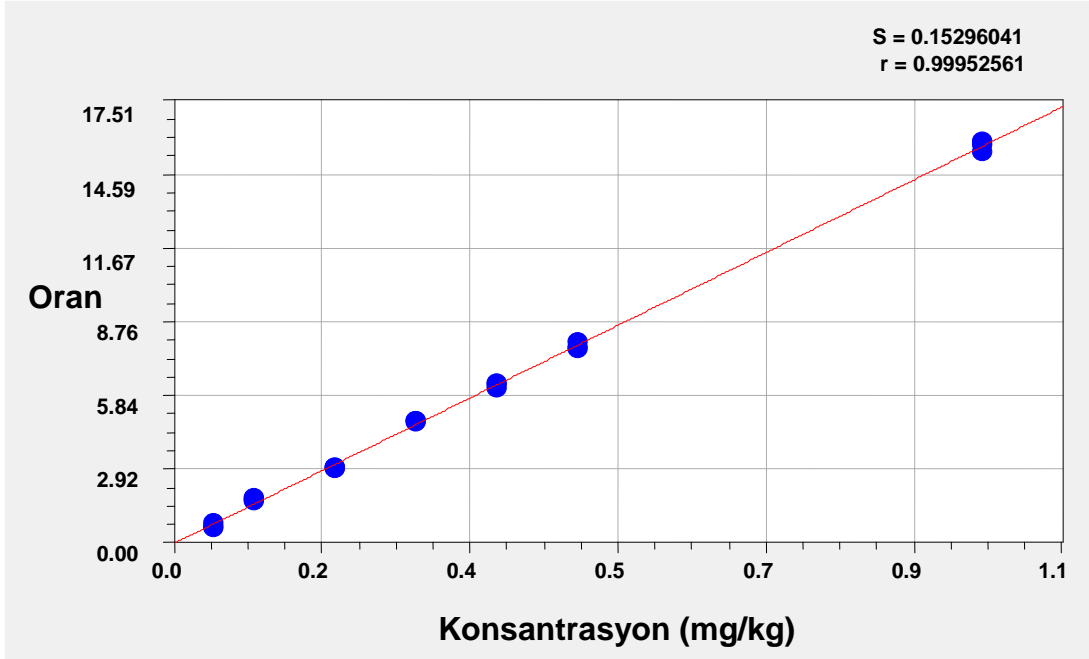
Kantitatif metotlar için analit konsantrasyonu aralığı ya da metodun uygulanabileceği değerlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu değer numunedeki orijinal miktara değil çözeltide gerçekte ölçülen değere tekabül eder. Konsantrasyon aralığının en alt noktasındaki sınırlayıcı faktör minimum tespit sınırı ve/veya hesaplama sınırıdır. Konsantrasyon aralığının üst ucu ise cihazın cevap verme sistemine bağlı olan birçok faktör tarafından belirlenir.

Çalışma aralığı içerisinde lineer cevap aralığı bulunur. Bu aralıkta sinyal cevabı ile analit konsantrasyonu arasında lineer bir ilişki vardır. Bu aralığın kapsamı çalışma aralığı değerlendirilirken belirlenir. Genel olarak doğrusallık en az 6 farklı konsantrasyon dan kontrol gerektirmektedir.

Çalışmamızda doğrusallık çalışması için 5 gram pestisit içermeyen kör ayva ve salatalık numunelerine 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 1,0 µg/ml olacak şekilde amitraz ve bozunma ürünleri (dma, dmf, dmpf) eklenerek kalibrasyon standartları hazırlanmıştır. Yedi farklı konsantrasyonda hazırlanan standartlar GC-MS te 3 er kez okutulduktan sonra konsantrasyona karşı GC-MS te pestisitler için elde edilen alanlar ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar Çizelge 5. 8 ve kalibrasyon eğrileri de Şekil 5.5, Şekil 5.6, Şekil 5.7 ve Şekil 5.8 de verilmişlerdir.

Çizelge 5.8: Kalibrasyon eğrisi verileri.

Derişim mg/kg	DMA (Alan)	DMF (Alan)	DMPF (Alan)	AMİTRAZ (Alan)	İç standart
0,05	179992	265458	10256	104938	220450
0,05	138827	206587	8756	105508	170858
0,05	116206	190651	8088	118050	163182
0,1	268703	372540	16985	317560	177047
0,1	233184	336935	16856	263228	156961
0,1	354480	472560	21018	304134	220450
0,2	667088	861283	38562	490658	218412
0,2	650450	831406	39664	470395	227132
0,2	720450	875450	41025	460021	220450
0,3	1064050	1326164	64055	645635	238964
0,3	1052547	1352172	63598	840920	244463
0,3	1058500	1389582	62245	754638	235450
0,4	1255040	1506154	71594	903145	203295
0,4	1108040	1441253	68547	951394	188382
0,4	1348180	1654570	77985	932022	220450
0,5	1705040	2044206	97586	1285405	220450
0,5	1695040	2124585	99590	1328647	220450
0,5	1896437	2305040	112965	1194711	240848
1	3504070	4479449	217865	2305402	235500
1	3554500	4563562	215950	2426510	237400
1	3611093	4526555	219557	2662591	239500



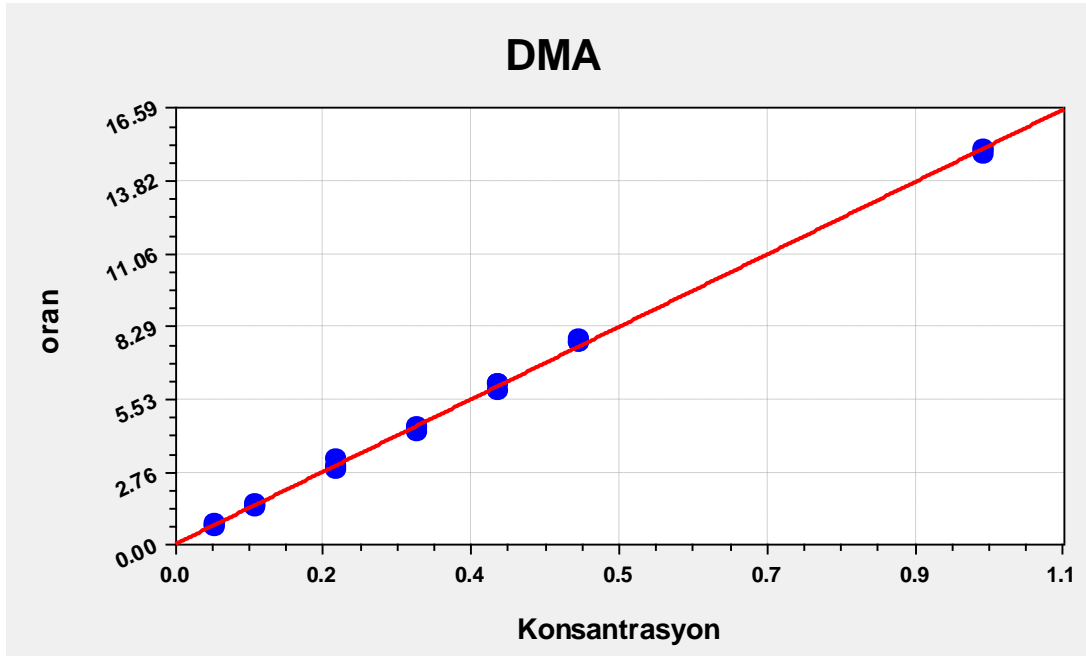
Şekil 5.5: Amitraz a ait kalibrasyon eğrisi.

Doğru: $y=a+bx$

Katsayılar:

a = -0.0030977983

b = 15.708255



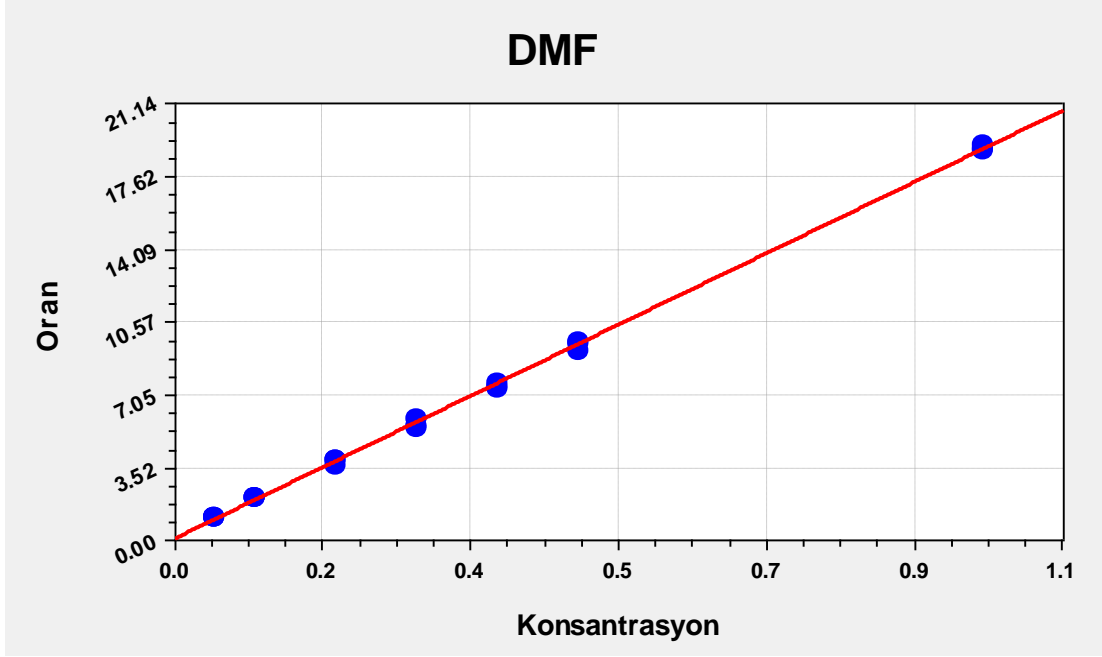
Şekil 5.6: DMA ya ait kalibrasyon eğrisi.

Doğru: $y=a+bx$

Katsayılar:

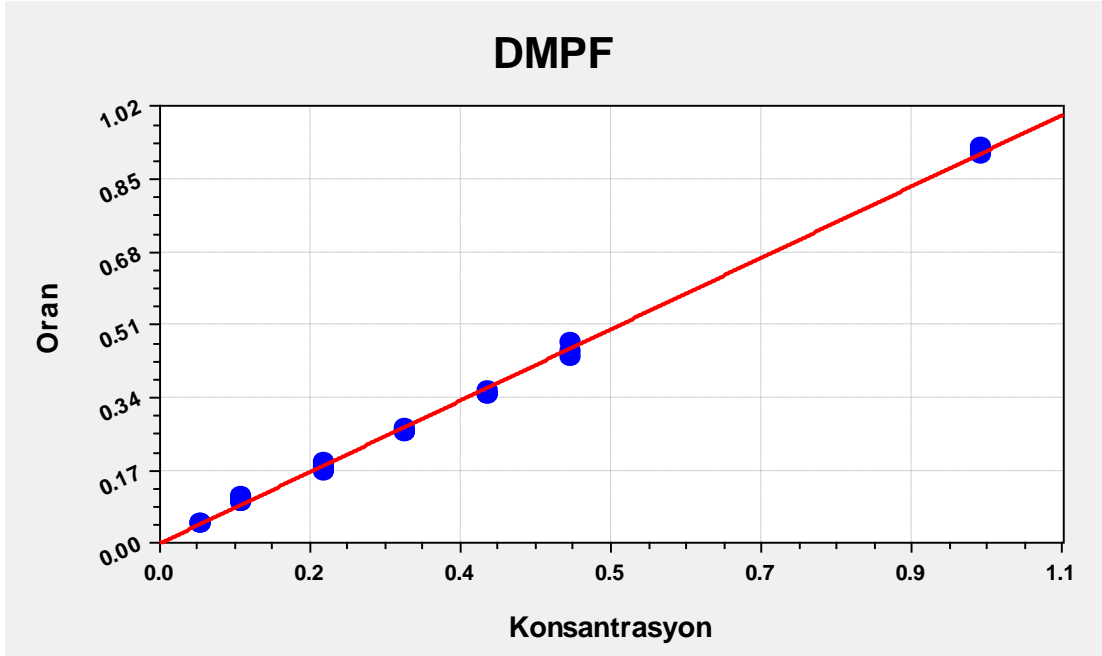
a = 0.045207373

b = 15.00594



Şekil 5.7: DMF'e ait kalibrasyon eğrisi.

Linear Fit: $y=a+bx$
 Katsayılar:
 $a = 0.11951357$
 $b = 18.834079$



Şekil 5.8: DMPF e ait kalibrasyon eğrisi.

Doğru: $y=a+bx$
 katsayılar:
 $a = -0.00069636457$
 $b = 0.91311373$

5.2.2 Tespit sınırı LOD ve LOQ çalışmaları

Ölçüm düşük analit seviyelerinde yani eser analiz yapıldığında metot tarafından güvenilir bir şekilde tespit edilebilen en küçük konsantrasyonun bilinmesi önemlidir. Validasyon çalışmalarında tespit zorlaştığı seviyenin belirlenmesi genel olarak yeterlidir. Hesaplama limiti ise analitin kabul edilebilir tekrarlanabilirlik, kesinlik ve doğruluk ile tespit edilebildiği en düşük seviyedir. Bu amaç için kör + 3S yaklaşımı genellikle yeterlidir. Bu yaklaşımla kör ayva ve salatalık numunelerine 0,1 µg/ml olacak şekilde amitraz ve bozunma ürünlerine ait standartlar ilave edildi ve 6 tekrar çalışma yapılarak GC-MS te okutulmuştur. Elde edilen sonuçların standart sapması hesaplanarak aşağıdaki formüle göre minimum tespit sınırı ve minimum hesaplama limiti hesaplanmıştır. LOD ve LOQ çalışmasına ait veriler Çizelge 5.9 ve 5.10 de verilmiştir.

$$\text{Kör} + 3\text{Sd} = \text{LOD}$$

$$\text{Kör} + 10 \text{ Sd} = \text{LOQ}$$

Çizelge 5.9: Salatalıkta LOD ve LOQ çalışmasına ait veriler.

Tekrar	DMA (µg/kg)	DMF (µg/kg)	DMPF (µg/kg)	AMİTRAZ (µg/ kg)
Tekrar 1	14,0	11,4	13,2	11,8
Tekrar 2	14,7	9,2	13,9	12,5
Tekrar 3	13,0	8,6	14,7	10,9
Tekrar 4	9,3	10,0	11,9	12,6
Tekrar 5	10,6	8,6	10,5	11,2
Tekrar 6	10,2	9,7	10,6	10,6
Ortalama	12,0	9,6	12,5	11,6
SD	2,25	1,06	1,75	0,83
LOD	18,75	12,78	17,75	14,09
LOQ	34,5	20,2	30	19,9

Çizelge 5.10: Ayva da LOD ve LOQ çalışmasına ait veriler.

Tekrar	DMA (µg/kg)	DMF (µg/kg)	DMPF (µg/kg)	AMİTRAZ (µg/ kg)
Tekrar 1	9,6	9,4	9,2	10,3
Tekrar 2	8,9	10,6	10,3	10,6
Tekrar 3	9,3	9,9	9,6	9,4
Tekrar 4	10,5	10,7	10,7	9,3
Tekrar 5	10,8	10,5	9,1	9,7
Tekrar 6	10,4	8,8	9,4	9,2
Ortalama	9,92	10,0	9,72	9,75
SD	0,76	0,76	0,64	0,58
LOD	12,19	12,27	11,65	11,48
LOQ	17,49	17,61	16,15	15,50

5.2.3 Geri kazanım çalışması

Analitik metotlar her zaman numunenin içinde bulunan analitin tamamını ölçmez. Analitler numunenin içersinde analistin hepsiyle ilgilenmediği farklı formlarda bulunuyor olabilir. Metot analitin sadece tek bir formunu tespit edebilecek şekilde tasarlanmış olabilir. Metot mevcut olan tüm formları tespit edecek şekilde tasarlanmasına rağmen farklı bir sebepten dolayı hata oluşabilir. Her koşulda metodun mevcut olan tüm analitlerin tespitindeki etkinliğinin belirlenmesi gereklidir. Ekstraksiyonun etkinliğinin belirlenmesinin bir yolu test numunesine farklı konsantrasyonlar da analit ilave edip daha sonra bu numunelerdeki analit konsantrasyonu ölçülür.

Bu çalışmanın temel problemi analitin numunenin içersinde doğal olarak bulunan analit kadar kuvvetli tutulmamasından kaynaklanan gerçekçi olmayan etkileyici geri kazanım sonuçları vermesidir. Bun rağmen bu metot geri kazanım etkinliğini ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemdir ve bu iş için kabul görmüş bir yöntemdir. Fakat yöntemin eksikliği her zaman akılda tutulmalıdır. Alternatif olarak geri kazanım çalışması eğer uygun malzeme bulunabiliyorsa referans malzeme ile gerçekleştirilebilir. Bu sentetik malzemeye dışarıdan standart ilave etmek yerine numune içersinde doğal olarak bulunan analitin çalışılmasına olanak sağladığından geri kazanım çalışması analitin ekstraksiyonunu kesin olarak gösterir.

Tez çalışmamızda amitraz ve bozunma ürünleri için piyasada referans malzeme bulunamadığı için geri kazanım değerini belirlemek için içersinde pestisit olmayan ayva ve salatalık numunelerine iki farklı konsantrasyonda standart ilave edilerek geri kazanım değeri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.11, 5.12, 5.13 ve 5.14 de verilmişlerdir.

Çizelge 5.11: Salatalıkta düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (%)	DMF (%)	DMPF (%)	AMİTRAZ (%)
Tekrar 1	108	114	114	108
Tekrar 2	115	92	110	97
Tekrar 3	113	86	113	105
Tekrar 4	93	100	119	109
Tekrar 5	106	89	98	104
Tekrar 6	102	97	106	102
Ortalama	106	96	110	104

Çizelge 5.12: Salatalıkta yüksek konsantrasyonda geri kazanım çalışması.

Tekrar	DMA (%)	DMF (%)	DMPF (%)	AMİTRAZ (%)
Tekrar 1	115	101	108	99
Tekrar 2	111	108	109	106
Tekrar 3	101	104	106	104
Tekrar 4	101	97	113	101
Tekrar 5	97	110	110	95
Tekrar 6	107	99	103	108
Ortalama	105	103	108	102

Çizelge 5.13: Ayva da düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (%)	DMF (%)	DMPF (%)	AMİTRAZ (%)
Tekrar 1	94	97	102	101
Tekrar 2	98	104	89	95
Tekrar 3	89	89	95	97
Tekrar 4	103	95	91	93
Tekrar 5	96	97	96	89
Tekrar 6	98	96	96	88
Ortalama	96	96	95	94

Çizelge 5.14: Ayva da düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (%)	DMF (%)	DMPF (%)	AMİTRAZ (%)
Tekrar 1	104	95	104	106
Tekrar 2	96	92	106	102
Tekrar 3	93	93	107	94
Tekrar 4	96	105	99	103
Tekrar 5	91	103	96	95
Tekrar 6	99	99	95	96
Ortalama	97	98	101	99

5.2.4 Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik

Kesinlik normal de çalışmanın belirli bir çerçevede gösterebileceği en geniş değişiklik alanında gerçekleştirilir. En yaygın kesinlik ölçütleri “tekrar edilebilirlik” ve “tekrar üretilebilirlik” dir. Bunlar kesinliğin elde edilebilecek en uç ölçümlerini gösterir. Tekrar edilebilirlik (umulan en küçük kesinlik) metodun tek bir analist tarafından aynı cihazda kısa zaman aralığında gerçekleştirildiği zaman ki değişkenliği hakkında fikir verir. Örneğin bir numunenin iki paralel olarak çalışıldı zaman sonuçlar arasındaki değişkenlik gibi. Eğer numune karşılaştırma amaçlı olarak

bir çok laboratuvar tarafından analiz ediliyorsa daha anlamlı kesinlik ölçümü “tekrar üretilebilirlik” (bu normalde karşılaşılan en büyük kesinlik ölçütü olmasına rağmen zamana göre olan değişimi kapsamaz) bu örneğin farklı analistler tarafından geniş bir zaman aralığında aynı laboratuvarda yapılan analizler arasındaki kesinliğin ölçümüdür.

Kesinlik genellikle standart sapma ya da göreceli standart sapma olarak ifade edilir. Tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirliğin her ikisi de konsantrasyona bağlıdır ve dolayısıyla birkaç tane farklı konsantrasyon için belirlenmeli ve eğer ilişkili ise analit konsantrasyonu ile kesinlik arasındaki ilişki belirlenmelidir. Göreceli standart sapma daha kullanışlı olabilir çünkü konsantrasyondan bağımsız hale getirilir ve geniş bir aralık için sabit kalır.

Tez çalışmamızda tekrar edilebilirlik çalışması için pestisit içermeyen ayva ve salatalık numunelerine amitraz ve bozunma ürünlerine standart ilave ederek 10 tekrar olarak analiz edildikten sonra standart sapma ve göreceli standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.15 ve 5.16 de verilmiştir.

Çizelge 5.15: Salatalıkta tekraredilebilirlik çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (ug/kg)	DMF (ug/kg)	DMPF(ug/kg)	Amitraz(ug/kg)
Tekrar 1. Gün 1	162	153	160	162
Tekrar 1. Gün 2	159	160	156	155
Tekrar 1. Gün 3	152	159	163	159
Tekrar 1. Gün 4	151	145	157	160
Tekrar 1. Gün 5	146	158	161	149
Tekrar 1. Gün 6	161	149	154	146
Tekrar 2. Gün 1	155	152	152	150
Tekrar 2. Gün 2	154	148	155	147
Tekrar 3. Gün 1	148	145	147	152
Tekrar 3. Gün 2	151	151	146	148
Ortalama	154	152	155	153
SD	5,38	5,52	5,63	5,83

Çizelge 5.16: Ayvada tekraredilebilirlik çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (ug/kg)	DMF (ug/kg)	DMPF(ug/kg)	Amitraz(ug/kg)
Tekrar 1. Gün 1	156	155	163	152
Tekrar 1. Gün 2	159	158	162	153
Tekrar 1. Gün 3	163	150	158	158
Tekrar 1. Gün 4	170	163	166	156
Tekrar 1. Gün 5	159	160	158	160
Tekrar 1. Gün 6	153	161	156	162
Tekrar 2. Gün 1	152	153	152	166
Tekrar 2. Gün 2	154	151	154	162
Tekrar 3. Gün 1	158	154	156	165
Tekrar 3. Gün 2	159	154	155	166
Ortalama	158,3	155,9	158	160
SD	5,29	4,38	4,40	5,14

5.2.5 Doğruluk çalışması

“Doğruluk” bir sonucun doğru değere olan yakınlığını ifade eder. Metot validasyonu sonuçların muhtemel doğruluğunu sonuçlar üzerindeki sistematik ve rastgele etkileri değerlendirerek belirlemeye çalışır. Dolayısıyla doğruluk normal olarak iki bileşen olarak çalışılır: “doğruluk” ve “kesinlik”. Bir metodun doğruluğu bir set sonucun ortalamasının doğru değere ne kadar yakın olduğunun ifadesidir. Doğruluk bias olarak ifade edilir. Kesinlik sonuçlardan birinin diğerine olan yakınlığının ölçümüdür ve genellikle sonuçların dağılımını tarif eden standart sapma ölçümü ile ifade edilir.

Doğruluğun pratikteki değerlendirmesi metottan elde edilen bir set sonucun ortalamasının bilinen değerle karşılaştırılmasına dayanır, yani, doğruluk referans bir değere (örneğin doğru değer ya da geleneksel doğru değer) karşı değerlendirilir. İki temel yöntem mevcuttur: karakteristik bir malzeme için ya da farklı bir karakteristik metottan referans değere karşı değerlendirme.

Referans malzeme kullanarak doğruluğu belirlemek için bir dizi tekrar analizin ortalamasını ve standart sapması hesaplanır ve referans malzemenin karakteristik değeri ile karşılaştırılır.

Alternatif metoda karşı değerlendirmede ise aynı numune ya da numunelerin farklı metotlarla elde edilmiş sonuçları karşılaştırılır. Numuneler CRM, işletme içi standartlar, ya da sadece normal numuneler olabilir.

Çalışmamızda metodun doğruluğu pestisit içermeyen ayva ve salatalık numunelerine amitraz ve bozynnma ürünlerine ait standartlar ilave edildikten sonra gerçekleştirilen analiz sonuçlarından aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Doğruluk çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 5.17 de verilmiştir.

$$\text{Bağlı Hata (\%)} = \frac{(\text{Bulunan miktarların ortalaması} - \text{Eklenen miktar})}{\text{Eklenen miktar}} \times 100 \quad (4.1)$$

Çizelge 5.17: Doğruluk çalışması sonuçları.

Tekrar	DMA (ng/ml)	DMF (ng/ml)	DMPF (ng/ml)
Tekrar 1	12,0	-4,1	15,5

5.3 Belirsizlik Bütçesinin Hesaplanması

Metot validasyonu çalışmaları tamamlandıktan sonra elde edilen sonuçlar ile her bir analit için belirsizlik bütçesi hesaplanmıştır.

5.3.1 Belirsizlik bileşenlerinin hesaplanması

5.3.1.1 Standart hazırlamadan gelen belirsizlik

Toz ve çözelti halinde temin edilen standartlardan çalışma standartları hazırlandı. Çalışma standartları hazırlanırken 100µl'lik mikro pipet, 1000µl 'lik mikropipet kullanıldı. Buna göre standart hazırlamadan gelen hacim belirsizliği aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

Hacimden gelen belirsizlik

100 µl pipet için belirsizlik hesabı

Tekrarlanabilirlik: 0,1 ml pipet için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.002 ml olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde ±0,006ml olarak verilmiştir. Normal dağılıma göre $0,006/2=0.003$ ml olarak hesaplanmıştır.

Sıcaklık: Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genleşme kat sayısı $2.1 \times 10^{-4} /^{\circ}\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikkörtgen dağılıma göre

$$(0,1 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0,0001 \text{ ml bulunmuştur.}$$

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği hesaplanmıştır.

$$U_{(v0,1ml)} = \sqrt{(0,002)^2 + (0,003)^2 + (0,0001)^2 * 2} = 0,0036 \quad (5.1)$$

1,0 ml'lik mikropipet için belirsizlik hesabı

Tekrarlanabilirlik: 1,0ml pipet için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.01 ml olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde $\pm 0,009$ ml olarak verilmiştir. Normal dağılımla $0,031/2=0,0155$ ml olarak hesaplanır.

Sıcaklık: Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genişleme katsayısı $2.1 \times 10^{-4} /^{\circ}\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikdörtgen dağılıma göre

$$(1,0 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0,0006 \text{ ml bulunur.}$$

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği hesaplanmıştır.

$$U_{(H,0ml)} = \sqrt{(0,01)^2 + (0,0155)^2 + (0,0006)^2} = 0,0185 \quad (5.2)$$

10 ml lik balon joje için belirsizlik hesabı

Tekrarlanabilirlik: 10 ml pipet için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.0012 ml olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde $\pm 0,025$ ml olarak verilmiştir. Normal dağılımla $0,025/2=0,0125$ ml olarak hesaplanmıştır.

Sıcaklık: Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genişleme katsayısı $2.1 \times 10^{-4} /^{\circ}\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikdörtgen dağılıma göre

$$(1,0 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0,0006 \text{ ml bulunmuştur.}$$

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği hesaplanmıştır

$$U_{(H,ml)} = \sqrt{(0,0012)^2 + (0,0125)^2 + (0,0006)^2} = 0,0126 \quad (5.3)$$

Standart hazırlamada her bir bileşen için belirsizlik değerleri hesaplandıktan sonra standart hazırlamadan gelen toplam belirsizlik hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.18 de verilmiştir.

Çizelge 5.18: Standart hazırlamadan gelen belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağıl Standart Belirsizlik
0,1 ml pipet	0,1	0,0036	0,036
1,0 ml pipet	1,0	0,0185	0,0185
10 ml balon joje	10	0,0126	0,00126
Toplam Belirsizlik			0,0404

5.3.1.2 Örnek hazırlamadan gelen belirsizlik

Örnek hazırlama işleminden kaynaklanan belirsizlik bileşenleri için belirsizlik değerleri hesaplanmıştır.

Tartımdan Gelen Belirsizlik

Kalibrasyon Terazi kalibrasyon sertifikasında belirtilen değer $\pm 0,0003$ g dır.

Standart belirsizlik $0,0003/2 = 0,00015$ g ve tartım farktan hesaplandığı için iki kere hesaba katılmalıdır.

$$u(\tau) = \sqrt{2(0.00015^2)} = 0.0002 \quad (5.4)$$

Örnek Hazırlamada Hacimden Gelen Belirsizlik

100 µl pipet için Belirsizlik Hesabı

Tekrarlanabilirlik: 0,1 ml pipet için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.002 ml olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde $\pm 0,006$ ml olarak verilmiştir. Normal dağılıma göre $0,006/2=0.003$ ml olarak hesaplanmıştır.

Sıcaklık: Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^\circ\text{C}$ olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genleşme kat sayısı $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikedörtgen dağılıma göre

$(0,1 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0,0001$ ml bulunmuştur.

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği hesaplanmıştır.

$$U_{(v0,1ml)} = \sqrt{(0,002)^2 + (0,003)^2 + (0,0001)^2 * 2} = 0,0036 \quad (5.5)$$

1,0 ml'lik mikropipet için belirsizlik hesabı

Tekrarlanabilirlik: 1,0ml pipet için yapılan bir seri doldur-boşalt test sonucu tekrarlanabilirlik standart sapma olarak 0.01 ml olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon: Kalibrasyon sertifika değeri % 95 güvenilirlik düzeyinde $\pm 0,009$ ml olarak verilmiştir. Normal dağılımla $0,031/2=0,0155$ ml olarak hesaplanır.

Sıcaklık : Laboratuvardaki sıcaklık değişimi $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak verilmiştir. Sıcaklıkla suyun hacimsel genişleme katsayısı $2.1 \times 10^{-4} /^{\circ}\text{C}$ dir. Standart belirsizlik dikdörtgen dağılıma göre

$$(1,0 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5) / \sqrt{3} = 0,0006 \text{ ml bulunur.}$$

Bu belirsizlik bileşenleri birleştirilerek toplam hacim belirsizliği hesaplanmıştır.

Sonuçlar Çizelge 5.19 da verilmiştir.

(5.6)

$$U_{(H,0ml)} = \sqrt{(0,01)^2 + (0,0155)^2 + (0,0006)^2} = 0,0185$$

Çizelge 5.19: Örnek hazırlamadan gelen belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağıl Standart Belirsizlik
Tartım(g)	5	0,0002	0,00004
1 ml pipet	1	0,0185	0,0185
0,1 ml pipet	0,1	0,0036	0,036
Toplam Belirsizlik			0,036

5.3.1.3 Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik

Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$U(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad (5.7)$$

- S : Kalıntisal Standart Sapma
- B_1 : Eğim
- p : Örnek ölçümü için okuma sayısı
- n : Kalibrasyon için yapılan ölçüm sayısı
- c_0 : Tayin edilen çözelti derişimi
- \bar{c} : farklı kalibrasyon standartlarının ortalaması
- S_{xx} : Aşağıdaki formüle göre hesaplanır.
- c_i : Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan ölçüm sonucu

Denklemden yer alan S_{xx} bileşeni denklem 5.8 e göre hesaplanmıştır.

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad (5.8)$$

Hesaplama sonucunda her bir analit için kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik sonuçları Çizelge 5.20 de verilmiştir.

Çizelge 5.20: Kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik sonuçları

Bileşen	DMA	DMF	DMPF	Amitraz
S	0,14	0,16	0,011	0,153
B ₁	15,01	18,83	0,913	15,71
p	3	3	3	3
n	18	18	18	18
C ₀	0,50	0,50	0,5	0,5
C	0,36	0,36	0,364	0,36
S _{xx}	1,87	1,87	1,872	1,87
Belirsizlik	0,0060	0,0055	0,0077	0,0061

5.3.1.4 Birleşik belirsizliğin hesaplanması

Belirsizlik bütçesine katkı yapan her bir birleşen hesaplandıktan sonra her bir analit için birleşik belirsizlik değerleri bileşenlerin karelerinin toplamının karekökü alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.21, 5.22, 5.23, 5.24 te verilmiştir.

Çizelge 5.21: Amitraz için birleşik belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağlı Standart Belirsizlik
Standart Hazırlama	-	-	0,0404
Örnek Hazırlama	-	-	0,036
Kalibrasyon	0,5	0,0061	0,0122
Tekraredebilirlik	-	-	0,0321
Geri kazanım			0,0382
Toplam Belirsizlik			0,074

Çizelge 5.22: DMA için birleşik belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağlı Standart Belirsizlik
Standart Hazırlama	-	-	0,0404
Örnek Hazırlama	-	-	0,036
Kalibrasyon	0,5	0,0060	0,012
Tekraredebilirlik	-	-	0,033
Geri kazanım			0,047
Toplam Belirsizlik			0,080

Çizelge 5.23: DMF için birleşik belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağlı standart Belirsizlik
Standart Hazırlama	-	-	0,0404
Örnek Hazırlama	-	-	0,036
Kalibrasyon	0,5	0,0055	0,011
Tekraredebilirlik	-	-	0,028
Geri kazanım	-	-	0,05
Toplam Belirsizlik	-	-	0,079

Çizelge 5.24: DMPF için birleşik belirsizlik sonuçları

Bileşen	Değer	Standart Belirsizlik	Bağlı Standart Belirsizlik
Standart Hazırlama	-	-	0,0404
Örnek Hazırlama	-	-	0,036
Kalibrasyon	0,5	0,0077	0,0154
Tekraredebilirlik	-	-	0,028
Geri kazanım	-	-	0,043
Toplam Belirsizlik	-	-	0,076

Analiz sonuçları raporlanacağı zaman genişletilmiş belirsizlik değeri kullanılır. % 95 güven aralığı için K değeri 2 ye eşittir. Raporlama için örnek analiz sonucu 100 µg/kg için hesaplanarak Çizelge 5.25 de verilmiştir.

Çizelge 5.25: 100 µg/kg için hesaplanmış örnek analiz sonucu

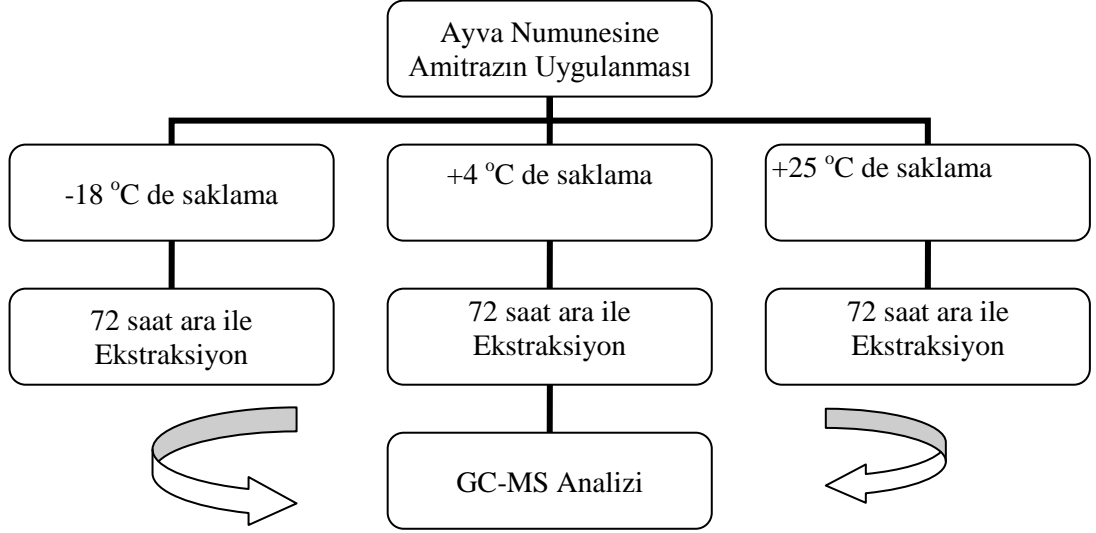
Analit	Bağlı Standart Belirsizlik	Genişletilmiş Belirsizlik	100 µg/kg için Analiz sonucu
DMA	0,080	0,16	100±16 µg/kg
DMF	0,079	0,158	100±16 µg/kg
DMPF	0,076	0,152	100±15 µg/kg
Amitraz	0,074	0,148	100±15 µg/kg

5.4 Amitrazın Kararlılığının İncelenmesi

Amitrazın farklı çözücülerdeki kararlılığı daha önceden yapılan çalışmalarda yer aldığı için bu çalışmada amitrazın numune ortamındaki kararlılığı incelendi.

5.4.1 Amitrazın ayvadaki kararlılığı

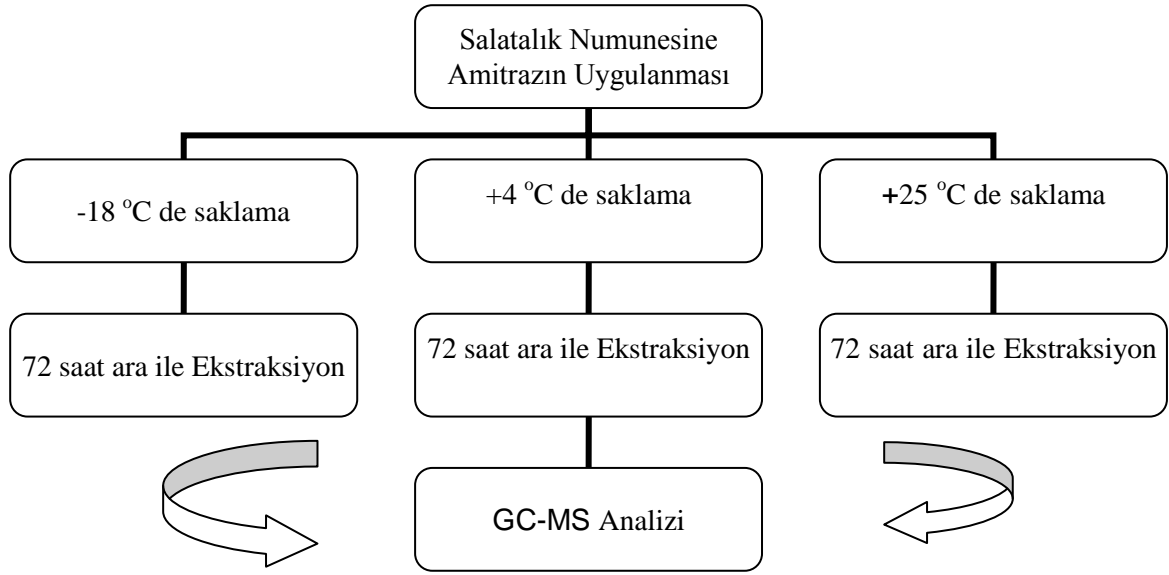
Amitraz uygulanan ayva numuneleri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta bekletilerek bozunmaları incelenmiştir. Bu amaçla düzenli aralıklarla numuneler alınarak amitraz ve bozunma ürünleri ayvadan ekstrakte edilerek GC-MS te analiz edilmiştir. Bu şekilde amitrazın ayvadaki kararlılığı ve bozunmaya sıcaklığın etkisi belirlenmiştir. İşlem basamakları Şekil 5.9 da verilmiştir.



Şekil 5.9: Ayvadaki bozunma çalışmaları akış şeması.

5.4.2 Amitrazın salatalıktaki kararlılığı

Amitraz uygulanan salatalık numuneleri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta bekletilerek bozunmaları incelenmiştir. Bu amaçla düzenli aralıklarla numuneler alınarak amitraz ve bozunma ürünleri salatalıktan ekstrakte edilerek GC-MS te analiz edilmiştir. Bu şekilde amitrazın salatalıktaki kararlılığı ve bozunmaya sıcaklığın etkisi belirlenmiştir. İşlem basamakları şekil 5.10 da verilmiştir.

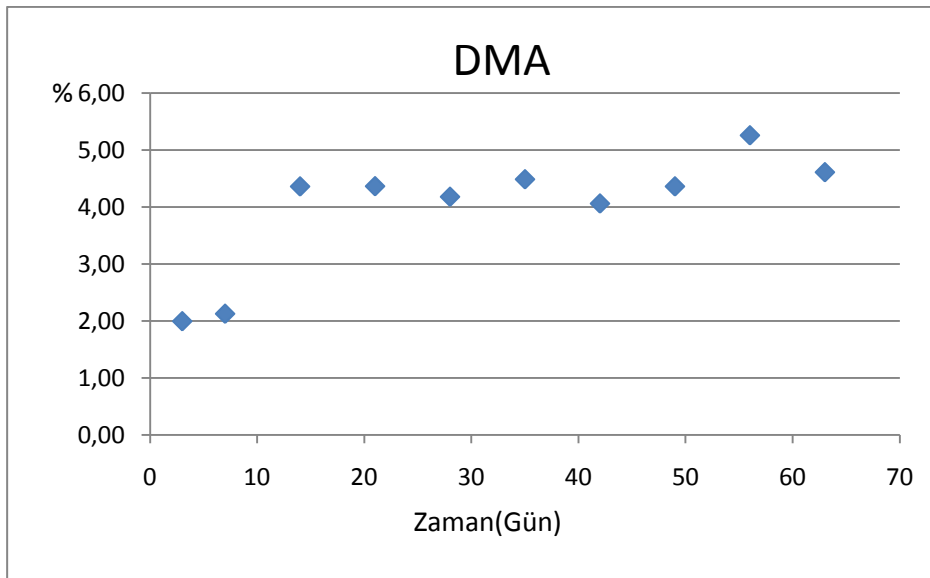


Şekil 5.10: Salatalıktaki bozunma çalışmaları.

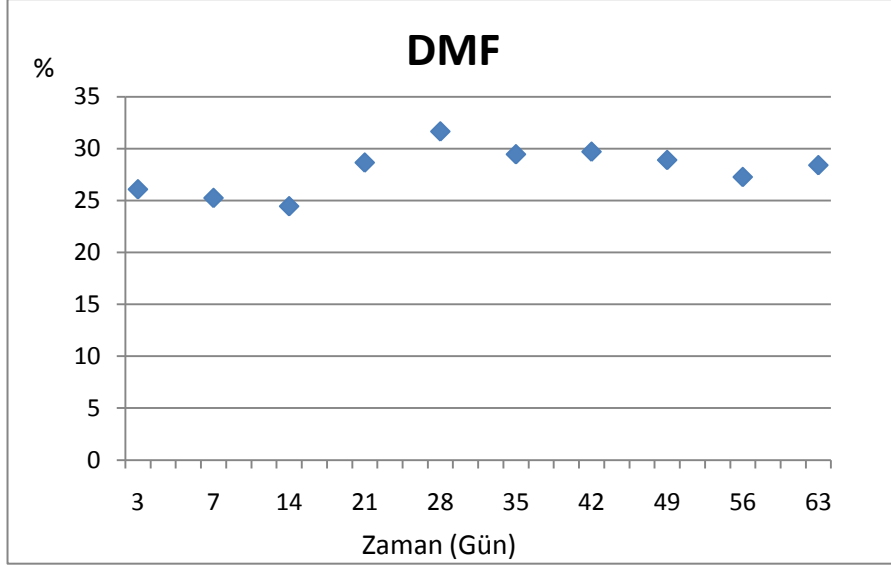
5.5 Amitrazın Ayvadaki Bozunma Sonuçları

5.5.1 -18 °C deki bozunma sonuçları

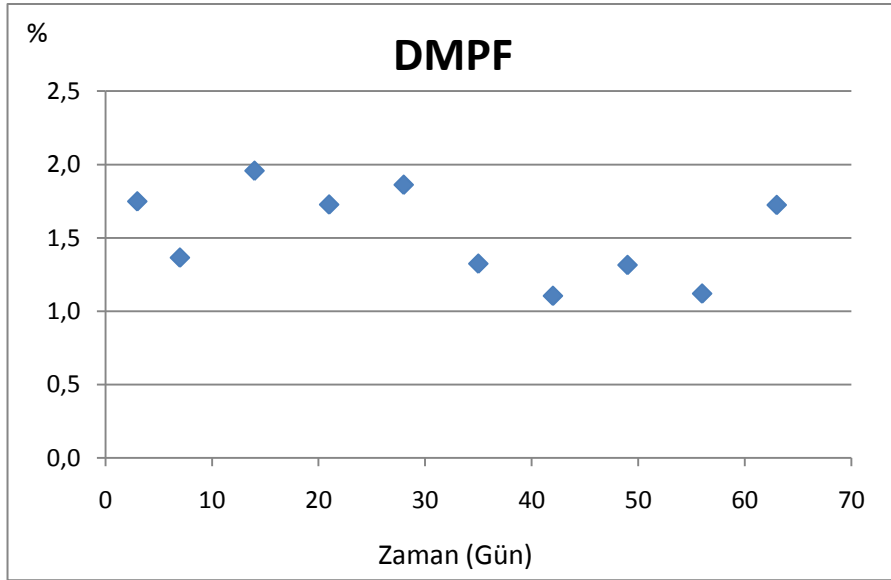
5 ug/ml amitraz ilave edilen ayva numuneleri -18 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma miktarı ve bozunma ürünlerinin oluşum miktarlarına ait sonuçlar Şekil 5.11, Şekil 5.12, Şekil 5.13 de verilmiştir.



Şekil 5.11: -18 °C de DMA nın oluşma grafiği.



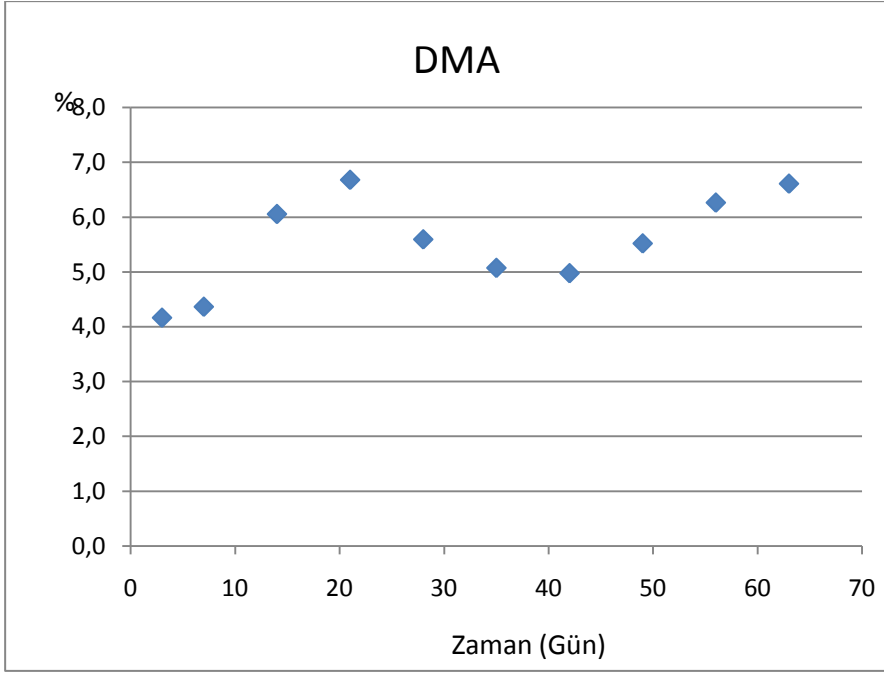
Şekil 5.12: -18 °C de DMF in oluşma grafiği.



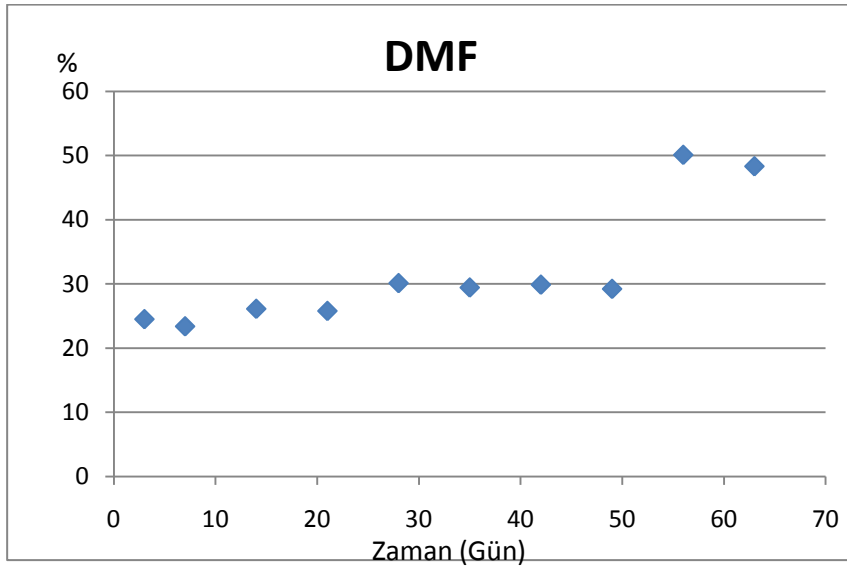
Şekil 5.13: -18 °C de DMPF in oluşma grafiği.

5.5.2 +4 °C deki bozunma sonuçları

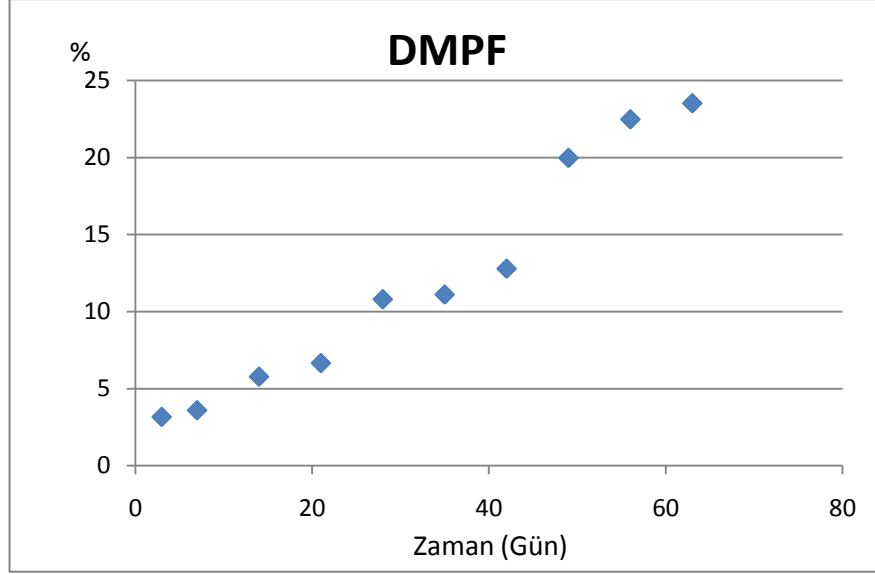
5 ug/ml amitraz ilave edilen ayva numuneleri +4 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma miktarı ve bozunma ürünlerinin oluşum miktarlarına ait sonuçlar Şekil 5.14, Şekil 5.15, Şekil 5.16 da verilmiştir.



Şekil 5.14: +4 °C de DMA nın oluşma grafiği.



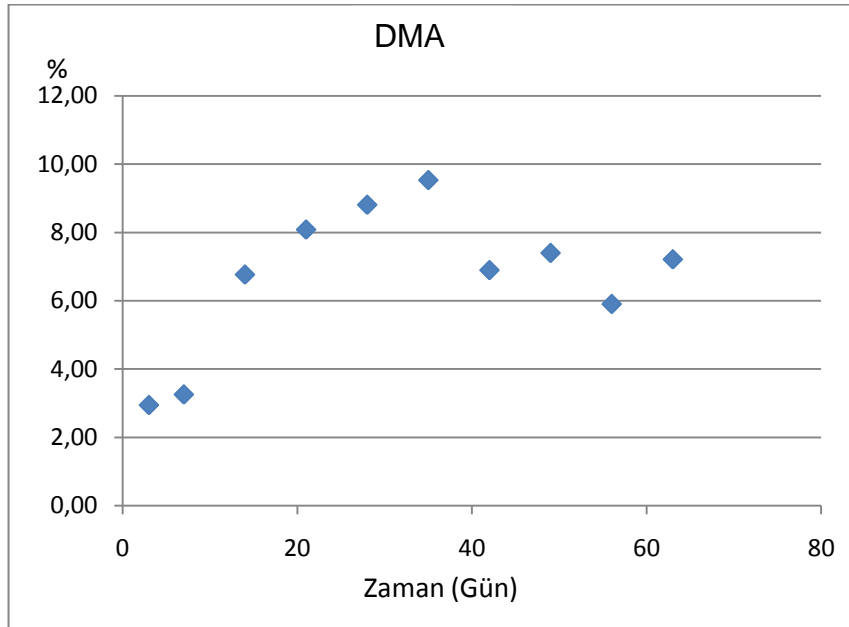
Şekil 5.15: +4 °C de DMF nın oluşma grafiği.



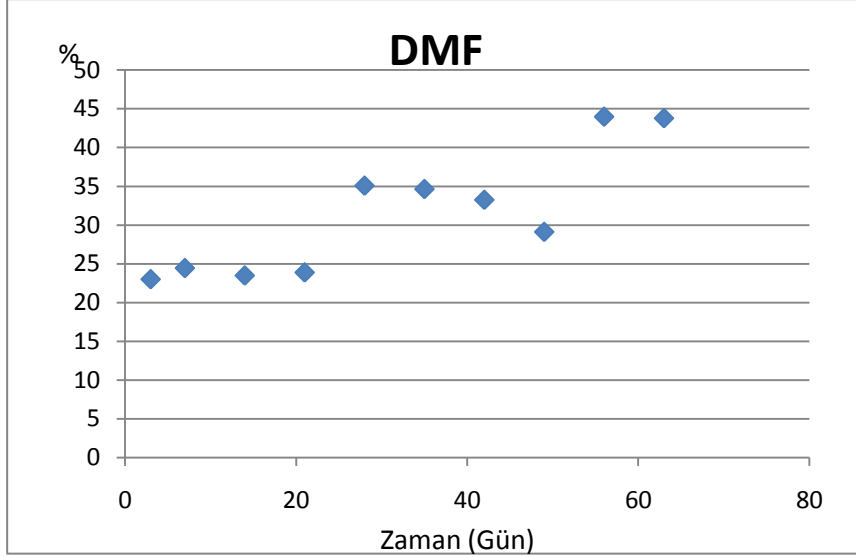
Şekil 5.16: +4 °C de DMPF in oluşma grafiği.

5.5.3 +25 °C deki bozunma sonuçları

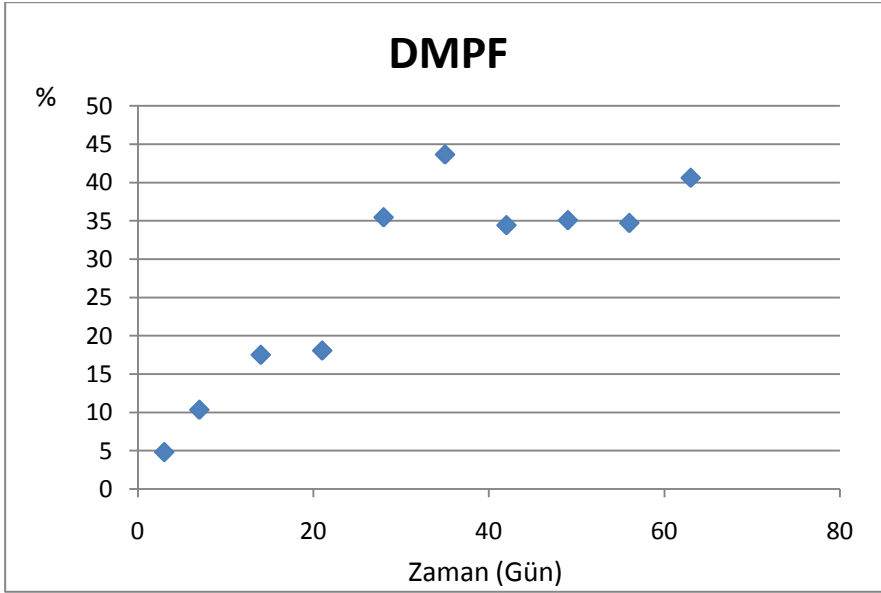
5 ug/ml amitraz ilave edilen ayva numuneleri +25 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma miktarı ve bozunma ürünlerinin oluşum miktarları Şekil 5.17, Şekil 5.18, Şekil 5.19 da verilmiştir.



Şekil 5.17: +25 °C de DMA nın oluşma grafiği.



Şekil 5.18: +25 °C de DMF in oluşma grafiği.

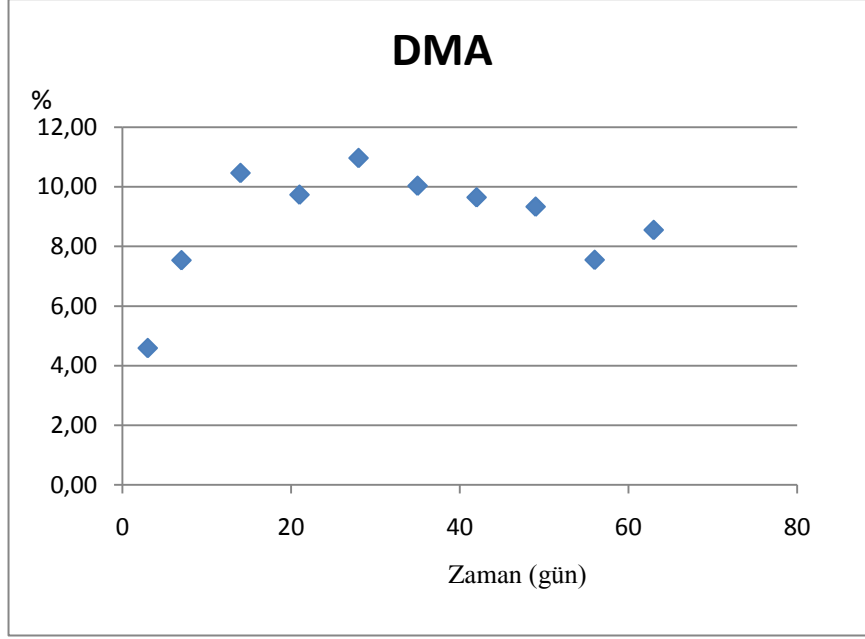


Şekil 5.19: +25 °C de DMPF in oluşma grafiği.

5.6 Amitrazın Salatalıktaki Bozunma Sonuçları

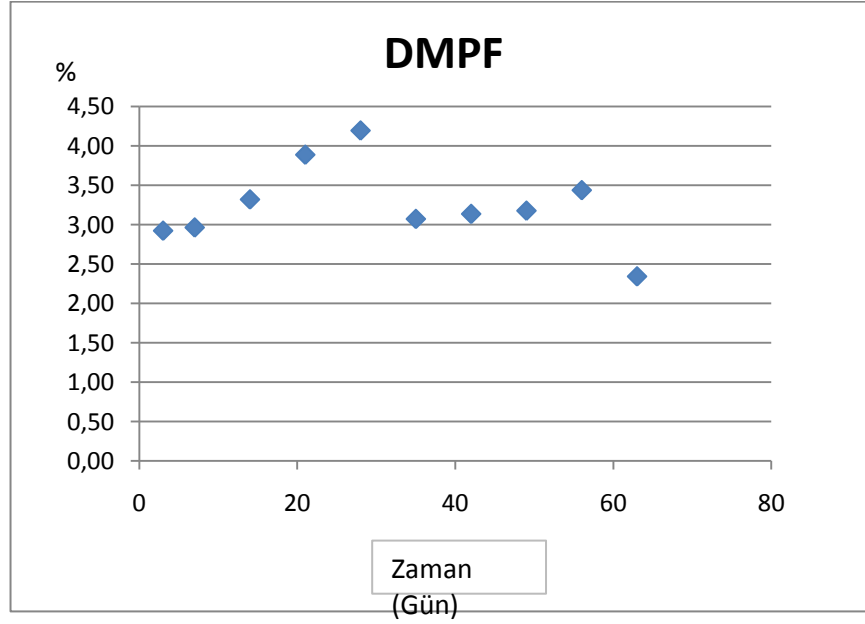
5.6.1 -18 °C deki bozunma sonuçları

5 ug/ml amitraz ilave edilen salatalık numuneleri -18 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma ürünlerinin oluşum miktarları Şekil 5.20, Şekil 5.21, Şekil 5.22 de verilmiştir.



Şekil 5.20: -18 °C de DMA nın oluşma grafiği.

Şekil 5.21: -18 °C de DMF in oluşma grafiği.

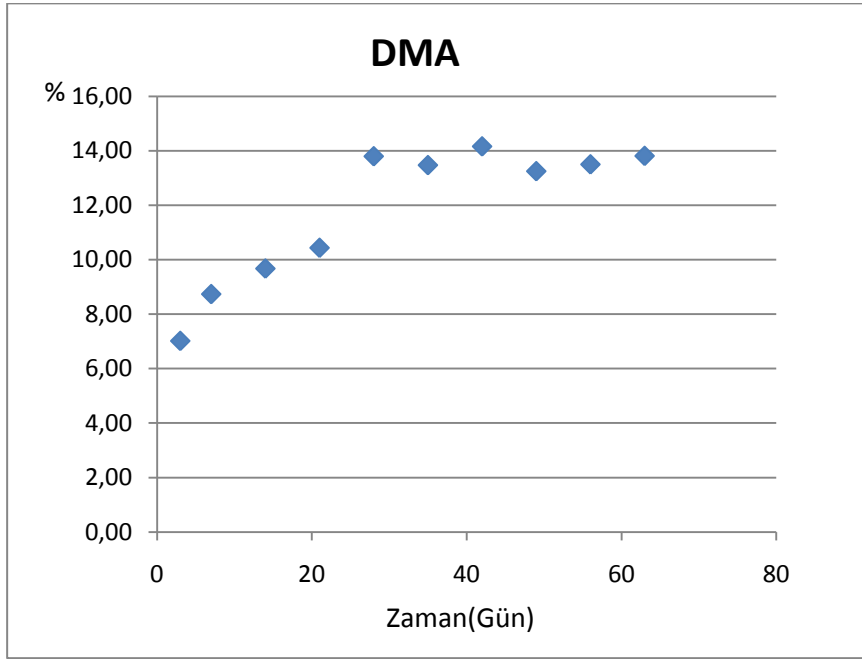


Şekil 5.22: -18 °C de DMPF in oluşma grafiği.

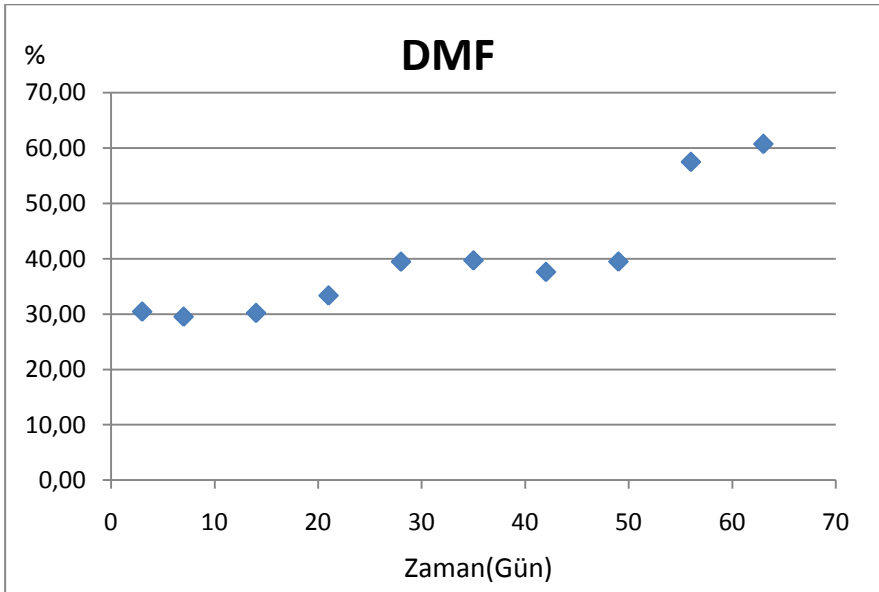
5.6.2 +4 °C deki bozunma sonuçları

5 ug/ml amitraz ilave edilen salatalık numuneleri +4 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma miktarı ve bozunma ürünlerinin oluşum miktarlarına ait sonuçlar Şekil 5.24, Şekil 5.25, Şekil

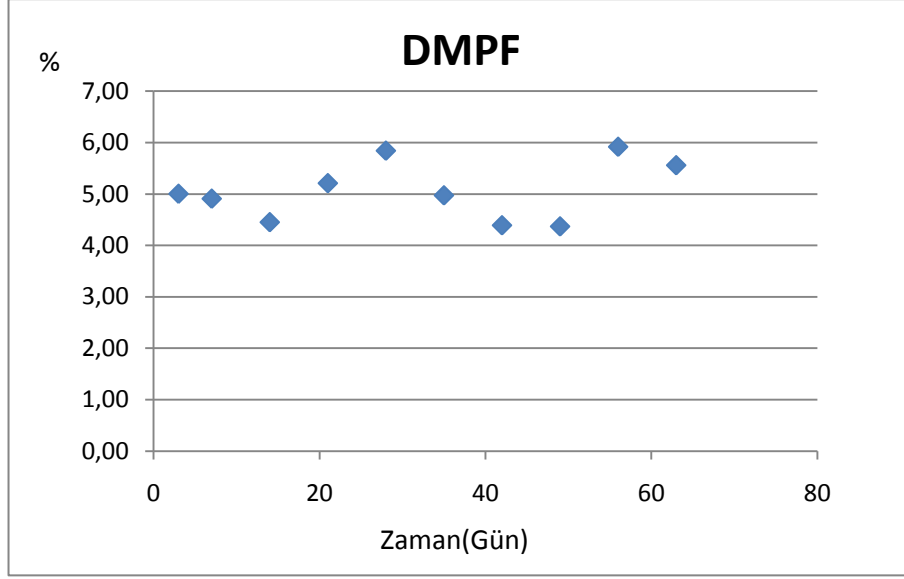
5.26 da verilmiştir.



Şekil 5.23: +4 °C de DMA in oluşma grafiği.



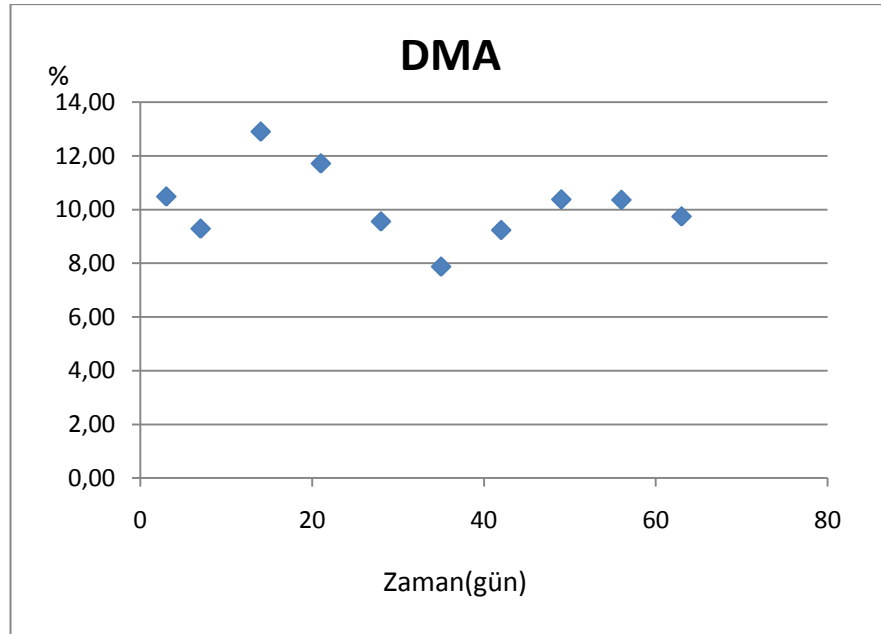
Şekil 5.24: +4 °C de DMF in oluşma grafiği.



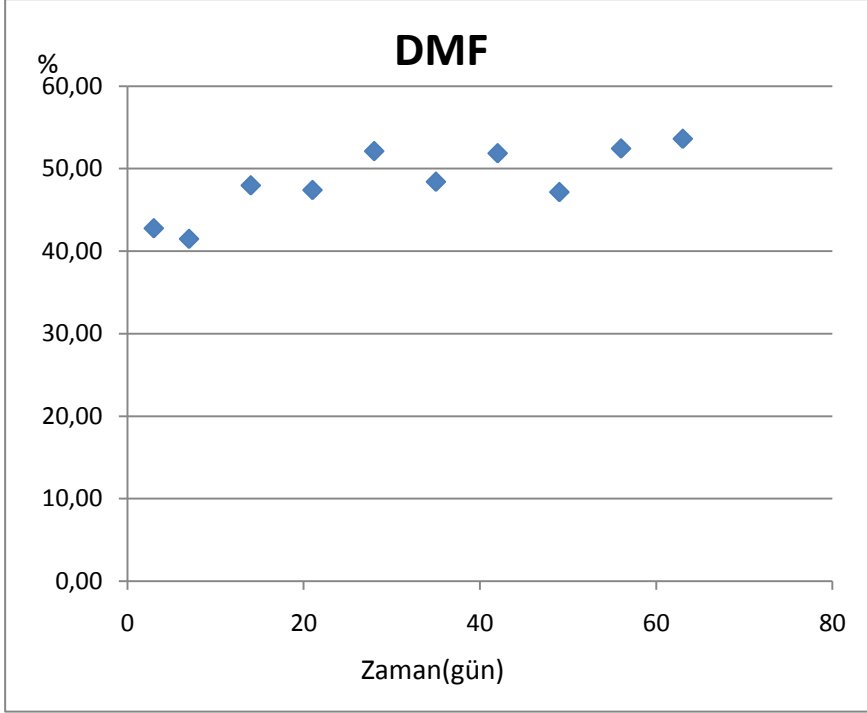
Şekil 5.25: +4 °C de DMPF in oluşma grafiği.

5.6.3 +25 °C deki bozunma sonuçları

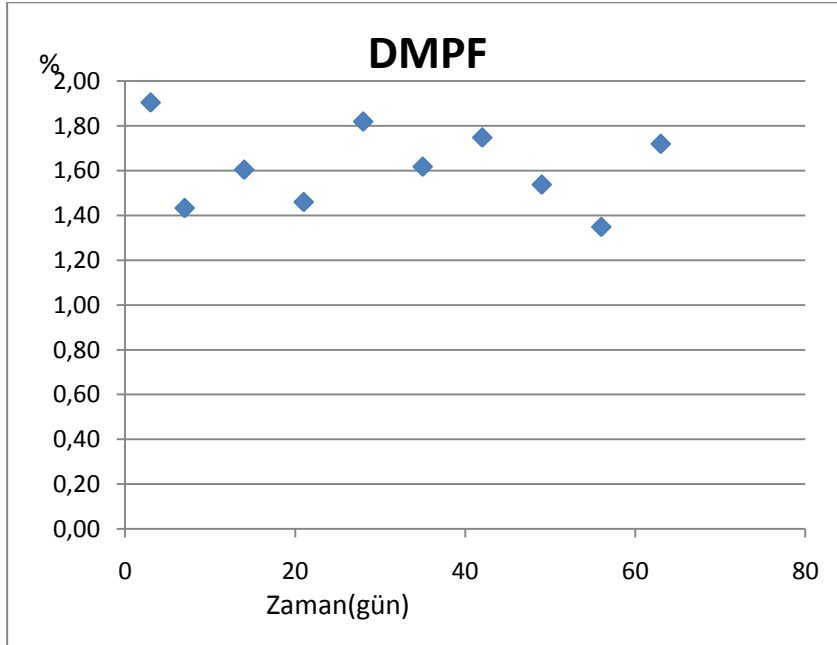
5 ug/ml amitraz ilave edilen salatalık numuneleri +25 °C de bekletilerek 72 saat ara ile daha sonra 7 günlük ara ile izlenmişlerdir. Bu süreçte amitrazın bozunma miktarı ve bozunma ürünlerinin oluşum miktarlarına ait sonuçlar Şekil 5.27, Şekil 5.28, Şekil 5.28, Şekil 5.29 da verilmiştir.



Şekil 5.26: +25 °C de DMA in oluşma grafiği.



Şekil 5.27: +25 °C de DMF in oluşma grafiği.



Şekil 5.28: +25 °C de DMPF in oluşma grafiği.

5.7 Değerlendirme

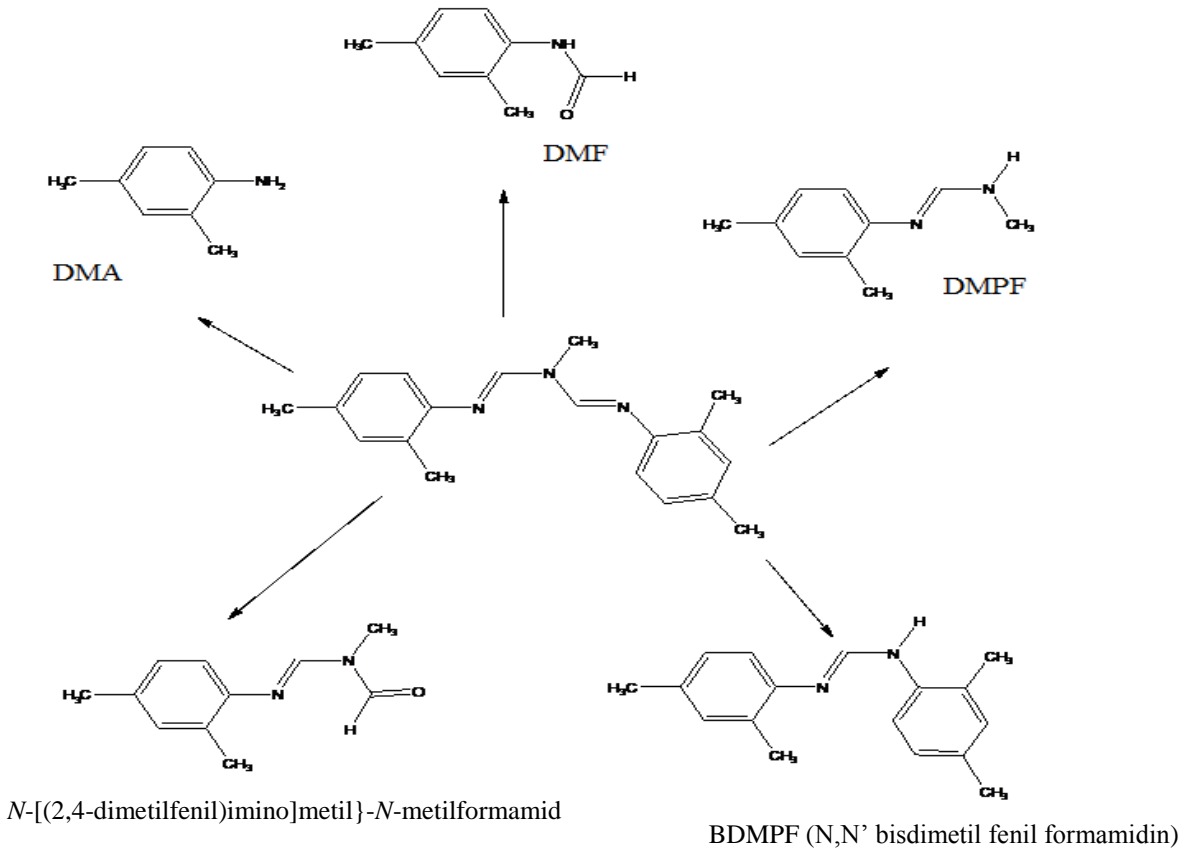
Çalışmamızda amitrazın salatalık ve ayvada 3 farklı sıcaklıkta kararlılığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar amitrazın her iki üründe ve her üç sıcaklıkta hızlı bir şekilde DMA, DMF, DMPF'e parçalandığı görülmüştür. Yedi gün sonrasında iki üründe her üç sıcaklıktada amitraz rastlanmadığı görülmüştür. Bu sonuç Pico ve

arkadaşlarının armutta gerçekleştirdikleri çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür[76].

Yapılan çalışma sonucunda hem salatalıkta hemde ayvada ana bozunma ürününün DMF olduğu görülmüştür. DMA ve DMPF in ise DMF e göre daha düşük oranlarda olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca kütle spektrumları amitraz ve bozunma ürünleri ile benzerlik gösteren iki yapı daha gözlemlenmiştir. Bu yapılardan bir tanesi pico ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da da tespit edilmiştir. Bu yapı m/z değeri 252 olan N,N' bisdimetil fenil formamidin olduğu tespit edilmiştir. Diğer yapının molekül ağırlığı 190 olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak amitraz hızlı bir biçimde bozunarak 5 farklı bozunma ürünü oluşturduğu tespit edilmiştir. Bozunma ürünlerinden DMA, DMF, DMPF analitik olarak tespiti gerçekleştirilirken diğer iki bozunma ürünlerinin varlığı gözlemlenmiştir. Amitrazın bozunma sırasında izlediği yol için net bir sonuca varılamamakla birlikte bozunma ürünlerinden DMF ve DMPF in kararlı yapılar olup ilk başta oluştukları bu yapıların oranlarının zamanla BDMPF ve N-[(2,4-dimetilfenil)imino]metil-N-metilformamid in bozunmalar ile arttığı düşünülmektedir. Amitraz ve bozunma ürünleri Şekil 5.29 da verilmektedir.



Şekil 5.29: Amitraz ve bozunma ürünleri

KAYNAKLAR

- [1] **Tadeo, J. L., Brunete, C. S., González, L.,** 2007. *Analysis of pesticide in food and environmental samples* Taylor & Francis Group.
- [2] **Pico, Y., Farre, M., Tokman, N., Barcelo, D.,** 2008. Rapid and sensitive ultra-high pressure liquid chromatography quadrapole time of flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and its degradation products in fruits., *J. chrom. A*, **1203**, 36-46.
- [3] **Url** <<http://www.codexalimentarius.net/mrls>> , alındığı tarih 10.02.2010.
- [4] **Url**<<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>, alındığı tarih 31.06.2010
- [5] **Url** <<http://extoxnet.orst.edu/pips/amitraz.htm>> alındığı tarih 21.07.2010.
- [6] **Url** <<http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem> > , alındığı tarih 21.07.2010.
- [7] **Saito, T., Yamamoto, T., Inoue, R.,** 2008. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite in human serum by monolithic silica spin column extraction and liquid chromatography-mass spectrometry., *J. chrom. B*, **867**-1, 99-104.
- [8] **Caldow, M., Fussell, M., Smith, R.J.,** 2007. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography-mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants* **24**, 3 280-284.
- [9] **Korta, E., Bakkali, E., Berrueta, A.,** 2001. Study of acaricide stability in honey characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax, *Journal of Agric. Food. Chem.*, **49**, 12, 5835 – 5842.
- [10] **Brimecombe, R.D., Limson, J.L.,** 2006. Electrochemical investigation of the pH and solvent on amitraz stability, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8139-8143.
- [11] **Url** <<http://www.epa.gov/pesticides/about>>, alındığı tarih 10.02.2010.
- [12] **Carson, R.L.,** 1962. *Silent Spring*. The Riverside Press, Boston, MA
- [13] **Tomlin, C. (Ed.),** 2000. *The Pesticide Manual* , British Crop Protection Council
- [14] **White-Stevens, R.,** 1971. *Pesticides in the Environment*, Marcel Dekker, New York.
- [15] **Hutson, D.H. and Roberts, T.R.,** 1987. *Herbicides* , John Wiley & Sons, Kikester.
- [16] **Matolcsy, G., Nadasy, M., and Andrisk, V.,** 1988. *Pesticide Chemistry*, Elsevier, Amsterdam.

- [17] **Stenersen, J.**, 2004. *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [18] **Url** <<http://ecb.jrc.it/tgd>>, alındığı tarih 05.02.2010.
- [19] **R. Amadeo., F. Alba.**, 2005. *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis For Trace Determination of Pesticide Residues*.
- [20] **Hilland, A.R.C., Reynolds, S.L.**, 2005. *Food Addit. Contamin.*, **19** 733-747.
- [21] **Hill, A.R.C., Harris, C.A., Warburton, A.G.**, 2000. Effects of sample processing on pesticide residues in fruit and vegetables principles and practices of method validation. *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, 41-48.
- [22] Codex alimentarius commission 1993. codex alimentarius., Pesticide residues in food section 2. *Classification of Foods and Feeds*, 2 joint FAO/WHO food standards programme, FAO, Rome.
- [23] **El-Bidaoui, M., Jarju, O.P., Maestroni, B., Phakaeiw, Y.**, 2000. Testing the effect of sample processing and storage on the stability of residues, principles and practices of method validation. *Royal society of chemistry*. 75-88.
- [24] **Fussell, R.J., Jackson, K., Reynolds, S.L., Wilson, M.F.**, 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50 441-448.
- [25] **Howard, S.F., Yip, G.**, 1971. *J. Assoc. offic. Anal. Chem.* **54** 1371-1372.
- [26] **Pattinson, S.J., Wilkins, J.P.G.**, 1989. *Analyst* **114** 429-434.
- [27] **Skenk, F.J., Lehotay, S.J.**, 2000. *J. Chromotogr. A*, **868** 51-61.
- [28] **Anastassiades, M., Lehotay, S.J.**, 2002. *Abstracts of the fourth European pesticide residues workshop*, Rome.
- [29] European Commission, commission decision 2002. 657/EC, offic. *J. Eur. Communities*. L221 8-36.
- [30] **Fajgelj, A., Ambrus, A.**, 2001. Principles and practices of method validation. 237 *Royal society of Chemistry*.
- [31] **Anastassiadas, M., Scerbaum, E.**, 2005. Sample handling and clean up procedures II New development chromatographic mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues. Wilson & Wilson's.
- [32] **Spekt, W., Tillkes, M. Fresenius, J.**, 1985. *Anal. Chem.*, 322 443.
- [33] **Luke, M.A., Froberg, J.E., Doose, G.M., and Masumoto, H.T.**, 1981. *J. Assoc. Off. Anal Chem.*, **64** 1187.
- [34] **Spekt, W., Pelz, S., and Gilsbak, W., Fresenius, J.**, 1995. *Anal. Chem.*, **353** 183.

- [35] **Anastassiades, M., and Skerbaum, E.**, 1997. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **93** 316.
- [36] **Lee, S.M., Papathakis, M.L., Feng, H. M.C., Hunter, G.F., and Karr, J.E.**, 1991. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** 376.
- [37] **Fillion, J., Sauve, F., and Selwyn, J.**, 2000. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **83**.
- [38] **Anastassiades, M., Skerbaum, E., and Bertsk, D., Montury, M.** MGPR 2003. Aix en Provence.
- [39] **Cook, J., Beckett, M.P., Reliford, B., Hammock, W., and Engel, M.**, 1999. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **82** 1419.
- [40] **Sheridan, R.S., and Meola, J.R.**, 1999. *J. AOAC Int.*, **82** 982.
- [41] **Sojo, L.E., Brocke, A., Fillion J., and Price, S.M.**, 1997. *J. Chromatogr A*, **788** 141.
- [42] **Valverde-Garcia, A., Gonzalez-Pradas, E., Martinez-Vidal, J.L., and Aguera Lopez. A.**, 1991. *J. Agric. Food Chem.*, **39** 2188.
- [43] **Taylor, M.J., Hunter, K., Hunter, K.B., Lindsay, D., and Le Bouhellec, S.**, 2002. *J. Chromatogr. A*, **982** 225.
- [44] **Jansson, C., Pihlstrom, T., Osterdahl, B.-G., and Markides, K.E.**, 2004. *J. Chromatogr. A*, **93**.
- [45] **Fernandez-Alba, A.R., Valverde, A., Aguera, A., Contreras, M.**, 1994. *J. Chromatogr. A*, **686** 263.
- [46] **Andersson, A., Palsheden, H.**, 1991. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** 365.
- [47] **Steinwandter, H.**, 1992. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343** 887.
- [48] **Koinecke, A., Kreuzig, R., Bahadir, M., Siebers, J., Nolting, H.-G.**, 1994. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **349** 301.
- [49] **Barker, S.A.**, 2000. *J. Chromatogr. A*, **885** 115.
- [50] **IUPAC**, *Pure Appl. Chem.*, 1974. **37** 447.
- [51] **Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Skenck, F.J.**, 2003. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **86** 412.
- [52] **Pikon, V., Cau-Dit-Coumes, C., Ken, L., Guenu, S., Hennion, M.-C.**, 1996. *J. Chromatogr. A*, **737** 25.
- [53] **Hennion, M.C., Cau-Dit-Coumes, C., Pikon, V.**, 1998. *J. Chromatogr. A*, **823** 147.
- [54] **Pikon, V., Karpak, M., Hennion, M.C.**, 1998. *J. Chromatogr. A*, **795** 83.
- [55] **Leon-Gonzalez, M.E., Perez-Arribas, L.V.**, 2000. *J. Chromatogr. A*, **902** 3.
- [56] **Masque, N., Galia, M., Marce, R.M., Borrull, F.**, 1998. *J. Chromatogr. A*, 803.

- [57] **Di Corcia, A., Markese, S., Sampieri, R.**, 1993. *J. Chromatogr. A*, **642** 163.
- [58] **Furusawa, N., Okazaki, K., Iriguki, S., Yamaguki, H., Saitoh, M.**, 1998. *J. AOAC Int.*, **81** 1033.
- [59] **McLafferty, F.W., Turecek, F.**, 1993. Interpretation of mass Spectra. *University Science Books*, Mill Valley, CA.
- [60] **McLafferty, F.W.**, 1980. Interpretation of mass Spectra. *University Science Books*, Mill Valley, CA.
- [61] **Harrison, A.G.**, 1992. *Chemical Ionization Mass Spectrometry*. CRC Press Boca Rotan, FL.
- [62] **Bartmess, J.E., McIver, R.T.**, 1979. The gas phase acidity scale. *Gas Phase Ion Chemistry*, Academic Press, New York p. 88.
- [63] **Jennings, K.R.**, 1979. Chemical ionization mass spectrometry. *Gas Phase Ion Chemistry*, Academic Press, New York.
- [64] **Stan, H.J., Kellner, G.**, 1982. *Biomed Mass Spectrom.*, **9**, 483.
- [65] **Stan, H.J., Kellner, G.**, 1989. *Biomed, Environ. Mass Spectrom.*, **18** 645.
- [66] **Karasek, F.W., Clement, R.E.**, 1988. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Technique*, Elsevier, Amsterdam.
- [67] **Busk, K.L., Glish, G.L., McLuckey, S.A.**, 1988. *Mass Spectrometry Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, VK, Weinheim, Germany.
- [68] **Jennings, K.R.**, 1968. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1** 227.
- [69] **Mark, R.E., Hughes, R.J.**, 1989. *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*. Wiley, New York.
- [70] **Hoffmann, E.**, 1996. *J. Mass Spectrom.*, **31** 129.
- [71] **Stan, H.J.**, 1989. *J. Chromatogr. A*, **467** 85.
- [72] **Stan, H.J., Linkerhagner, M.**, 1996. *J. Chromatogr. A*, **750** 369.
- [73] **Van Der Hof, G.R., Van Zoonen, P.**, 1999. *J. Chromatogr. A*, **843** 301.
- [74] **Lehotay, S.J., Hajslova, J.**, 2002. *Trends Anal. Chem.*, **21** 686.
- [75] **Lehotay, S.J., Lightfield, A.R., Harman-Fetko, J.A., Donoghue, D.J.**, 2001. *J. Agric. Food Chem.*, **49** 4589.
- [76] **Tokman, N., Soler, C., Marinel, L.F., Pico, Y., Babelo, D.**, 2009. *J. Of Chrom. A* **1216** 3138.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Nihat ÖZCAN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 14.09.1979.

Adres: İTÜ Fen-Ed. Fak. Kimya Böl.

Yüksek Lisans Üniversitesi: İTÜ Kimya Böl. Yıl 2003.

Lisans Üniversitesi: İTÜ Kimya Böl. Yıl 2001.



Yayın Listesi:

Ölmez, H., Tuncay, F., **Özcan, N.**, Demirel, S., 2008. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market, Journal of Food Composition and Analysis, **21**, 564-568.