

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEKER DESTEKLİ SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE ARDINDAN YÜKSEK
PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MEYVE REÇELLERİNDEKİ
ORGANOFOSFORLU PESTİSİTLERİN TAYİNİ**

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
CANSU ALKAN

HAZİRAN 2022

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞEKER DESTEKLİ SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE ARDINDAN YÜKSEK
PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MEYVE REÇELLERİNDEKİ
ORGANOFOSFORLU PESTİSİTLERİN TAYİNİ**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu ALKAN

DANIŞMAN: Doç. Dr. Hasan ÇABUK

ZONGULDAK
Haziran 2022

KABUL:

Cansu ALKAN tarafından hazırlanan “Şeker Destekli Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon ve Ardından Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ile Meyve Reçellerindeki Organofosforlu Pestisitlerin Tayini” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 22/06/2022

Danışman: Doç. Dr. Hasan ÇABUK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Üye: Doç. Dr. Ersin ORHAN

Düzce Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Üye: Doç. Dr. Soner ÇAKAR

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

....../....../2022

Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Cansu ALKAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞEKER DESTEKLİ SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON VE ARDINDAN YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MEYVE REÇELLERİNDEKİ ORGANOFOFORLU PESTİSİTLERİN TAYİNİ

Cansu ALKAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan ÇABUK

Haziran 2022, 55 sayfa

Pestisitler, tarımda ürün kalitesini ve verimini artırmak için yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir ve bu maddelerin tüketiciler üzerinde olumsuz sağlık etkileri meydana getirdiği bilinmektedir. Geçmiş yıllarda, hem ham hem de işlenmiş birçok meyve ve sebzede pestisit kalıntısı tespit edilmiştir. Reçel, her mevsim tüketilmek üzere çeşitli taze meyve ve sebzelerden yaygın olarak üretilen işlenmiş bir gıda ürünüdür. Şeker, meyve özütü, asitlik düzenleyici ve koruyucular gibi bazı bileşenlerin kıvamlı bir karışım elde edilene kadar kaynatılmasıyla hazırlanmaktadır. İçeriğinde çeşitli tarım ürünleri olması, reçel ürünlerinde bulunabilecek pestisit kalıntısı şüphesini artırmaktadır. Meyve reçellerinde, pestisit kalıntılarının tespit edildiğine dair bazı yayınlanmış raporlar bulunmaktadır.

Bu çalışmada, meyve reçellerinde bazı organofosforlu pestisitlerin (fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos) belirlenmesine yönelik şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon

ÖZET (devam ediyor)

(SD-SSME) yöntemi sunulmaktadır. SD-SSME, suyla karışabilen bir organik çözücü ile analitlerin ekstraksiyonuna ve ardından dışardan eklenen veya numunede doğal olarak bulunan şeker sayesinde organik fazın ayrılmasına dayanan bir numune hazırlama yöntemidir. Bu çalışmada sunulan prosedür, reçel numunesinin asetonitril-su karışımı ile kısa süre çalkalanmasını, ardından faz ayrımı için santrifüjlemeyi ve toplanan asetonitril fazının yüksek performans sıvı kromatografisiyle doğrudan analizini içermektedir. Numune hazırlama basamağında kullanılan tek kimyasal asetonitrildir ve numune matrisinin yüksek şeker içeriği, faz ayrılmasını tetiklediği için ekstraksiyon sürecini oldukça hızlandırmıştır. Suyla karışabilen çözücünün türü, çözücü-su karışımının bileşimi ve hacmi, çalkalama süresi ve pH gibi ekstraksiyon verimliliğini etkileyen bazı parametreler incelenmiştir. Optimal deneysel koşullarda, incelenen analitler için %81-89 aralığında ekstraksiyon verimleri bulunmuştur. Ayrıca, 50–5000 µg/kg aralığında iyi bir doğrusallık ($r^2 \geq 0.9992$) ve 25 µg/kg'dan daha düşük metot algılama limitleri (LOD) elde edilmiştir. Yöntemin doğruluğu ticari olarak temin edilen vişne, çilek, böğürtlen, kayısı ve mavi yemiş reçelleri ile araştırılmıştır. Standart madde ilave edilmiş reçel örneklerinden %89-107 aralığında iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meyve reçelleri, Organofosforlu pestisitler, Sıvı-sıvı mikroekstraksiyon, Yüksek performans sıvı kromatografisi

Bilim Kodu: 405.03.01

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN FRUIT JAMS BY SUGAR-ASSISTED LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOLLOWED BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Cansu ALKAN

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied
Sciences Department of Chemistry**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan ÇABUK

June 2022, 55 pages

Pesticides are chemicals that are widely used in agriculture to increase crop quality and yield, and are known to cause adverse health effects on consumers. In the past years, pesticide residues have been detected in a variety of fruits and vegetables, both raw and processed. Jam is a processed food product commonly produced from a variety of fresh fruits and vegetables for the consumption during all seasons. It is prepared by boiling some ingredients such as sugar, fruit pulp, acidity regulator and preservatives until a viscous mixture is obtained. The fact that it contains various agricultural products raises the suspicion of pesticide residues that can be found in jam products. There have been some published reports of pesticide residues being detected in fruit jams.

In this study, a sugar-assisted liquid-liquid microextraction (SULLME) method for the determination of some organophosphorus pesticides (fenitrothion, phosalone, profenofos and

ABSTRACT (continued)

chlorpyrifos) in fruit jams has been presented. SULLME is a sample preparation method based on the extraction of analytes with a water-miscible organic solvent followed by the separation of the organic phase by externally added or naturally occurring sugar in the sample matrix. The procedure presented in this study included brief shaking of a jam sample with acetonitrile-water mixture, followed by centrifugation for phase separation and direct analysis of the collected acetonitrile phase by high performance liquid chromatography. Acetonitrile was the only chemical used in the sample pretreatment step and the high sugar content of the sample matrix highly accelerated the extraction process as it triggered phase separation. Some parameters that influence the extraction efficiency, including the type of water-miscible solvent, the composition and volume of the solvent-water mixture, shaking time and pH were investigated. Under the optimal experimental conditions, the extraction recoveries in the range of 81–89% were achieved for the analytes. In addition, good linearity in a range of 50–5000 µg/kg ($r^2 \geq 0.9992$) and method detection limits (LODs) less than 25 µg/kg were obtained. The accuracy of the method was investigated with commercially available cherry, strawberry, blackberry, apricot and blueberry jams. Good recoveries in the range of 89-107% were obtained from the spiked jam samples.

Keywords: Fruit jams, Organophosphorus pesticides, Liquid-liquid microextraction, High performance liquid chromatography

Science Code: 405.03.01.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tüm bilgi birikimini, hoşgörüsünü ve anlayışını benden esirgemeyen, pandemi koşullarında dahi büyük ilgi ve özenle sorularımı cevaplayıp laboratuvar çalışmalarında değerli vaktini benimle paylaşan, en önemlisi beni bilimsel ahlakıyla yetiştiren, yol gösteren çok kıymetli hocam ve tez danışmanım sayın Doç. Dr. Hasan ÇABUK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gerek derslerde, gerekse laboratuvar çalışmalarım esnasında, bilgi birikimini ve güler yüzünü eksik etmeyen sayın hocam Doç. Dr. Soner ÇAKAR'a teşekkür ederim. İlgisi ve destekleri için sayın Arş. Gör. Dr. Elif YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansın bana kazandırdığı, kendisini tanımaktan çok mutlu olduğum güzel yürekli insan sayın Semra PEKKAYA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına maddi kaynak sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje no: 2021-72118496-01) çok teşekkür ederim.

Akademik eğitimime verdiğim uzun aradan sonra beni her zaman destekleyen, bana güç ve cesaret veren, beni bu günlere getiren aileme, canım anneme ve babama çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
 BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	 1
1.1 PESTİSİTLER.....	1
1.2 ORGANOFOFORLU PESTİSİTLER	2
1.3 ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	4
1.4 MİKROEKSTRAKSİYON	5
1.4.1 Katı-Faz Mikroekstraksiyon	6
1.4.2 Sıvı-Faz Mikroekstraksiyon.....	7
1.4.2.1 Tek Damla Mikroekstraksiyon.....	8
1.4.2.2 Katılaştırılan Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyon.....	9
1.4.2.3 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon.....	10
1.4.2.4 Oyuk Fiber Sıvı-Faz Mikroekstraksiyon.....	11
1.4.2.5 Efervesan Destekli Dağıtıcı Mikroekstraksiyon	12
1.4.2.6 Homojen Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon.....	15
1.5 ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ	20

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
2.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR	23
2.2 STANDART ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	24
2.3 ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	24
2.4 ŞEKER DESTEKLİ SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ	24
2.5 KROMATOĞRAFİK ANALİZ KOŞULLARI.....	25
2.6 KROMATOĞRAFİK SİSTEMİN KALİBRASYONU	26
BÖLÜM 3 SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....	29
3.1 MİKROEKSTRAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU.....	29
3.1.1 Suyla Karışabilen Çözücü Seçimi.....	30
3.1.2 Asetonitril-Su Karışımının Bileşiminin Seçimi	31
3.1.3 Asetonitril-Su Karışımının Hacminin Seçimi	32
3.1.4 Karıştırma Süresinin Seçimi	33
3.1.5 pH Seçimi.....	34
3.2 SD-SSME YÖNTEMİNİN ANALİTİK PERFORMANSI.....	36
3.3 SD-SSME YÖNTEMİNİN FARKLI REÇEL ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI.....	38
3.4 LİTERATÜRDEKİ YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRMA	41
3.5 GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.	2
Şekil 1.2 Organofosforlu molekülün asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etki mekanizması. .	3
Şekil 1.3 Mikroekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması.	6
Şekil 1.4 Tek damla mikroekstraksiyon yöntemlerinin şematik gösterimi.	9
Şekil 1.5 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.	11
Şekil 1.6 Efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.	13
Şekil 1.7 Tuz destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi...	16
Şekil 1.8 Şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.....	17
Şekil 1.9 Çalışmada seçilen organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.1 Reçel örneklerine uygulanan şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.2 Organofosforlu pestisitleri içeren standart çözeltinin (25 µg/mL) analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramı. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.	26
Şekil 2.3 Fenitrotiyon için elde edilen kalibrasyon grafiği.	26
Şekil 2.4 Fosalon için elde edilen kalibrasyon grafiği.	27
Şekil 2.5 Profenofos için elde edilen kalibrasyon grafiği.	27
Şekil 2.6 Klorpirifos için elde edilen kalibrasyon grafiği.	27
Şekil 3.1 SD-SSME yönteminde farklı çözücü-su karışımlarıyla elde edilen faz ayrımları....	30
Şekil 3.2 Farklı bileşimlerde asetonitril-su karışımlarıyla elde edilen ekstraksiyon verimleri.32	
Şekil 3.3 Farklı hacimlerde asetonitril-su karışımıyla elde edilen ekstraksiyon verimleri.	33
Şekil 3.4 Farklı karıştırma sürelerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri.....	34
Şekil 3.5 Farklı pH'larda organofosforlu pestisitler için elde edilen ekstraksiyon verimleri. .	35
Şekil 3.6 Farklı pH'larda yapılan ekstraksiyon ve analiz sonrasında elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.	36
Şekil 3.7 SD-SSME yöntemiyle organofosforlu pestisitler için elde edilen kalibrasyon grafikleri.	37
Şekil 3.8 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen vişne reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No

Sayfa

- Şekil 3.9 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen çilek reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos..... 39
- Şekil 3.10 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen böğürtlü reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos. 40
- Şekil 3.11 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen kayısı reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos..... 40
- Şekil 3.12 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen mavi yemiş reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos. 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

No

Sayfa

Çizelge 1.1 Literatürdeki bazı efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyon yöntemleri.....	14
Çizelge 2.1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.	23
Çizelge 2.2 Organofosforlu pestisitlerin kalibrasyona ait denklem ve belirleme katsayıları...	28
Çizelge 3.1 SD-SSME yönteminin analitik performans parametreleri.	37
Çizelge 3.2 Standart madde eklenen meyve reçellerinin analizlerinden elde edilen yüzde geri kazanım ve RSD değerleri.	38
Çizelge 3.3 SD-SSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması.	42



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
Kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molarite
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
pK _a	: Asitlik sabitinin eksi logaritması
r ²	: Belirleme katsayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
%	: Yüzde

KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
Ar	: Argon gazı
BNE	: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu
CE	: Kapiler elektroforez
[C₄MIM][PF₆]	: 1-Butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat
CO₂	: Karbon dioksit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DAD	: Diyot dizi dedektörü
DSSME	: Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
EV	: Ekstraksiyon verimi
FID	: Alev iyonlaştırma dedektörü
GC	: Gaz kromatografisi
GC-FID	: Gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma dedektörü
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HCl	: Hidroklorik asit
HDÇ	: Hidrofilikliği değiştirilebilir çözücü
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek performans sıvı kromatografisi-diyot dizi dedektörü
HPLC-MS	: Yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC-UV	: Yüksek performans sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektörü
HSSE	: Homojen sıvı-sıvı ekstraksiyon
HSSME	: Homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
IS	: İyonik sıvı
KFE	: Katı-faz ekstraksiyon
KFME	: Katı-faz mikroekstraksiyon
KYODME	: Katılaştırılan yüzen organik damla mikroekstraksiyon
LOD	: Algılama limiti
LOQ	: Tayin limiti
MMBP	: Manyetik molekül baskılı polimer
MS	: Kütle spektrometresi
MS/MS	: Tandem kütle spektrometresi
N₂	: Azot gazı
NaOH	: Sodyum hidroksit
OF-SFME	: Oyuk fiber sıvı-faz mikroekstraksiyon
PDA	: Fotodiyot dizi dedektörü
pH-HSSME	: pH destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

QuEChERS	: Hızlı, kolay, ucuz, etkili, dayanıklı ve güvenilir
RSD	: Bağlı standart sapma
SD-HSSME	: Şeker destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
SD-SSE	: Şeker destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon
SD-SSME	: Şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
SFME	: Sıvı-faz mikroekstraksiyon
S/N	: Sinyal/gürültü
SSE	: Sıvı-sıvı ekstraksiyon
TD-HSSME	: Tuz destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
TDME	: Tek damla mikroekstraksiyon
UD	: Ultrasonik destekli
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/hacim



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 PESTİSİTLER

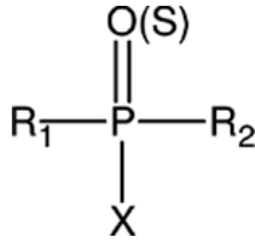
Pestisitler zirai, beşeri ve yapısal ürünlerin kimyasal yapısının bozulmasına sebep olan ve ürünlere zarar veren çeşitli organizmaların, bozucu etkilerinin ortan kaldırılması ya da engellenmesi için koruyucu olarak kullanılan kimyasallara verilen genel bir isimdir [1].

Gıdaların üretimi ve tüketiminin güvenceye alınması aşamasında pestisit kullanımı büyük rol oynamaktadır. Bu sebeple insan sağlığı ve çevresel etkileri bakımından hayati öneme sahiptir. Pestisitlerin kullanımıyla mahsullerin verimliliğinde artış gözlenmesine karşın fazla miktarda kullanım ürünlerde kalıntılara sebep olmaktadır. Aynı zamanda toprağın yapısına işlemekte ve ekolojik dengenin bozulmasına da yol açabilmektedir. Pestisitlerin uygulanması esnasında ya da arıtılamayan kalıntılara maruz kalındığında, ciddi hastalıkları tetikleme veya oluşturmaya sebep olduğu düşünülmektedir [2]. Sonuç olarak pestisit kullanımıyla artan kirlilik ve tehlikeler, hükümetleri önlem almaya ve kullanımlarda bazı sınırlamalar getirmeye zorunlu kılmıştır. Gıdalarda ve bazı tarımsal ürünlerde kullanılacak pestisitlerin, uygun miktarları ve içerikleri yönetmelikler oluşturularak belirlenmiştir [3]. Çoğu pestisit önerilen miktarlarda kullanıldığı tespit edilmiş olsa da, maruz kalma sıklığı ve biyolojik birikim etkisi yüzünden insan sağlığına bir risk oluşturmaya başlamıştır. Bundan dolayı çevre örneklerinde pestisit kalıntılarının analizi günümüzde bir gereklilik oluşturmıştır [4].

Pestisitler, kimyasal yapıları ve etki ettikleri alanlara göre çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar. Örneğin zararlı bitkilerden korumada “Herbisitler”, böceklerden korumada “İnsektisitler” ve mantarlardan korumada “Fungisitler” olarak adlandırılan kimyasallar kullanılmaktadır. Kimyasal yapılarına göre fosforik asitlerin bulunduğu moleküler yapıdakiler “Organofosforlu Pestisitler”, klorun bulunduğu “Organoklorlu Pestisitler” olarak isimlendirilirler [5].

1.2 ORGANOFOFORLU PESTİSİTLER

Organofosforlu pestisitler, oksijen, azot, karbon ve kükürt kombinasyonlarına sahip fosforik asit esterleridir. Tüm organofosforlu pestisitlerin molekül yapısında, merkezinde bir fosfor atomu ve fosfora çift bağlı olarak oksijen veya kükürt atomu bulunmaktadır. Organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı Şekil 1.1’de verilmiştir. Bu kimyasal yapı ilk kez 1800’lerde sentezlenmiş ve 1930’larda böcek öldürücü etkisi keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda da insektisit olarak yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla en çok kullanılan organofosforlu pestisitler klorpirifos, parokson, malathion, fenitrotyon, paratyon, kumafos, diazinon, metil paratyon ve siyanofosdur. İlk kez insektisit olarak kullanılan organofosforlu bileşik paratyonudur [6,7].

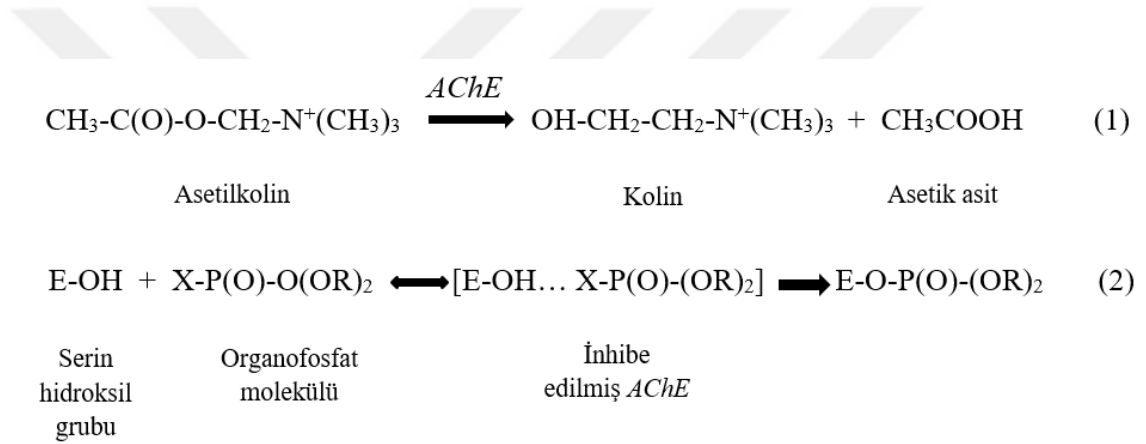


R₁= alkil, R₂= alkoksi, alkil, dialkilamino grupları, nükleofil, X= halojen, siyanür, fenoksi, pirofosfat

Şekil 1.1 Organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.

Organofosforlu pestisitler, 1960’lardan sonra organoklorlu pestisitlerin kullanımına alternatif olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Organoklorlu pestisitler ile kıyaslandığında çevrede biyolojik birikimleri daha az ve toksite seviyeleri daha düşüktür [8]. Organofosforlu pestisitler doğada kolayca hidrolizlenebilir özellikte olmalarına karşın yüksek toksiteye sahiptirler. Aynı zamanda kolinerjik etkinlikleri fazladır ve vücuda alındığında asetilkolinesteraza geri dönüşümsüz bağlanarak inaktive ederler. Bundan dolayı da insan sağlığı için tehlike oluşturlar. Asetilkolin molekülü, vücudun merkezi sinir sistemi ve kas sisteminde, nöronlar ya da hücreler arasındaki iletişimi sağlayan bir kimyasaldır. Asetilkolinesteraz enzimi, asetilkolin molekülünü hidrolize ederek, kolin ve asetik asit üretilmesini sağlamaktadır. Bu enzim yüksek katalitik yeteneğe sahiptir ve saniyede 25000 asetilkolin molekülünü indirgeyebilmektedir. Bu sebeple üretilcek kolin molekülleri, tekrardan nörotransmitter olarak kullanılacak asetilkolinin sentezlenebilmesi için hayati öneme sahiptir. Asetilkolinesteraz enzimi, serin hidroksil grubu üzerinden organofosfor molekülünün fosfor atomuna kovalent

bağ ile bağlanarak vücut içerisindeki aktivitesini yitirir. Enzimin yokluğunda ise asetilkolin molekülü fazlaca birikir. Bu birikim etkisi, merkezi sinir sisteminin veya kasların sürekli uyarılmasıyla sonuçlanır. Bu uyarılma solunum sistemi, miyokardiyal aksaklıklar ve hayati diğer fonksiyonlarda arızalara yol açmaktadır. Fazla miktarda organofosforlu bileşiklere maruz kalınması, vücuttaki asetilkolinesteraz enziminin ölçülmesiyle belirlenebilmektedir. Yapılan araştırmalar ve sonuçlara göre pestisit zehirlenmelerinde organofosfor içeren kimyasallar ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizde başvuru zehirlenmelerin yaklaşık üçte ikisi organofosforlu bileşikler kaynaklı olarak rapor edilmiştir. Diğer ülkelerde de istemli (intihar vakaları) ya da istemsiz (maruziyet/etkilenme/tenefüs etme) zehirlenmelerin çoğunluğunu yine organofosforlu bileşikler oluşturmaktadır [7,9]. Organofosforlu molekülün asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etki mekanizması Şekil 1.2’de verilmiştir.



(1) Asetilkolinesterazın (AChE), asetilkolin molekülünü kolin ve asetik asite dönüştürmesi.

(2) Esterazın (E) hidroksil grubunun, organofosfat molekülü ile tepkimesi ve etkisiz hale getirilmesi.

Şekil 1.2 Organofosforlu molekülün asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etki mekanizması.

Tarımda verimliliği artırmak için uygulanan kimyasalların meydana getirdiği çevre kirliliği ve insan sağlığı için oluşturduğu risk günümüzde tehlikeli seviyelere ulaşmaktadır. Her ne kadar pestisit kullanımına önlem ve sınırlamalar getirilmiş olsa da, pestisit vakalarında artan bir ivme gözlenmektedir. Pestisitlerle temasın bir kısmını sadece istemsiz maruziyetler oluşturmamaktadır. İntihar vakalarında da kullanılan kimyasallar olarak pestisit içerikli ürünler yer almaktadır. Bu tür vakalardan dolayı örneklerde pestisit analizi, önemli bir konu haline gelmiştir. Bilim insanları uzun süredir numunelerdeki pestisitleri doğru ve kesin bir şekilde analiz etmek üzerine çalışmışlardır. Pestisit analizlerinde yüksek performans sıvı

kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektrometresi (MS) hali hazırda kullanılan enstrümantal tekniklerdir [10–12].

Pestisit analizlerinin yapılması çoğu zaman uzun zaman alan, sıkıcı ve bazen düşük verimli sonuçlar verebilmektedir. Yapılacak analizler farklı matris ve farklı analitler için olabilmektedir. Bu yüzden seçici yöntemlere ve hassas analizlerin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda pestisit bulundığı matris ve uygulanacak analiz yönteminin uyumlu olması gerekmektedir. Bu da, uzman bir yaklaşım gerektirmektedir. Örnek hazırlama yöntemleri, analizlerin doğru bir şekilde yapılabilmesindeki ilk ve en önemli adımdır. Matrislerin homojen olmadığı durumlarda bile örnek hazırlama yöntemlerinin seçiciliği ve çeşitliliği ile pestisit analizlerinin en doğru şekilde yapılabilmesi hedeflenmektedir.

1.3 ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Analitik kimyanın temelini oluşturan kalitatif ve kantitatif analizin istenilen hassasiyette, doğru, yüksek verimde ve hızlı şekilde yapılması önemli bir konudur. Gelişen teknolojiye rağmen, karmaşık matrislerde (biyolojik, çevresel, gıda ve eczacılık ürünleri gibi) bulunan analitlerin, günümüz cihazları ile doğrudan analizlerini yapmak mümkün değildir. Bu sebeple enstrümantal analiz öncesinde numunelere bir ön hazırlık işlemi uygulanmalıdır. Örnek hazırlamanın temel amacı, analitleri bulundukları matrislerden en az kayıpla izole etmek, temizlemek, zenginleştirmek ve enstrümantal cihaza enjeksiyona hazır hale getirmektir.

Analitlerin matrislerden ayrılması aşaması, örnek hazırlama proseslerinin en önemli konusudur. Bu prosedürler zor, yorucu ve en çok zaman alan işlemlerdir. Bu bağlamda analitik kimyada, örnek hazırlama için en çok tercih edilen metotlardan birisi de ekstraksiyon yöntemleridir. Ekstraksiyon kelime anlamı olarak ayırma (özütleme) demektir. Ekstraksiyon ile moleküllerin farklı fazlardaki dağılma oranları farklarından yararlanılarak, hedeflenen bileşik ya da moleküllerin matrislerden ayrılması sağlanmaktadır. Analitler bulundukları ortama göre daha iyi çözünebilecekleri başka bir faza, kimyasal bir değişime uğramadan kendiliğinden transfer olmaktadır. Böylece kirli matrislerden ekstrakte edilerek analiz için uygun hale getirilmektedirler. Ekstraksiyon işlemi eğer sıvı bir çözücü yardımıyla gerçekleştirilirse sıvı-faz ekstraksiyonu, eğer katı bir malzemenin yüzeyinde gerçekleştirilirse katı-faz ekstraksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE) ve katı-faz ekstraksiyon (KFE), bu amaçla en çok tercih edilen klasik örnek hazırlama yöntemleridir [13].

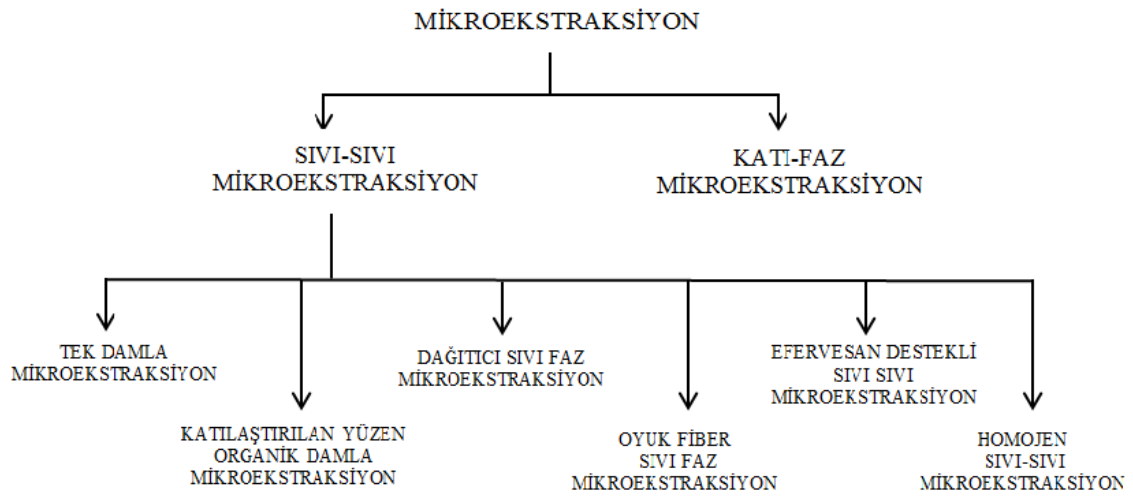
Sıvı-sıvı ekstraksiyon (SSE), bilinen en eski ve klasik yöntemlerden biridir. Su ile karışmayan organik bir ekstraksiyon çözücüsü (kloroform, toluen, diklorometan, hekzan vb.) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. SSE’de, sulu numune ve organik ekstraksiyon çözücüsü, bir ayırma hunisinde bir araya getirilmektedir. Analitlerin organik çözücüyle etkileşimi ve ardından organik çözücüye transfer olması için karışım kuvvetlice çalkalanmaktadır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, ayırma hunisinin musluğu açılarak iki fazın birbirlerinden ayrılması sağlanmaktadır. Bu yöntemde fazla miktarda çözücü gereksinimi bulunmaktadır. Aynı zamanda birkaç kez temiz çözücü kullanılarak işlem tekrarlanmaktadır. En son ekstraksiyon çözücüsünün analitlerden ayrılması için buharlaştırma işlemi uygulanmaktadır [14]. Bir başka klasik yöntem ise katı-faz ekstraksiyon (KFE) yöntemidir. Yöntemin uygulanmasında, içinde silika jel veya iyon değiştirici reçine gibi dolgu malzemelerinin bulunduğu bir kolon kullanılmaktadır. Analitleri içeren sulu numune kolonun içerisinden geçirilir. Bu geçiş esnasında kolondaki dolgu malzemesinin yüzeyinde analitler adsorbe edilmektedir. Ardından kolonun yüzeyinde adsorbe edilmiş analitleri geri almak için bir çözücü ile yıkama basamağına gerek duyulmaktadır [15].

Klasik ekstraksiyon yöntemleri zaman alan, karmaşık ve fazla miktarlarda çözücü gereksinimlerinden dolayı pahalı yöntemlerdir. Ek olarak, düşük zenginleştirme faktörü, otomasyona elverişli olmama, toksik çözücülerin ekstraksiyon sonrasında çevreye ve personele zararlı etkileri diğer dezavantajlar şeklinde sıralanabilir [16]. “Yeşil Kimya” olgusunun gelişmesiyle birlikte, toksik çözücülerin doğaya verdiği zararın en aza indirgenmesi amaçlanmıştır [17]. Bilim dünyasının bu amaca yönelik çalışmaları, mikroekstraksiyon yöntemlerinin gelişimini ve bu yöntemlere olan ilginin artmasını sağlamıştır.

1.4 MİKROEKSTRAKSİYON

Toksik çözücülerin çevreye ve sağlığa zararlı etkilerinden dolayı, son zamanlarda daha uygulanabilir yöntemlerin geliştirilmesi anlayışı benimsenmiştir. Klasik yöntemlere alternatif olarak, seçilen çözücüler daha az zararlı veya çok az miktarlarda kullanılmaktadır. Buna istinaden mikroekstraksiyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Mikroekstraksiyon yöntemleri, kullanılan çözücü miktarı mikrolitre seviyelerde ve minyatür düzenekler ile uygulama kolaylığı bulunan yöntemlerdir. Ekstraksiyon çözücüsünün hacmi çok az bir miktar olduğu için, yüksek zenginleştirme oranına sahiptirler. Ekstraksiyon işlemi analitlerin hem ayrılmasını hem de zenginleştirmeyi tek basamakta gerçekleştirmeye olanak sağlar. Maliyeti

düşük, basit, hızlı ve genellikle portatif düzenekler olduğundan gelişime açık uygulamalardır. Aynı zamanda ekstraksiyon sonrasında buharlaştırma işlemine gerek kalmadan enstrümantal cihazlarla doğrudan enjeksiyon yapılabilme imkanı sunarlar. Mikroekstraksiyon yöntemleri geleneksel metotlara benzer şekilde ekstraksiyonun gerçekleşeceği faza göre isimlendirilirler. Katı-faz mikroekstraksiyon (KFME) ve sıvı-faz mikroekstraksiyon (SFME) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. SFME yönteminin farklı mekanizmalara sahip uygulamaları bulunmaktadır [18]. Mikroekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Mikroekstraksiyon yöntemlerinin sınıflandırılması.

1.4.1 Katı-Faz Mikroekstraksiyon

Geleneksel yöntemlere alternatif olarak geliştiren katı-faz mikroekstraksiyon (KFME), ilk olarak 1990 yılında Arthur ve Pawliszyn tarafından tanıtılmıştır [19]. Daha sonraki yıllarda farklı matrislerden eser miktarlardaki analitleri ayırmak ve zenginleştirmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Çözücünün kullanılmadığı kuru bir yöntemdir. Aynı zamanda klasik yöntemlere göre daha hızlı ve basit bir yöntemdir. Sabit faz olarak fiber malzemenin kullanıldığı ve fiberin analitleri adsorpsiyonuna dayalı bir mekanizma içerir. Bu malzeme, bir enjektörün içerisinde yaklaşık 1 cm kalınlığında polimer kaplanmış (dimetilsiloksan gibi), erimiş silika elyaftan oluşur [20]. Uygulama aşamasında ilk olarak KFME enjektörü, analiz edilecek çözeltinin içerisine daldırılır. Enjektörünün pistonu ileri itildiğinde fiber malzeme dışarı çıkar ve analitlerle etkileşir. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra piston geri çekilerek ortamdaki

uzaklaştırılır. Ardından fiberde adsorplanan analitler uygun bir çözücü yardımıyla desorbe edilirler. Gaz kromatografisi (GC) ile çalışılması durumunda ise ekstraksiyon sonrasında enjektör direkt olarak GC'nin termal desorpsiyon ünitesine yerleştirilerek analiz edilebilmektedir [21].

KFME tekniği doğrudan daldırmalı KFME ve tepe boşluklu KFME olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir. Doğrudan daldırmalı KFME tekniğinde, enjektör tamamen sıvı ile fiber temas edecek şekilde örnek çözeltinin içerisine daldırılır. Ardında numune belli sürelerde karıştırılarak analitlerle fiberin etkileşimi sağlanır. Tepe boşluklu KFME tekniği ise daha çok uçucu özellikteki analitlerin ekstraksiyonunda kullanılan bir yöntemdir. Uygulamada, enjektörden dışarıya çıkarılmış fiber, ısıtılan numuneye temas etmeden, ekstraksiyon kabının üst boşluğunda tutulmaktadır. Isıtılıp aynı zamanda karıştırılan numunede analitlerin buhar fazına geçmesi sağlanmaktadır. Bir süre sonra buhar fazına geçen analitler, üst boşlukta tutulan fibere difüzyon yoluyla transfer olurlar. Fibere transfer olan analitler, sonrasında uygun bir çözücüyle geri alınarak veya termal desorpsiyon yoluyla analiz edilebilmektedir [22].

KFME tekniği çözücünün kullanılmadığı ve bundan dolayı da maliyetin düşük olduğu bir metottur. Basit, hızlı ve uygulama kolaylığı sebebiyle tercih nedenidir. Aynı zamanda SSE metodunda dezavantaj yaratan hidrofilik analitlerin analizi için bir alternatif oluşturur. Bütün avantajlarının yanı sıra enjektörün kırılması, sıyırılması, büyük moleküllerin fiberi tıkaması, organik çözücülerde fiberin şişmesi, fiber malzemelerinin sınırlı olması ve yüksek asidik ortamlarda fiberin aşınması gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir [23].

1.4.2 Sıvı-Faz Mikroekstraksiyon

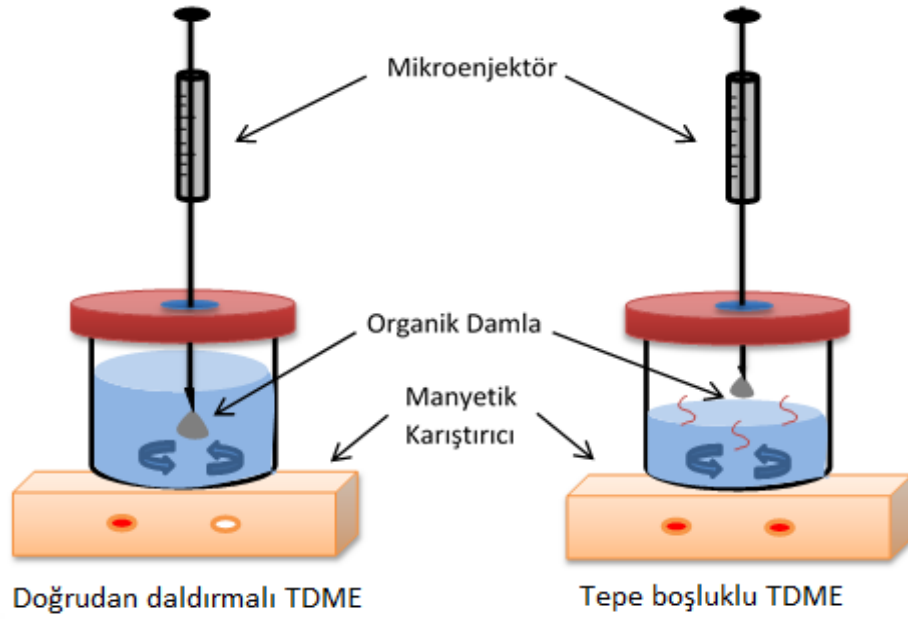
Sıvı-faz mikroekstraksiyon (SFME), sulu numunelerdeki analitlerin suyla karışmayan çözücü fazına geçişini esas alan örnek hazırlama yöntemidir. Klasik uygulamalarda büyük hacimlerde çözücüler kullanılırken, SFME'de mikrolitre hacimlerde çözücüler kullanılmaktadır. SFME yönteminde, matrislerden analitlerin ayrılmasında düşük hacimlerde çözücülerin kullanılması, metodunun zenginleştirme oranını yüksek kılmaktadır. Çözücü kaybının olmadığı ve ekstraksiyon sonrasında buharlaştırmaya gerek duyulmayan bir yöntemdir. Toksik çözücülerin mikrolitre seviyelerdeki sarfiyatından dolayı çevre dostu metotların başında gelmektedir. Basit, ucuz ve kolay uygulanabilirliğinin yanı sıra, gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez (CE) ve HPLC ile uyumlu metotlardır [24].

Yöntemin uygulanması, analitlerin bulunduğu sulu ortam (donör fazı) ve analitlerin ekstrakte edileceği su ile az karışabilen mikrolitre seviyedeki çözücü (alıcı fazı) arasında gerçekleşir. Son yıllarda farklı SFME uygulamaları geliştirilmiştir. Tek damla mikroekstraksiyon (TDME), katılaştırılan yüzen organik damla mikroekstraksiyon (KYODME), dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) ve oyuk fiber sıvı-faz mikroekstraksiyon (OF-SFME) geliştirilen başlıca SFME yöntemleridir [25].

1.4.2.1 Tek Damla Mikroekstraksiyon

Tek damla mikroekstraksiyon (TDME) yöntemi, matrislerden analitleri ayırma aşamasında çözücünün sadece tek bir damlasının kullanıldığı bir uygulamadır. Bu yöntemin ilk tanımı, 1996 yılında Liu ve Dasgupta tarafından, ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroformun bir damlası (1,3 μ L) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [26]. Organik damlanın analitlerle etkileşimi için bir mikro şırıngadan yararlanılır. Şırınganın pistonu ileri itilerek mikro organik damla dışarı çıkartılır ve numune ile etkileştirilir. Böylece, analitlerin yüksek hacimden, düşük hacme transferi ile yüksek zenginleştirme faktörlerine ulaşılır. Ekstraksiyon sonrasında damla şırıngaya geri çekilir ve uygun bir cihaz ile analiz gerçekleştirilir [27].

TDME yönteminin doğrudan daldırmalı TDME ve tepe boşluklu TDME olmak üzere farklı uygulamaları mevcuttur. Doğrudan daldırmalı TDME yönteminde, şırınganın ucundaki damla sulu çözeltiye direkt olarak daldırılır. Bu aşamada damla ile analitlerin daha iyi etkileşmesi için uygun sürelerde karıştırma işlemi uygulanır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, damla enjektöre geri çekilerek uygun bir enstrümantal yöntemle analiz edilir. Tepe boşluklu TDME yönteminde ise, damla numune ile temas etmeden üst boşlukta tutulur. Sulu numune ısıtılarak analitlerin buhar fazına geçmesi sağlanır. Buhar fazındaki analitler difüzyon ile organik damlaya transfer olur ve ekstraksiyon gerçekleştirilir. Bu metot, daha çok uçuculuğu yüksek analitlerin analizi için seçicidir. Doğrudan daldırmalı TDME ve tepe boşluklu TDME yöntemlerinin şematik gösterimi Şekil 1.4’de verilmiştir [28].



Şekil 1.4 Tek damla mikroekstraksiyon yöntemlerinin şematik gösterimi.

TDME yöntemi sadece bir mikroenjektör kullanılarak kolaylıkla uygulanabilmektedir. Ancak, organik damlanın enjektörün ucunda düşmeden kalabilmesi için viskozitesi yüksek çözücüler kullanılması gerekmektedir. Yöntemin bir diğer dezavantajı, numunenin karıştırılması esnasında damlanın düşme riski bulunmasıdır. Organik damlanın hacmi (0,2 -5 μL) artırıldıkça ekstraksiyon verimi de artar fakat maksimum 30 μL 'ye kadar çıkılabilmektedir. Aynı zamanda iyonik şiddet, pH, sıcaklık ve karıştırma süresi gibi parametreler ekstraksiyonun verimini etkileyebilmektedir [29].

1.4.2.2 Katılaştırılan Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyon

Katılaştırılan yüzen organik damla mikroekstraksiyon (KYODME), 2007 yılında Khalili-Zanjani ve ekibi tarafından tanıtılmıştır ve bu yöntemde kullanılan organik çözücü damlacığı katılaştırılarak sistemden geri alınmaktadır [30]. Bu uygulamada çözücü seçimi önemlidir. Kullanılacak çözücünün su ile karışmayan ve sudan daha düşük yoğunluğa sahip olması gereklidir. Ayrıca, erime noktası oda sıcaklığına (10-30 $^{\circ}\text{C}$) yakın olan çözücüler kullanılmalıdır. Bu tür özelliklere sahip olan çözücüler sınırlı sayıdadır. Undekanol, 1-dodekanol, 2-dodekanol ve n-hekzadekan kullanılabilen çözücülerden bazılarıdır. KYODME yönteminde, ekstraksiyon çözücü damlası sulu numunenin yüzeyine bir enjektör yardımıyla bırakılır. Aynı esnada numune karıştırılmaya başlanır. Yoğunluğundan dolayı yüzeyde kalan çözücü, karıştırma ile analitlerle etkileşir. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, numune bir buz

banyosuna alınır. Yüzeydeki çözücü ani soğuma ile kristalleşip katılaşır. Katılaştıran organik damla bir spatül yardımıyla sulu çözeltiden ayrılır ve oda sıcaklığına geri bırakılır. Oda koşullarında tekrardan sıvı hale dönen analitleri içeren çözücü seyreltilip, uygun bir enstrümantal yöntemle analiz edilir [31,32].

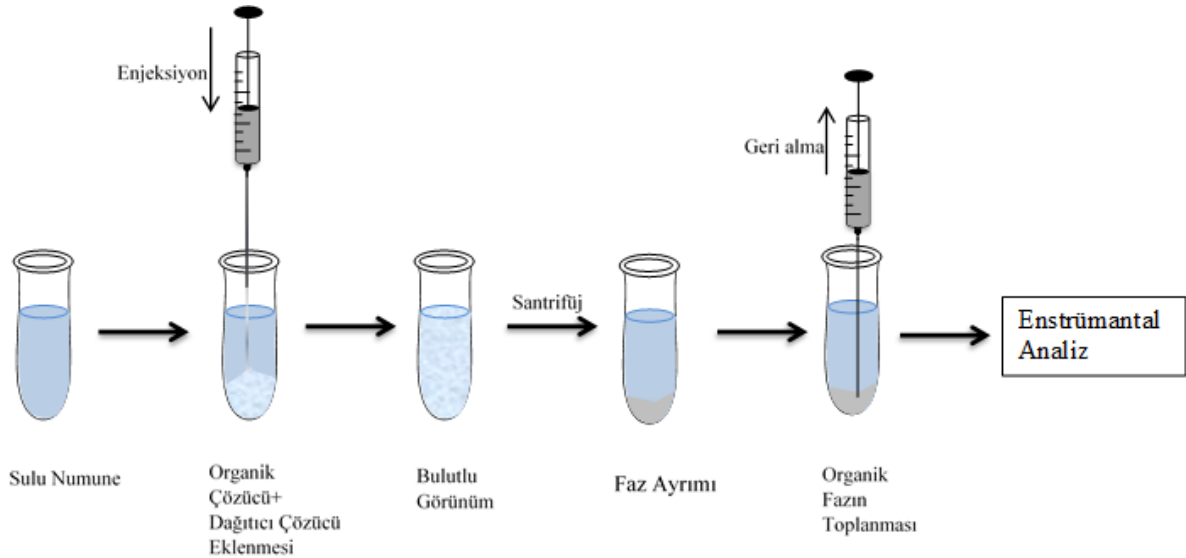
KYODME, uygulama kolaylığı, az miktarda çözücü kullanımı, kısa ekstraksiyon süresi ve yüksek zenginleştirme faktörü gibi avantajlar sunmaktadır. Ancak kriterlere uygun çözücülerin sayılı olması yöntemin en önemli kısıtlamasıdır.

1.4.2.3 Dağıtıcı Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DSSME) yöntemi ilk olarak 2006 yılında Rezaee ve arkadaşları tarafından sunulmuştur [33]. Yöntem, üçlü bileşenli çözücü sistemine dayanmaktadır. Kullanılacak olan suyla karışmayan ekstraksiyon çözücüsü, suyla kolayca karışabilen polar yapıdaki dağıtıcı çözücüyle beraber bir enjektöre alınır. Bu amaçla kullanılan dağıtıcı çözücüler genellikle metanol, etanol, asetonitril ve asetonur. Enjektördeki karışım hızlıca sulu çözeltiye eklenir. Bu ilave ile ekstraksiyon çözücüsü küçük damlacıklar şeklinde numune çözeltisinde dağılır ve bulanık bir çözelti oluşur. Bu sayede ekstraksiyon çözücüsünün temas yüzey alanı arttığından analitlerle etkileşim daha yüksek oranda gerçekleşir. Ardından, ekstraksiyon işlemi dengeye ulaştıktan sonra sulu ve organik fazlar santrifüjleme işlemiyle birbirlerinden ayrılırlar. Son aşamada ise analitleri içeren organik faz bir enjektör yardımıyla sistemden alınır ve uygun bir cihaz ile analiz gerçekleştirilir. DSSME yönteminin uygulanışı Şekil 1.5’de verilmiştir [34]. Bu yöntemde ekstraksiyon çözücüsünün seçimi de önemli bir parametredir. Santrifüj aşamasından sonra çözücünün sulu fazdan kolay ayrılabilmesi için yoğunluğunun suyunkinden daha yüksek olması tercih edilir. Aynı zamanda suyla karışmayan düşük polaritede fakat dağıtıcı çözücüyle karışabilecek özellikte olmalıdır. Bu sebeple, yüksek ekstraksiyon kabiliyeti ve yoğunluklarından dolayı en çok klorobenzen, kloroform, karbon tetraklorür ve tetrakloroetilen gibi çözücüler kullanılmaktadır [35].

DSSME yönteminde bulutlu çözelti oluşumuyla birlikte, ekstraksiyon çözücüsünün küçük damlacıklar halinde yayılmasıyla ekstraksiyon dengesine hızlıca ulaşılır. Bu da ekstraksiyon süresini kısaltarak DSSME yöntemine önemli bir avantaj kazandırır. Ek olarak DSSME yönteminin düşük maliyet, kullanım kolaylığı, yüksek zenginleştirme faktörü, yüksek geri kazanım, farklı ekstraksiyon teknikleriyle uyumluluk ve çevre dostu olma gibi avantajları

bulunmaktadır. Ancak, DSSME yönteminin biyolojik matrislerdeki verimliliği, sıvı numunelerdekinden nispeten daha düşüktür. Bu sebeple yöntemin geliştirilmeye ihtiyacı vardır. Kullanılan dağıtıcı çözücülerin fazla miktarlarda kullanılması ve toksik olması da metodun dezavantajları arasındadır [36].



Şekil 1.5 Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

1.4.2.4 Oyuk Fiber Sıvı-Faz Mikroekstraksiyon

Oyuk fiber sıvı-faz mikroekstraksiyon (OF-SFME) yöntemi, 1999 yılında Pedersen-Bjergaard ve Rasmussen tarafından geliştirilmiştir [37]. OF-SFME yönteminde, “U” şeklinde polipropilenden üretilmiş içi oyuk bir fiber malzeme kullanılmaktadır. Fiberin, bir ucu açık veya iki ucu da açık ve bir mikro enjektörle bağlantılı olarak uygulama şekilleri bulunmaktadır. Polipropilenden üretilmiş fiber, uygulama öncesinde su ile karışmayan (toluen, kloroform, n-hekzil eter veya 1-oktanol gibi) bir çözücüye yatırılır. Böylece fiberin gözenekli yapısı, çözücü ile kaplanıp bir membran oluşturulur. Bu sıvı membran, alıcı faz (ekstraksiyon çözücüsü) ve verici faz (sulu çözelti) arasındaki teması engellemektedir. Daha sonrasında mikroenjektör içerisine ekstraksiyon çözücüsü çekilir ve fiberin açık ucuna yerleştirilir. Akabinde oyuk fiber, analitleri içeren sulu çözeltiye daldırılır ve mikroenjektörde bulunan organik çözücü (alıcı faz) fiberin içerisine enjekte edilir. Bu esnada örnek çözelti (verici faz) hızlıca karıştırılır. Bu karıştırma ile analitler önce fiberin membranına, sonra fiberin içerisindeki alıcı faza difüzyon yolu ile transfer olur. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra, ekstraksiyon çözücüsü enjektörle

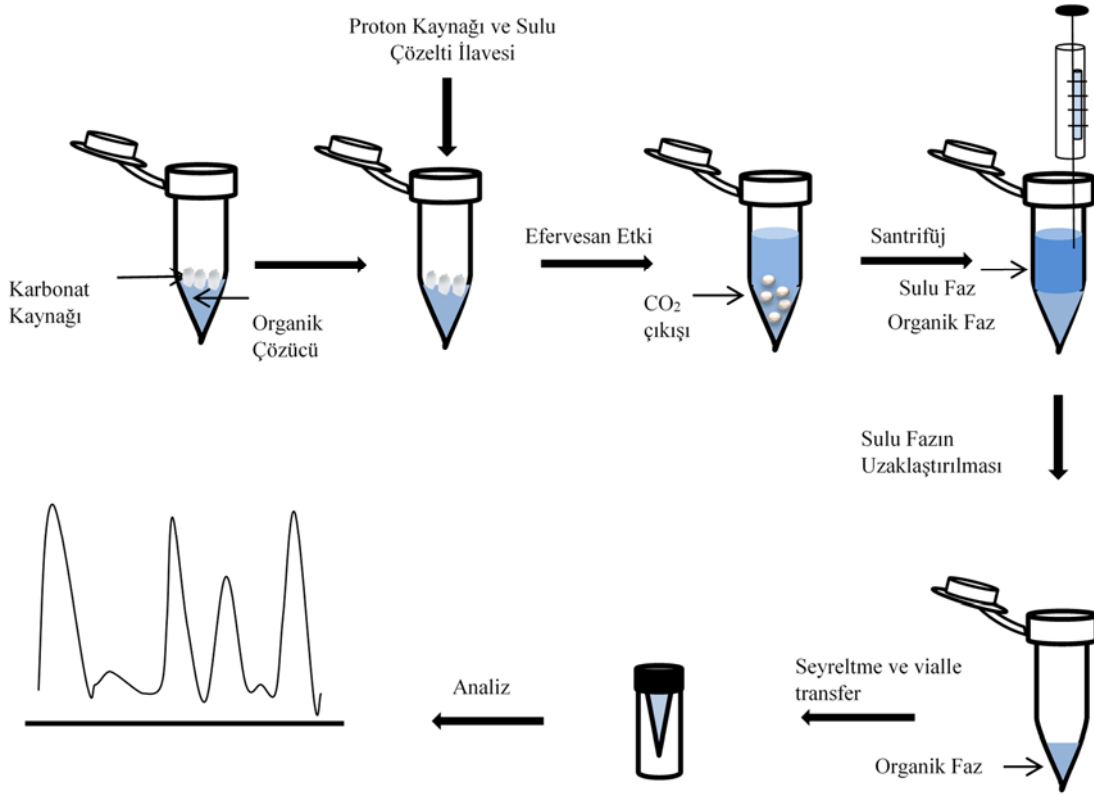
fiberden geri alınarak analiz edilir. OF-SFME yönteminde, eğer alıcı faz ile fibere emdirilen çözücü aynı ise “ikili faz sistem”, alıcı faz asidik ya da bazik sulu çözelti olursa “üçlü faz sistem” olarak adlandırılmaktadır [38,39].

OF-SFME yönteminin en önemli avantajı çözücü kaybının olmamasıdır. Aynı zamanda fiberin gözenekli yapısı sayesinde büyük moleküllerin elenmesi sağlanarak girişim yapmaları engellemektedir. Fiberler, tek kullanımlık malzemeler olduğundan kirlilik ya da bulaş riski bulunmamaktadır. Bazı moleküllere seçici olması, uzun ekstraksiyon süresi, fiberin hassas yapısı ve otomasyona elverişsiz olması ise OF-SFME yönteminin dezavantajları olarak sıralanabilir [40].

1.4.2.5 Efervesan Destekli Dağıtıcı Mikroekstraksiyon

Efervesan destekli dağıtıcı mikroekstraksiyon yöntemi 2011 yılında, DSSME tekniğine benzer bir yaklaşımla, Lasarte-Aragones ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [41]. DLLME’de organik çözücü dağıtıcı etkisinden yararlanılan başka bir çözücüyle karıştırılır. Efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyonda ise, dağıtıcı etkiyi efervesan reaksiyonu sonucu açığa çıkan karbondioksit gazı sağlamaktadır. Karbondioksit gazının kaynağı, basit bir asit-baz reaksiyonudur. Sulu çözeltide meydana gelen gaz çıkışı, köpürmeye sebep olur ve böylece organik çözücünün sulu numunede dağılması ve bu sayede analitlerle etkileşmesi gerçekleşir. Yöntemin uygulama aşamaları Şekil 1.6’da gösterilmiştir [42,43].

Belirlenen karbondioksit ajanları ve organik çözücü, konik tüpün dibine yerleştirilir. Ardından sulu çözeltinin ortama eklenmesiyle efervesan etki oluşur ve gaz çıkışı gerçekleşir. Bu efervesan etkinin oluşmasıyla, çözücü analitlerle etkileşime girer. Gaz çıkışı bitip ekstraksiyon tamamlandıktan sonra santrifüjlenip sulu faz ve organik faz bir enjektör yardımıyla birbirlerinden ayrılır. Ardından organik çözücü seyreltilip uygun analitik cihaz ile analizi yapılır [44].



Şekil 1.6 Efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

Bir başka efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyon uygulaması da, efervesan tablet oluşturmaktır. Efervesan ajanları belirlendikten sonra maddeler gerekli ise öncelikle kurutma, öğütme gibi işlemlerden geçirilmektedir. Belirlenen efervesan ajanlarının reaksiyon için gerekli olan miktarları tartılır. Ardından ekstraksiyon çözücüsü ve efervesan ajanları bir araya getirilir. Sonrasında bu karışım preslenerek bir tablet haline getirilmektedir. Akabinde, oluşturulan tablet, analitleri içeren sulu çözeltinin içerisine bırakılmaktadır. Sulu ortamda tablet çözünmeye başlamakta, aynı zamanda asit-baz reaksiyonu sonucunda CO_2 çıkışı gerçekleşmektedir. Tabletten içeriğinde olan ekstraksiyon çözücüsü bu gaz çıkışı ile sulu ortamda küçük damlacıklar halinde dağılmakta ve analitlerle etkileşmektedir. Efervesan etki bitip ekstraksiyon tamamlandıktan sonra organik faz ve sulu faz birbirlerinden santrifüjleme yoluyla ayrılmaktadır. Sonrasında analitleri içeren organik fazın uygun bir enstrümantal yöntemle analizi yapılabilmektedir [45,46].

Prosesin başlangıcı, en iyi efervesan etkiyi oluşturacak karbondioksit ve proton kaynağının belirlenmesidir. Genellikle, karbondioksit kaynağı olarak karbonatlı bileşikler (sodyum karbonat veya sodyum bikarbonat gibi), proton kaynağı olarak ise sodyum dihidrojen fosfat, askorbik asit veya sitrik asit kullanılmaktadır. Bu iki ana bileşenin oranları, efervesan

reaksiyonunu, buna bağılı olarak da ekstraksiyonun verimliliğini etkilemektedir. Aynı zamanda efervesan etkinin azalmaması için, ortamın pH'sının ve viskozitesinin büyük ölçüde değişmemesi gereklidir [47].

DSSME'de dağıtıcı çözümler fazla miktarlarda (genellikle mL seviyelerde) kullanılmaktadır. Bu da bazen sudaki analitlerin çözünürlüğünü yükseltebilmektedir. Ekstraksiyonun verimliliği için bu istenmeyen bir durumdur. Efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyonda dağıtıcı çözümler kullanılmamasına rağmen ekstraksiyon çözümleri sulu numunede etkili bir şekilde dağıtılmaktadır. Aynı zamanda ekstraksiyon esnasında çözeltinin vorteks ya da bir ultrasonik karıştırıcıda karıştırılması gerekmemektedir. Çözümlerin numunenin içerisinde etkili bir şekilde dağılması, efervesan etki ile kendiliğinden sağlanabilmektedir. Literatürdeki efervesan esaslı mikroekstraksiyon yöntemlerinin bazıları Çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1 Literatürdeki bazı efervesan esaslı dağıtıcı mikroekstraksiyon yöntemleri.

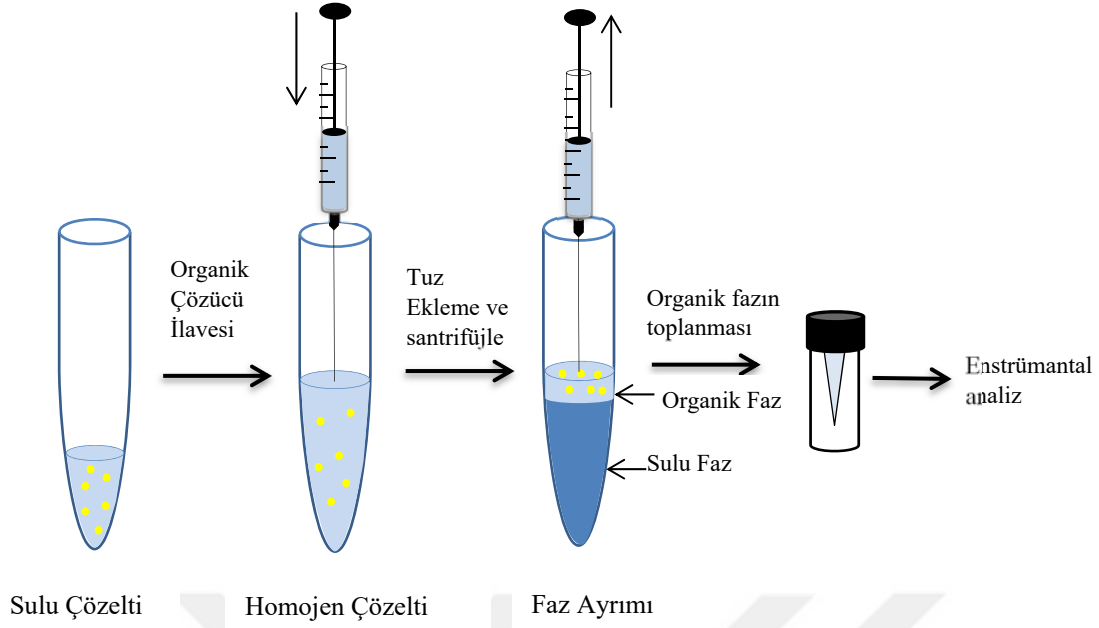
Numune	Analit	CO ₂ kaynağı- Proton kaynağı	Ekstraksiyon çözümleri	Tayin yöntemi	Geri kazanım	Ref.
Biyolojik Örnekler	Metadon	Sodyum Karbonat- Sitrik Asit	1-undekanol	GC- MS/GC- FID	%98.1- 101,6	[48]
Su Örnekleri	Difenil eterler	Sodyum Dihidrojen Fosfat-Sodyum Karbonat-	[C ₄ MIM][PF ₆]	HPLC- DAD	%77,3-106,7	[49]
Su Örnekleri	Steroid Hormonları	Sodyum Bikarbonat- Oksalik asit	Nonanoik asit	HPLC- UV	%87-107	[50]
Sığır Karaciğeri	Ketoprofen- Diklofenak	Sodyum Karbonat- Formik Asit	Mentol	HPLC- MS/MS	%87-91	[51]
Tükürük Örnekleri	Antipirin	Sodyum Karbonat- Asetik Asit	Diklorometan	HPLC- MS	>%90	[52]

[C₄MIM][PF₆]: 1-Butil-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat; GC: Gaz kromatografisi; MS: Kütle spektrometresi; FID: Alev iyonlaştırma dedektörü; HPLC: Yüksek performans sıvı kromatografisi; UV: Ultraviyole dedektörü; DAD: Diyot dizi dedektörü

1.4.2.6 Homojen Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon

Homojen sıvı-sıvı ekstraksiyon (HSSE), geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonun bazı dezavantajlarını ortadan kaldıran ve numune hazırlamada daha yeşil organik çözücülerin kullanılmasına olanak sağlayan alternatif bir numune hazırlama yöntemidir. Bu yöntem, son zamanlarda düşük hacimlerde çözücülerin kullanılmasıyla homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (HSSME) olarak daha yaygın olarak uygulanmaktadır. Diğer SSME yöntemlerinden farklı olarak, HSSME yönteminde kullanılan çözücüler suyla tamamen ya da kısmen karışabilir özelliktedir. HSSME yönteminin ilk aşamasında, sulu numune ile suyla karışabilen çözücü arasında homojen bir çözelti oluşmakta ve ardından kimyasal veya fiziksel bir etki sayesinde faz ayrımı meydana gelmektedir. Numuneye çözücü ilavesiyle oluşan karışım homojen olduğundan, analit ile çözücü etkileşimi yüksek oranda gerçekleşmekte ve bu sayede de ekstraksiyon dengesine çok hızlı ulaşılmaktadır. HSSME yöntemi, hem hidrofilik hem de hidrofobik analitlerin ekstraksiyonu için uygulanabilmektedir. Bunlara ek olarak, kullanılan ekstraksiyon çözücülerini suyla karışabilir özellikte olduğundan, ekstraksiyon sonrasında doğrudan sıvı kromatografisi ile analiz edilebilmektedir. Homojen çözeltide faz ayrımı, tuz veya şeker ilavesi, pH'nın veya sıcaklığın değiştirilmesi ve başka bir organik çözücünün az miktarda eklenmesi gibi çeşitli etkiler ile sağlanmaktadır [53,54].

Tuz destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (TD-HSSME), HSSME yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Tuz etkisi, basit bir şekilde, sulu bir çözeltideki tuz konsantrasyonu çok yüksek olduğunda, diğer (organik) moleküllerin çözünürlüğünün azalması olgusu olarak tanımlanmaktadır. Tuz destekli faz ayrımı ilk olarak 1973 yılında Matkovich ve Christian tarafından sunulmuş ve doymuş bir kalsiyum klorür çözeltisi eklenerek suyla karışabilen aseton ile metal şelatların ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir [55]. Tuzlar hidrofilik çözücülerin sudaki çözünürlüğünü azaltarak faz ayrımının oluşmasını sağlamaktadır. Çeşitli tuzların homojen çözeltiye eklenmesiyle, tuz iyonlarının hidratasyonu ile birlikte çözücü-su arasındaki etkileşimler kısmen zayıflamakta ve bunun sonucunda da faz ayrımı gerçekleşmektedir [53]. TD-HSSME yönteminin uygulama basamakları Şekil 1.7'de verilmiştir.



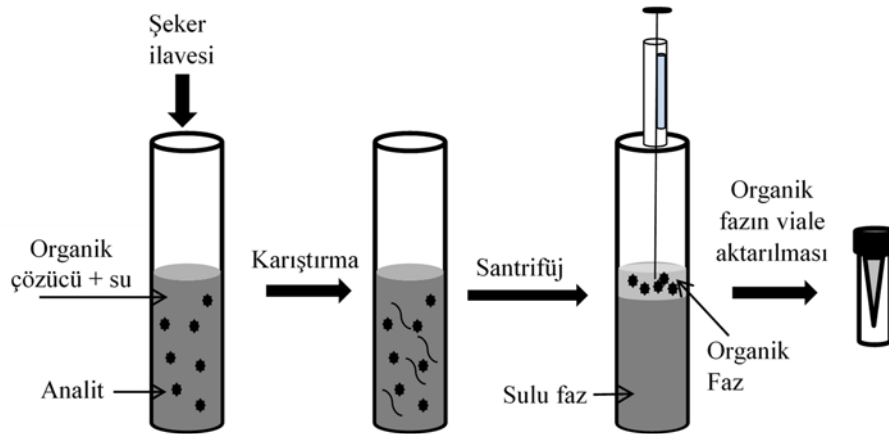
Şekil 1.7 Tuz destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

TD-HSSME metodolojisi geliştirirken, organik çözücünün türü ve hacmi, tuzun türü ve miktarı optimize edilmesi gereken ana parametrelerdir. TD-HSSME’de en sık kullanılan çözücüler izopropil alkol, asetonytril ve asetonur. Bununla birlikte, özellikle biyolojik numuneler için genellikle asetonytril tercih edilmektedir. İzopropil alkol veya aseton ile karşılaştırıldığında, faz ayrımı sağlamak için asetonytrilin daha az hacmi gereklidir. Ayrıca, asetonytril proteinleri kolayca çöktürür ve hem hidrofilik hem de hidrofobik türler için iyi ekstraksiyon kabiliyetine sahiptir. Ek olarak, asetonytril sıvı kromatografisi teknikleriyle doğrudan analiz için en uygundur [56].

TD-HSSME yöntemlerinde kullanılacak olan tuz genellikle deneysel olarak seçilir, ancak bu seçimde dikkate alınması gereken bir dizi genel gereksinim vardır. Kullanılacak olan tuzun sudaki çözünürlüğü yüksek fakat çözücü içerisindeki çözünürlüğü ihmal edilebilir seviyede olmalıdır [57]. Ayrıca, tuz seçiminde ekstrakte edilen organik bileşiklerin doğası, analiz edilen numunenin türü ve kullanılacak olan enstrümantal analiz yöntemi de dikkate alınmaktadır. TD-HSSME yöntemlerinde amonyum sülfat, amonyum asetat, amonyum format, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum karbonat, magnezyum sülfat ve magnezyum klorür en yaygın tercih edilen tuzlardır [53]. Kütle spektrometresi ile analiz edilecek biyolojik materyaller için, amonyum format veya amonyum asetat gibi tuzlar genellikle tercih edilir. Kütle spektrumlarının yorumlanmasını zorlaştırdığı için sodyum iyonlarının varlığı istenmez. Aksine, TD-HSSME sonrası kapiler elektroforez (CE) ile analiz işlemi yapılacaksa, sodyum klorür ideal

bir tuzdur. Çünkü sodyum klorür, CE yöntemlerinde sıklıkla mobil faz bileşeni olarak kullanılmaktadır. HPLC-UV ile analizin gerekli olduğu durumlarda ise, TD-HSSME aşamasında amonyum sülfat ve sodyum klorür en sık kullanılan tuzlardır [56]. TD-HSSME yönteminin avantajları arasında düşük maliyet, basit uygulama ve hızlı ekstraksiyon dengesine ulaşma sayılabilir. Tüm bunların aksine, yüksek konsantrasyonlarda tuz ajanlarının kullanılması ekipmanların kirlenmesine, korozyonuna ve bazı durumlarda analitlerle istenmeyen reaksiyonların meydana gelmesine yol açmaktadır [53].

Şeker destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (SD-HSSME) yönteminde, homojen çözeltideki faz ayrımı fazla miktarda mono veya disakkaritler eklenerek gerçekleştirilir. Yöntem, şeker destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon (SD-SSE) veya şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (SD-SSME) olarak da adlandırılmaktadır. Yöntemin ilk uygulaması Wang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve tuz destekli mikroekstraksiyona benzer şekilde bir mekanizma içermektedir [58]. SD-SSME’de, homojen çözeltiye suda çözünür özellikte olan şekerlerden fazla miktarda ilave edilir. Şeker ilavesiyle, su-çözücü arasındaki etkileşim zayıflar ve hidratlanmış çözücü molekülleri serbest hale gelir. Su molekülleri şeker molekülleriyle etkileşerek karışımın alt kısmında toplanır. Sudan sıyrılmış çözücü molekülleri ise kümeleşerek analitlerle birlikte karışımın üst kısmında toplanır. Böylece sulu faz ve çözücü fazı birbirlerinden ayrılmış olur [59]. SD-SSME yönteminin genel uygulama aşamaları Şekil 1.8’de verilmiştir.



Şekil 1.8 Şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

Asetonitril, SD-SSME’de kullanılan başlıca çözücüdür, çünkü düşük hacimlerde kullanıldığında bile faz ayrımı meydana getirir ve hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikler için iyi ekstraksiyon kabiliyetine sahiptir [60]. Asetonitrilin sıvı kromatografide en popüler

mobil faz olmasıyla ilişkili bir diğer avantajı, nihai özütünün doğrudan analiz edilebilmesidir [53]. SD-SSME yöntemi, çeşitli biyolojik ve/veya gıda matrislerinden ilaçlar [61–63], fenolik bileşikler [60], biyoaktif bileşenler [64,65], bisfenoller [66], sülfonamidler [67] ve pestisitler [68–70] gibi çeşitli polaritelerdeki analitlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

SD-SSME yöntemlerinde faz ayrımının sağlanması için çoğunlukla glukoz kullanılmaktadır. Glukoz, ucuz, kolay temin edilebilir ve verimli olduğu ve daha az viskoz bir çözelti ürettiği için tercih edilmektedir [63]. SD-SSME’de glukozun yanı sıra, fruktoz, sakkaroz veya maltoz gibi şekerler faz ayrımı için tercih edilmektedir. Gerekli olan şeker konsantrasyonu tuzlar ile kıyaslandığında daha düşüktür. Kullanılan şekerler ekipmanların kirlenmesine veya korozyonuna yol açmazlar. Ayrıca yöntemin basit, ucuz ve yüksek verimli olması avantaj sağlamaktadır [60].

Yüksek miktarda şeker içeren numunelerde, faz ayrımı için ek bir reaktif gerekmediğinden SD-SSME yöntemi daha pratik olarak uygulanabilmektedir [60,67,69]. Bu anlamda bal, kimyasal bileşimi yaklaşık %77 mono- ve oligosakkaritler içerdiğinden SD-SSME ile ekstraksiyonu yapılabilen ideal bir numunedir [67]. Benzer şekilde şeker açısından zengin (%84-88) bir gıda olan pekmez de SD-SSME’de uygulama bulan bir diğer numunedir [70]. Bu numunelerde ekstraksiyon sonrası faz ayrımı numunelerin kendi şeker içeriği sayesinde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla bu yöntemler, kolay uygulanabilir ve ekonomik olma özelliğine sahiptir.

pH destekli homojen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (pH-HSSME), sudaki çözünürlüğü pH ile değiştirilebilen çözücülerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu çözücüler pH değişimi ile hidrofilik özellikleri artırılıp, suda tamamen çözünür hale getirilirler. Son zamanlarda bu tür çözücüler hidrofilikliğı değiştirilebilir çözücüler (HDC) olarak adlandırılmaktadır. HDC’lerde hidrofilik ve hidrofobik formlar arasındaki dönüşüm pH ile sağlanmaktadır. Bazı organik bazlar (amidinler, ikincil veya üçüncül aminler ve diaminler) ve yağ asitleri bu tür özelliklere sahiptir [71]. Hidrofobik bir aminin karbonatlı su ile arasındaki asit-baz reaksiyonu, hidrofilik yapıdaki bikarbonat tuzunun oluşumuna yol açmaktadır. Pratikte bu etki, çözücü sisteminden karbondioksit gazı geçirilerek veya kuru buz ilave edilerek uygulanmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında ise sisteme bir baz eklenerek faz ayrımı sağlanmaktadır [72,73].

HDC’ler başlangıç koşullarında apolar özelliktedirler. Genellikle sekonder ve tersiyer aminler ile çalışırken sulu ortamdan karbondioksit geçirilmesiyle, polaritelerinin değişmesi

sağlanmaktadır. Tersiyer aminlerin karbondioksit ile verdiği reaksiyon örnek olarak aşağıda verilmiştir. Bu reaksiyon ekzotermiktir ve 1 atmosfer basınç altında kendiliğinden gerçekleşmektedir. Denge reaksiyonunun sağ tarafa kayması ile oluşan protonlanmış amin polar yapıya sahiptir ve su ile karışabilecek formdadır. Reaksiyon mekanizmasının sola kayması için ise, ortamdan karbondioksitin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için ortamdan N₂ veya Ar gazı geçirilmesi, ortamın ısıtılması, ortama NaOH eklenmesi gibi seçeneklerden herhangi biri kullanılmaktadır. Nihayetinde çözücü başlangıçtaki apolar forma geri dönüştürülmekte ve iki fazlı bir karışım meydana gelmektedir [74].



Çoğu zaman organik çözücünün sudaki çözünürlüğünü arttırmak için, kuru buz ile eşit hacimlerde karışmış olan su ve organik çözücü beraber kullanılmaktadır. Fakat kuru buzun ilavesi ekstra işlem basamağına ve prosedürün uzamasına sebep olmaktadır. pH değişimine dayalı HSSME’de, başlangıçta homojen halde olan çözeltide, analitlerle çözücü maksimum etkileşimdedir. Hidrofobik-hidrofilik formlar arasındaki geçişin kolay olması, ekstraksiyon fazına analitlerin transferini kolaylaştırır. Bu sebeple çözeltinin çalkalanmasına veya karıştırılmasına gerek duyulmamaktadır. Dolayısıyla yöntemin hızlı bir kinetiği ve yüksek ekstraksiyon verimliliği bulunmaktadır. Fakat pH değişimiyle çözünürlüğü değiştirilebilen, hem yoğunluğu sudan daha düşük hem de iyi bir ekstraksiyon kabiliyetine sahip çözücüler az sayıda bulunmaktadır. Bu da yöntemin uygulanmasına sınırlamalar getirmektedir [75,76].

HSSME yöntemlerinde, faz ayrımının gerçekleştirilmesi, ortamın sıcaklığının veya hidrofobikliğinin değiştirilmesiyle de sağlanabilmektedir. Sıcaklık değişimine dayalı HSSME’de faz ayrımı, ek ajanlar yerine sıcaklığın değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. Sıcaklık değişimiyle, pH destekli HSSME yöntemine benzer şekilde, çözücülerin sudaki çözünürlükleri değiştirilebilmektedir. İlk olarak Murata ve arkadaşları tarafından sunulmuş bir yöntemdir [77]. Oda sıcaklığında normalde heterojen olan su-çözücü karışımı, sıcaklığın arttırılması ile homojen hale getirilmektedir. Homojen hale getirilen karışımda, sudaki analitlerin çözücü fazına transferleri sağlanmaktadır. Ardından karışımın sıcaklığı tekrardan oda sıcaklığına düşürülmektedir. Böylece sistem yeniden heterojen hale döndürülmekte ve analitleri içeren çözücü fazının ayrılması sağlanmaktadır [78,79].

Sıcaklık değişimine dayalı HSSME’de, ekstraksiyon verimi sıcaklığın artırılmasıyla artmaktadır. Fakat bazı analitlerin yüksek sıcaklıklarda bozunma ihtimalleri de bulunmaktadır. Bu sebeple sıcaklık değişiminden etkilenmeyen analitlerin ekstraksiyonu için uygulanabilir bir yöntemdir.

Bir diğer HSSME yöntemi de, hidrofobik çözücü destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon metodudur. Literatürde aynı zamanda hidrofobik çözücü destekli faz geçiş ekstraksiyonu olarak da geçen bu yöntem, asetonitrilin çözücü olarak kullanıldığı durumlarda faz ayrımını sağlamak için geliştirmiş bir yöntemdir. Liu ve arkadaşları, plazmadan ilaçları ekstrakte etmek için sulu asetonitril karışımına az miktarda hidrofobik yapıdaki bir çözücü olan kloroform ekleyerek faz ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem ile tuz destekli HSSME da olan kirlilik, cihaz dedektörüne zarar verme, analitlerle istenmeyen reaksiyon verme gibi durumların önüne geçilmesi amaçlanmıştır [80].

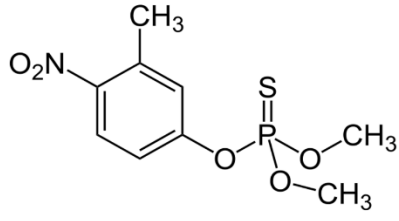
Hidrofobik çözücü destekli HSSME yönteminde, homojen bir sulu asetonitril çözeltisine polar olmayan bir başka organik çözücünden az miktarda eklenmektedir. Eklenen organik çözücü asetonitril içinde çözünebilir ama suda çözünmeyen bir yapıda olmalıdır. Genellikle metil tert-butil eter, toluen ve kloroform gibi çözücüler bu amaçla kullanılmaktadır [81]. Polar olmayan çözücünden homojen çözeltiye birkaç damla eklenmesiyle ortamın hidrofobik özelliği artırılmış olur. Artan hidrofobik etki asetonitril moleküllerinin sudaki çözünürlüğünü azaltmaktadır. Asetonitril molekülleri su moleküllerinden sıyrılıp, kendi fazını oluşturmak için bir araya gelir. Bu şekilde hidrofobik etkiyle su ve asetonitril fazı bir birlerinden ayrılmaktadır. Hidrofobik çözücü destekli HSSME yöntemi basit bir prosedür, yüksek zenginleştirme faktörü ve hızlı ekstraksiyon avantajlarına sahip bir uygulamadır [82].

1.5 ÇALIŞMANIN AMACI VE ÖNEMİ

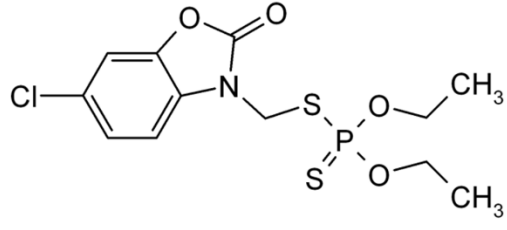
Gelişen teknoloji ve buna paralel olarak büyüyen çevre sorunları sebebiyle, günümüzde analitik kimya uygulamaları giderek önem kazanmaktadır. Birçok alanda analitik yöntemlere olan ihtiyaç yüzünden, yeşil kimya prensiplerine uygun yeni analiz metodlarının geliştirilmesi önem arz etmektedir. İdeal olarak, kimyasal analiz öncesinde kullanılan örnek hazırlama yöntemleri hızlı, kullanımı kolay, ucuz ve çevre dostu olmalıdır. Bu nedenle modern analitik kimyadaki güncel eğilim, örnek hazırlama adımlarının basitleştirilmesi, minyatürleştirilmesi ve kullanılan organik çözücülerin miktarlarının azaltılması yönündedir.

Pestisitler, tüketiciler üzerinde olumsuz sağlık etkileri olmasına rağmen, ürün kalitesini ve verimini artırmak için tarımda yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Hem ham hem de işlenmiş çeşitli meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının bulunduğu tespit edilmiştir [83]. Reçel, her mevsim tüketilmek üzere çeşitli taze meyvelerden yaygın olarak üretilen geleneksel bir gıda ürünüdür. Reçel üretiminde şeker, meyve özütü, asitlik düzenleyici ve koruyucular gibi farklı bileşenler viskoz bir karışım elde edilene kadar kaynatılmaktadır [84]. Tüketicilerin tat tercihlerine bağlı olarak çeşitli sebze, yaprak ve kabuklardan da üretilmektedirler. İçeriğin çeşitli tarım ürünleri olması, reçel ürünlerinde bulunabilecek pestisit kalıntısı şüphesini artırmaktadır. Üretim sürecinin meyve reçellerindeki pestisit kalıntıları üzerinde farklı etkileri olabilmektedir. Reçel hazırlamada uygulanan kaynatma işlemi çiğ meyvelerdeki pestisitlerin buharlaşarak uzaklaşmasına neden olabilmektedir [85]. Öte yandan, reçel hazırlama sırasında uygulanan ısı işlemi, su içeriğini azaltmanın yanı sıra, taze meyvedeki herhangi bir pestisit kalıntısını yoğunlaştırabilmektedir [86]. Meyve reçellerinde, bazıları 10 µg/kg'ın üzerindeki konsantrasyonlarda pestisit kalıntıları bulunduğu dair yayınlanmış kanıtlar bulunmaktadır [84,87].

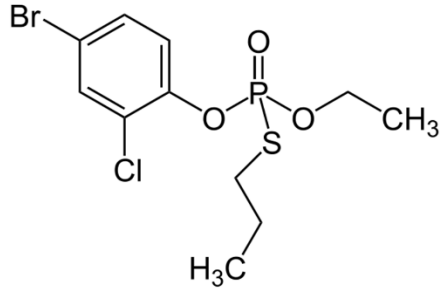
Bal ve kuru meyveler ile birlikte meyve reçelleri, yüksek şeker ve düşük su içerikli ürünler olarak sınıflandırılırlar ve bu özellikler, bu tür matrislerdeki pestisit kalıntılarının belirlenmesinde zorluklar oluşturabilmektedir [85]. Bu dezavantajı avantaja dönüştürmek amacıyla bu çalışmada, meyve reçeli örneklerindeki organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyonuna yönelik yeni bir şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (SD-SSME) yöntemi geliştirilmiştir. Organofosforlu pestisitler olarak fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve kloropirifos seçilmiştir. Seçilen organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapıları Şekil 1.9'da verilmiştir. Çalışma kapsamında vişne, çilek, böğürtlen, kayısı ve mavi yemiş içerikli ticari reçeller incelenmiştir. Üretici tarafından etiket üzerinde belirtilen reçellerin toplam şeker içeriği kütleye %68 ile %71 arasında değişmektedir. Reçel örneklerine su ve suyla karışabilen bir organik çözücüden meydana gelen homojen karışım mikrolitre hacimlerde ilave edilmiştir. Karıştırma ve santrifüj işlemleri sonrası üst kısımda ayrılan organik çözücü fazı toplanarak HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Homojen karışımda faz ayrımının gerçekleşmesi reçel örneğinin kendi şeker içeriği sayesinde gerçekleşmiştir. SD-SSME yönteminin yüksek şeker içeriğine sahip reçel örneklerine ilk defa uygulanıyor olması yöntemin özgün değerini oluşturmaktadır.



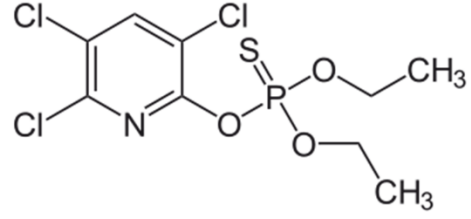
Fenitrotyon



Fosalon



Profenofos



Klorpirifos

Şekil 1.9 Çalışmada seçilen organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.

BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve ilave bir saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Organofosforlu pestisit standartları olarak kullanılan fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos-etil ve deneysel işlemler sırasında kullanılan asetonitril, metanol, etanol, aseton, sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan saf su Zeener Power I Scholar-UV sisteminden üretilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sırasında IsoLab marka 2 mL hacim kapasiteli ve kilit kapaklı Eppendorf tüpler, Hamilton marka cam mikro-enjektör, Axypet marka mikro-pipet ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır. Bu çalışmada ayrıca bazı cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan bu cihazlar ve kullanım amaçları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Kullanılan Cihazlar	Marka/Model	Kullanım amacı
Hassas terazi	Kern Abs 220-4M	Örneklerin ve kimyasalların tartımı
pH metre	Hanna HI8314	pH ölçümü
Yüksek hızlı çalkalayıcı	Biosan MPS-1	Numune ve çözücünün karıştırılması
Mikro-santrifüj cihazı	Thermo Scientific Espresso Personal	Karışım da faz ayrımının sağlanması

Kromatografik analiz, degazör (SCM100), pompa (P1000), otomatik enjektör (S3000), UV dedektör (UV1000) ve kontrol sistemi (SN4000) ile donatılmış bir Thermo Finnigan marka yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı (San Jose, USA) kullanılarak yapılmıştır.

Kromatografik veriler ChromQuest 4.1 yazılımı kullanılarak elde edilmiş ve işlenmiştir.

2.2 STANDART ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

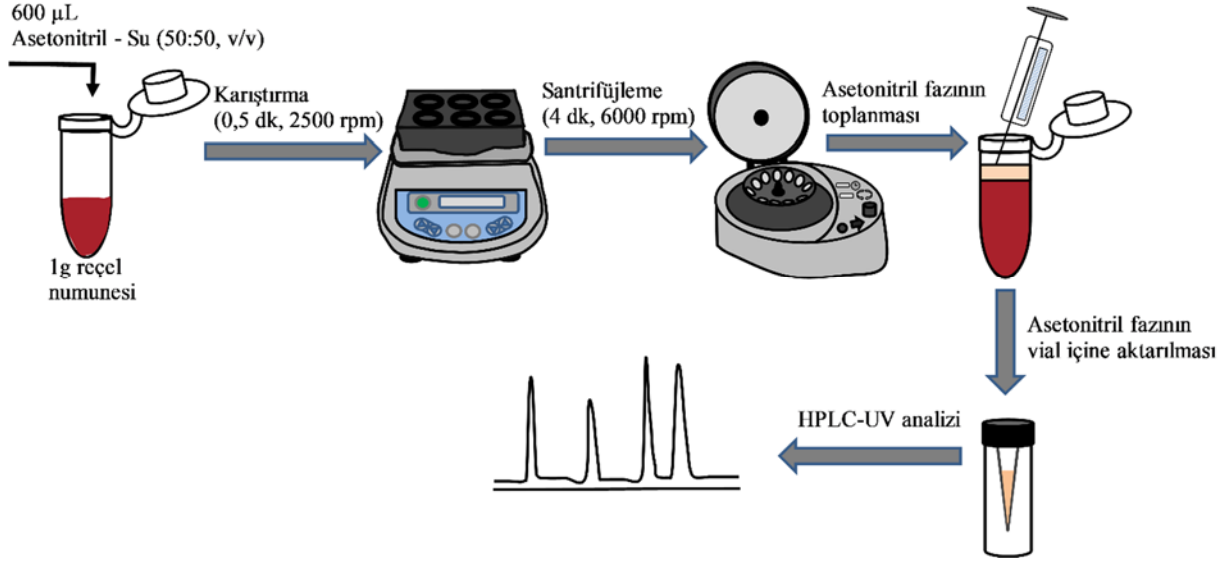
Çalışma kapsamında seçilen organofosforlu pestisit standartları, uygun miktarlarda tartılarak asetonitril içinde çözülmüş ve ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından yine asetonitril içinde her bir pestisiti 500 µg/mL konsantrasyonunda içerecek şekilde yeni bir stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin asetonitril ile seyreltilmesiyle daha düşük konsantrasyonlarda farklı ara stok çözeltiler hazırlanmış ve bu ara stok çözeltiler çalışmanın optimizasyon ve validasyon aşamalarında kullanılmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler kullanılmadıkları sürelerde buzdolabında +4 °C’de saklanmıştır.

2.3 ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışma kapsamında kullanılan vişne, çilek, böğürtlen, kayısı ve mavi yemiş reçelleri, Zonguldak’taki yerel süpermarketlerden temin edilmiştir. Örneklerin etiketlerinde belirtilen şeker oranı kütleye % 68-71 aralığındadır. Toplanan reçel örnekleri analiz öncesinde kendi orijinal kaplarında ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Ekstraksiyon işleminde reçel örneklerinin katı içermeyen akışkan kısımları kullanılmıştır.

2.4 ŞEKER DESTEKLİ SIVI-SIVI MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

Meyve reçeli örneklerindeki organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyonunda şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (SD-SSME) yöntemi kullanılmıştır. Kilit kapaklı Eppendorf tüpüne reçel örneklerinin akışkan kısımlarından 1 gram tartılıp üzerine 600 µL asetonitril-su (50:50, v/v) karışımı ilave edilmiştir. Ardından kapakları sıkıca kapatılan tüpler, yüksek hızlı çalkalayıcı ile 2500 rpm’de 0,5 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında 6000 rpm devirde 4 dakika süreli santrifüj işlemi uygulanmıştır. Son aşamada ise üst kısımda biriken asetonitril fazı (190 ± 5 µL) bir mikro-enjektör yardımıyla toplanmış ve HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Reçel örneklerine uygulanan prosedür optimize edilen koşullarda şematik olarak Şekil 2.3’de verilmiştir.

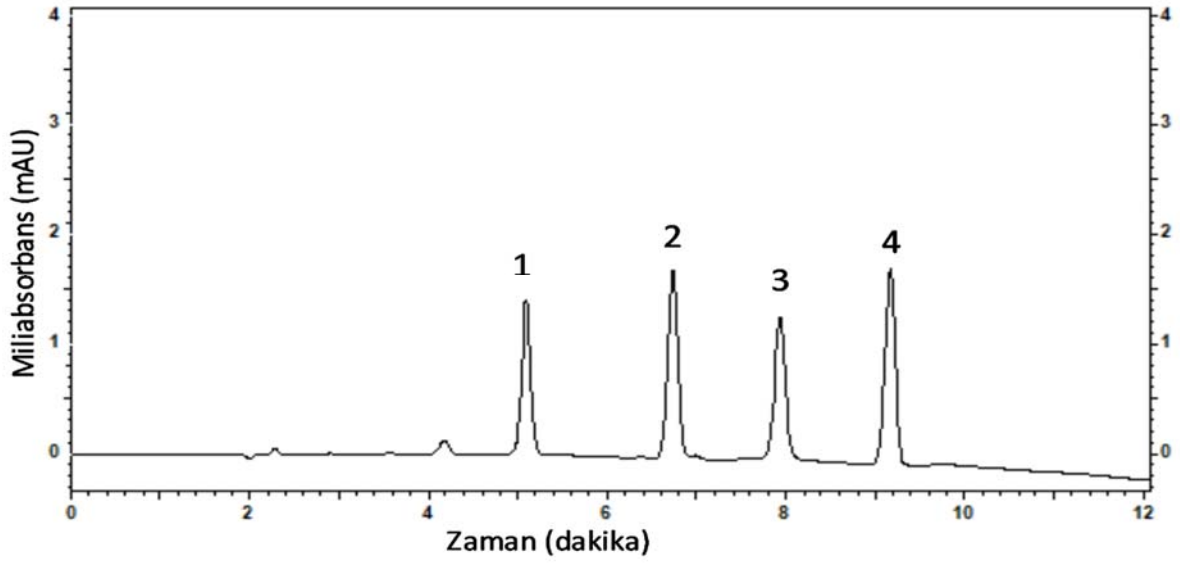


Şekil 2.1 Reçel örneklerine uygulanan şeker destekli sıvı-sıvı mikroeğstraksiyon yönteminin şematik gösterimi.

2.5 KROMATOGRAFİK ANALİZ KOŞULLARI

SD-SSME ile numune hazırlama sonrasında organofosforlu pestisitlerin kromatografik analizlerinde HPLC-UV kullanılmıştır. Phenomenex Max-RP (250x4,6 mm, 4µm) analitik kolon ile ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril ve su (% 0.1 trifloroasetik) kullanılmış ve 1 mL/dk akış hızıyla gradiyent elüsyon işlemi uygulanmıştır. Elüsyon işleminde asetonitril % 75 (v/v) ile başlamakta ve devamında doğrusal bir artışla 10 dakikada % 100'e ulaşmaktadır. Asetonitrilin tekrar doğrusal olarak %75'e düşmesi ise 5 dakikada gerçekleşmektedir. Bu koşulda analitik kolonun 5 dakika şartlanması sonrasında bir sonraki numunenin analizi yapılmaktadır. Analizler sırasında UV dalga boyu 225 nm ve numune enjeksiyon hacmi 20 µL olarak uygulanmıştır.

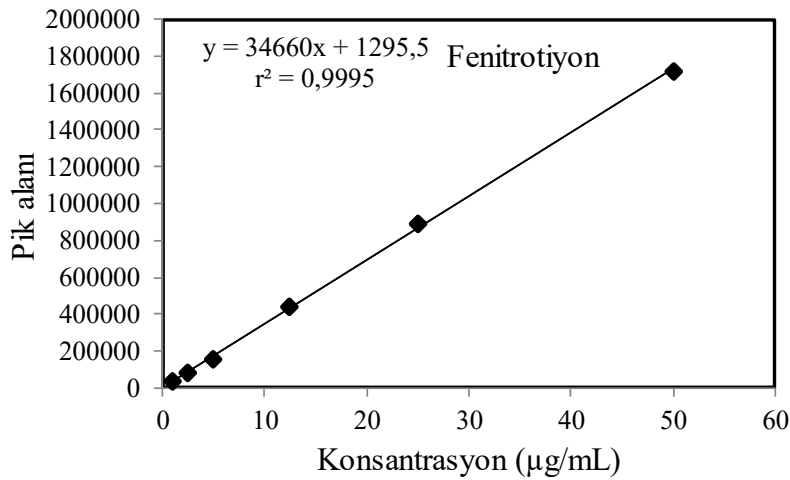
Kullanılan HPLC-UV analiz şartlarında, organofosforlu pestisitleri (fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos) içeren standart çözeltinin (25 µg/mL) HPLC-UV analizinden elde edilen kromatogram örnek olarak Şekil 2.2'de verilmiştir.



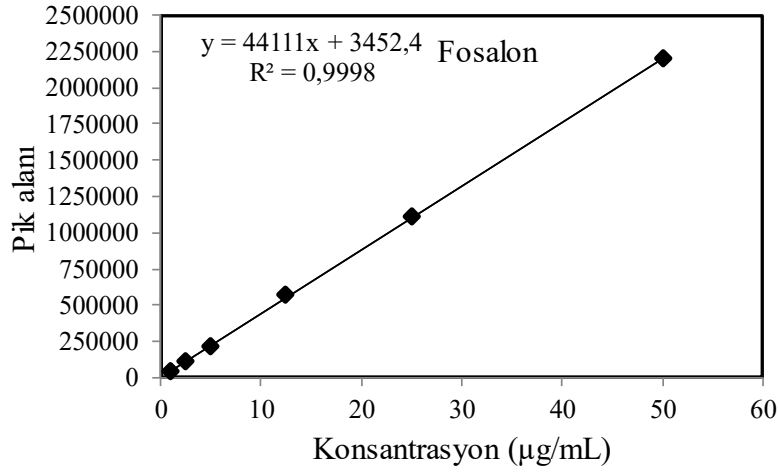
Şekil 2.2 Organofosforlu pestisitleri içeren standart çözeltinin (25 µg/mL) analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramı. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.

2.6 KROMATOĞRAFİK SİSTEMİN KALİBRASYONU

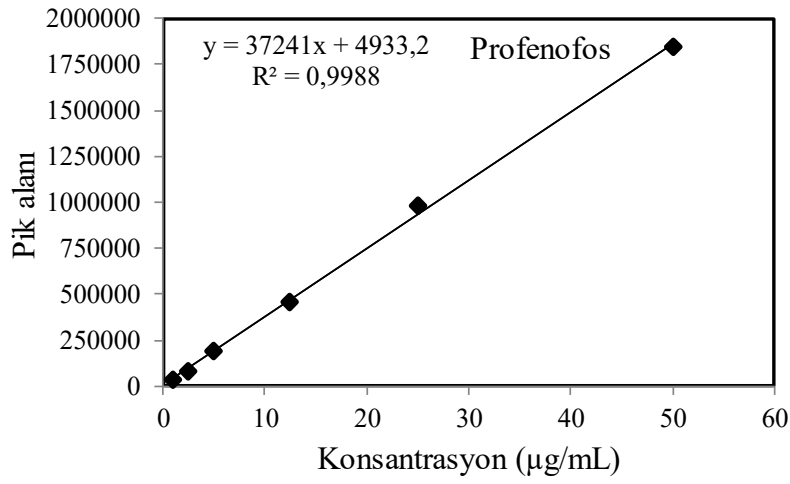
Kromatografik sistemin kalibrasyonu için organofosforlu pestisitleri içeren stok çözeltinin (500 µg/mL) asetonitril ile seyreltilmesiyle hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki (1 – 50 µg/mL) çözeltilerin HPLC-UV ile analizleri yapılmıştır. Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanmasında bileşiklere ait pik alanları ve konsantrasyon değerleri kullanılmıştır. Organofosforlu pestisitler için elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 2.3, Şekil 2.4, Şekil 2.5 ve Şekil 2.6 'da verilmiştir.



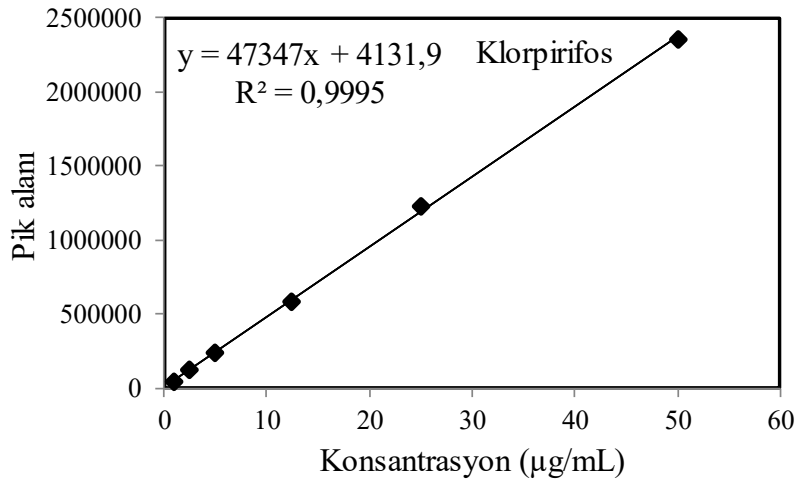
Şekil 2.3 Fenitrotiyon için elde edilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 2.4 Fosalon için elde edilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 2.5 Profenofos için elde edilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 2.6 Klorpirifos için elde edilen kalibrasyon grafiği.

Organofosforlu pestisitler için elde edilen kalibrasyon denklemleri ve belirleme katsayıları (r^2) Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Organofosforlu pestisitlerin kalibrasyona ait denklem ve belirleme katsayıları.

Organofosforlu pestisitler	Lineer aralık ($\mu\text{g/mL}$)	Kalibrasyon denklemi	Belirleme katsayısı (r^2)
Fenitrotiyon	1 – 50	$y = 34660x + 1295,5$	0,9995
Fosalon	1 – 50	$y = 44111x + 3452,4$	0,9998
Profenofos	1 – 50	$y = 37241x + 4933,2$	0,9988
Klorpirifos	1 – 50	$y = 47347x + 4131,9$	0,9995

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

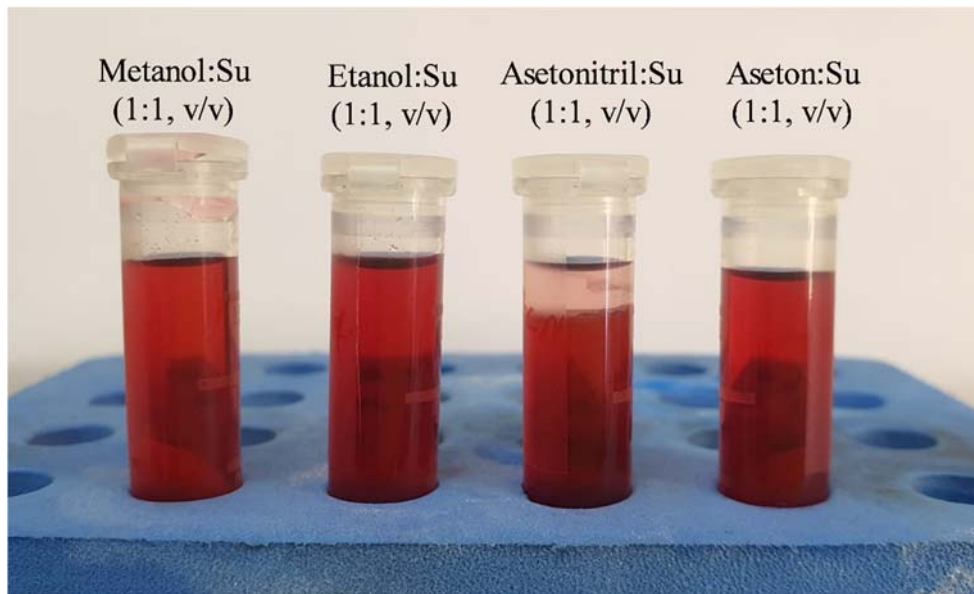
3.1 MİKROEKSTRAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Bu çalışmada, meyve reçeli örneklerindeki organofosforlu pestisitlerin (fenitrotiyon, fosalon, profenofos, klorpirifos) ekstraksiyonuna yönelik yeni bir şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (SD-SSME) yöntemi geliştirilmiştir. Reçel örneklerine su ve suyla karışabilen bir organik çözücünden meydana gelen homojen karışım mikrolitre hacimlerde ilave edilmiştir. Karıştırma ve santrifüj işlemleri sonrası üst kısımda ayrılan organik çözücü fazı toplanarak HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Homojen karışımda faz ayrımının gerçekleşmesi reçel örneğinin kendi şeker içeriği sayesinde gerçekleşmiştir. Söz konusu mikroekstraksiyon yöntemiyle en yüksek ekstraksiyon verimliliğine ulaşmak için değişik parametreler optimize edilmiştir. Suyla karışabilen çözücünün türü, çözücü karışımının bileşimi ve hacmi, karıştırma süresi ve pH gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonda, “bir seferde tek değişken” yaklaşımı kullanılmış ve incelenen parametre değiştirilirken, diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Bu işlemler sırasında ilgili pestisitleri içermeyen vişne reçeli örneği kullanılmış ve bu örneğe her seferinde 2,5 µg/g konsantrasyonunda organofosforlu pestisitleri içerecek şekilde standart çözelti ilavesi yapılmıştır. Bu amaçla, Eppendorf tüp içinde 1 g olarak tartılan reçel örneğine organofosforlu pestisitleri içeren 50 µg/mL konsantrasyonlu standart çözeltiden 50 µL ilave edilmiştir. Standart madde ilavesi yapılan reçel örneğinin önerilen yöntem ile ekstraksiyonu yapılmış ve sonrasında da HPLC-UV ile analiz işlemi gerçekleştirilmiştir. Optimum koşulların seçilmesinde ekstraksiyon verimleri ve yöntemin hassasiyeti esas alınmıştır. Ekstraksiyon verimleri, standart madde ilavesi yapılan numunede belirlenen pestisit miktarının başlangıçta numuneye ilave edilen pestisit miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

3.1.1 Suyla Karışabilen Çözücü Seçimi

Polar organik çözücülerini içeren homojen sulu karışımlarda şeker destekli faz ayrımının gerçekleştirilmesi ilk olarak 2008 yılında Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Asetonitril-su karışımına monosakkarit (glukoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz) veya disakkaritlerin (sakkaroz, maltoz) ilave edilmesiyle faz ayrımının meydana geldiği gözlenmiştir [58]. Bu çalışmayı takiben ilerleyen yıllarda çok sayıda şeker destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve bu çalışmalarda çoğunlukla suyla karışabilen çözücü olarak asetonitril tercih edilmiştir [60,66,88].

Bu çalışmada, en uygun suyla karışabilen çözücünün seçilmesi amacıyla organofosforlu pestisitleri içeren 1 g reçel örneği üzerine 1 mL çözücü-su (50:50, v/v) karışımı ilave edilmiştir. Suyla karışabilen çözücüler olarak metanol, etanol, asetonitril ve aseton kullanılmıştır. Ardından karışım yüksek hızlı çalkalayıcı ile 2500 rpm'de 1 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra 6000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve faz ayrımının meydana gelip gelmediği kontrol edilmiştir. Karışımların santrifüj sonrasındaki fotoğrafları Şekil 3.1'de verilmiştir. Santrifüjleme sonrasında sadece asetonitril-su karışımı kullanıldığında faz ayrımının meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle SD-SSME yönteminde suyla karışabilen çözücü olarak asetonitril seçilmiştir.

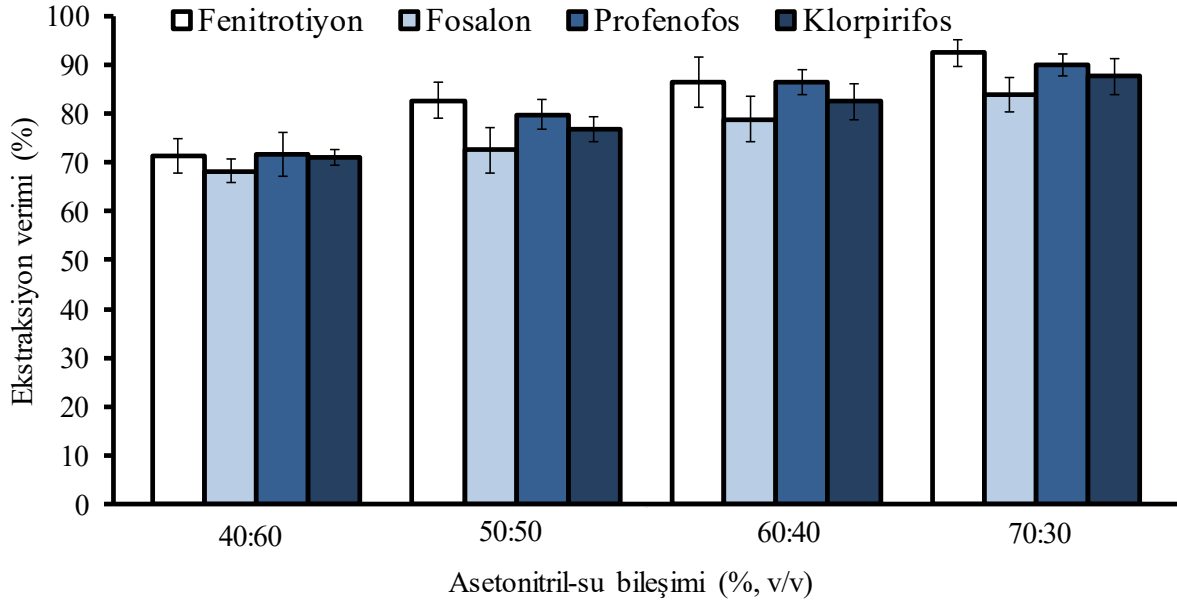


Şekil 3.1 SD-SSME yönteminde farklı çözücü-su karışımlarıyla elde edilen faz ayrımları.

3.1.2 Asetonitril-Su Karışımının Bileşiminin Seçimi

Asetonitril-su karışımı için en uygun bileşimin belirlenmesi amacıyla, organofosforlu pestisitleri içeren 1 g reçel örneği üzerine farklı bileşimlerde asetonitril-su karışımından 1 mL ilave edilmiştir. Asetonitril-su bileşimi hacimce yüzde esasına göre sırasıyla 40:60, 50:50, 60:40 ve 70:30 olacak şekilde hazırlanmış ve kullanılmıştır. Farklı bileşimdeki asetonitril-su karışımlarının reçel örneğine ilavesi sonrasında karışım yüksek hızlı çalkalayıcı ile 2500 rpm’de 1 dk boyunca karıştırılmış ve ardından 6000 rpm’de 4 dk santrifüj edilmiştir. Faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan asetonitril fazı mikroenjektör yardımıyla toplanarak HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Farklı bileşimde asetonitril-su karışımlarıyla elde edilen ekstraksiyon verimleri Şekil 3.2’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, 1 mL sabit hacimde kullanılan asetonitril-su karışımında asetonitril yüzdesinin 40’tan 70’e çıkarılmasıyla organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyon verimlerinde artış meydana gelmiştir. Bunun yanında çözücü karışımında asetonitril yüzdesinin artırılması, faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan asetonitril fazın hacminin de artmasına neden olmuştur. Asetonitril yüzdesinin 40, 50, 60 ve 70 olarak kullanıldığı koşullarda üst kısımda toplanan asetonitril fazlarının hacimleri sırasıyla 132 ± 3 , 320 ± 5 , 497 ± 3 ve 687 ± 3 μL olarak ölçülmüştür. Asetonitril-su karışımında asetonitril yüzdesinin artırılması hidrofobik özellikteki organofosforlu pestisitlerin daha fazla çözücü fazına transfer olmasına neden olmaktadır. Bu sebeple ekstraksiyon verimlerinde artış meydana gelmektedir. Ancak asetonitril-su karışımında asetonitril yüzdesinin artırılması aynı zamanda faz ayrımı sonrası toplanan asetonitril hacminin de artmasına neden olmaktadır. Bu durum analitler için seyrelme etkisi meydana getirdiğinden yöntemin hassasiyetinde azalmaya neden olmaktadır. Ekstraksiyon işlemlerinde çözücü hacminin artırılması genellikle ekstraksiyon verimliliği bakımından avantaj sağlarken, analitlerin tayin limitleri bakımından dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle, hem ekstraksiyon verimlerini hem de hassasiyeti orta seviyelerde tutmak için asetonitril-su bileşimi olarak 50:50 seçilmiştir.



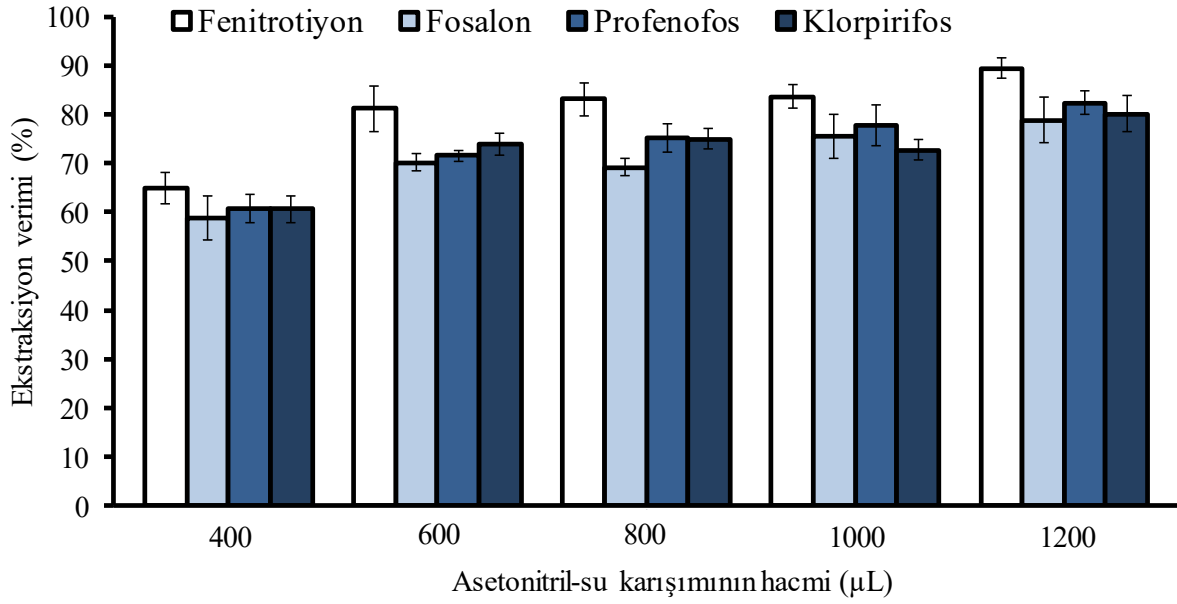
Şekil 3.2 Farklı bileşimlerde asetonitril-su karışımlarıyla elde edilen ekstraksiyon verimleri.

3.1.3 Asetonitril-Su Karışımının Hacminin Seçimi

Asetonitril-su karışımı (50:50, v/v) için en uygun hacmin belirlenmesi amacıyla, organofosforlu pestisitleri içeren 1 g reçel örneği üzerine farklı hacimlerde (400 – 1200 μ L) asetonitril-su karışımından ilave edilmiştir. Farklı hacimlerdeki asetonitril-su karışımlarının reçel örneğine ilavesi sonrasında karışım yüksek hızlı çalkalayıcı ile 2500 rpm’de 1 dk boyunca karıştırılmış ve ardından 6000 rpm’de 4 dk santrifüj edilmiştir. Faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan asetonitril fazı mikroyenjektör yardımıyla toplanarak HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Farklı hacimlerde asetonitril-su karışımlarıyla organofosforlu pestisitler için elde edilen ekstraksiyon verimleri Şekil 3.3’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, 50:50 (v/v) oranında sabit bileşimde kullanılan asetonitril-su karışımının hacminin 400 μ L’den 600 μ L’ye çıkarılmasıyla organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyon verimlerinde önemli bir artış meydana gelmiş, 600 μ L’nin üzerine çıktığında ise ekstraksiyon verimleri bazı analitler için değişmezken, bazı analitler için hafifçe artmaya devam etmiştir. Bunun yanında asetonitril-su karışımının hacminin artırılması, faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan asetonitril fazın hacminin de artmasına neden olmuştur. Asetonitril-su karışımının hacminin 400, 600, 800, 1000 ve 1200 μ L kullanıldığı koşullarda üst kısımda toplanan asetonitril fazlarının hacimleri sırasıyla 127 ± 3 , 188 ± 3 , 272 ± 6 , 322 ± 4 ve 400 ± 5 μ L

olarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon verimliliği ve yöntemin hassasiyeti göz önünde bulundurularak asetonitril-su karışımı (50:50, v/v) için en uygun hacim 600 µL olarak seçilmiştir.



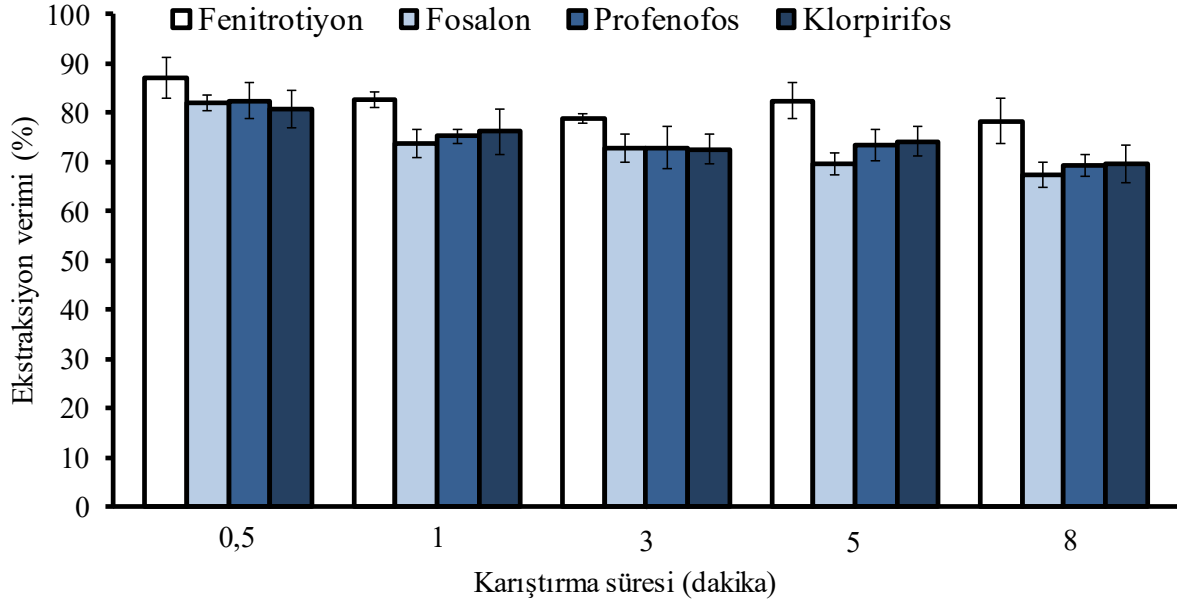
Şekil 3.3 Farklı hacimlerde asetonitril-su karışımıyla elde edilen ekstraksiyon verimleri.

3.1.4 Karıştırma Süresinin Seçimi

En uygun karıştırma süresinin belirlenmesi amacıyla, organofosforlu pestisitleri içeren 1 g reçel örneği üzerine 600 µL asetonitril-su (50:50, v/v) karışımı ilave edilmiş ve ardından yüksek hızlı çalkalayıcı ile farklı sürelerde (0,5 – 8 dk) karıştırma işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada karıştırma hızı 2500 rpm’de sabit tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında asetonitril fazının HPLC-UV ile analizi yapılmıştır. Farklı sürelerde karıştırma işlemi uygulandığında organofosforlu pestisitler için elde edilen ekstraksiyon verimleri Şekil 3.4’de verilmiştir.

Farklı sürelerde karıştırma işleminin uygulanmasıyla organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyon verimlerinde önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir. Başlangıç koşullarında reçel örneğine asetonitril-su karışımının ilave edilmesi ve kısa süreli bir karıştırma işlemiyle homojen bir karışım oluşmaktadır. Bu aşamada, numunedeki analitler ile ekstraksiyon çözücüsü arasındaki temas maksimum oranda gerçekleşmektedir. Bu nedenle de ekstraksiyon dengesi çok hızlı kurulduğundan uzun süren karıştırma işlemlerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Farklı sürelerde karıştırma işleminin uygulanması, faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan asetonitril fazının hacminde de önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir. Karıştırma süresinin 0,5, 1, 3, 5 ve

8 dk kullanıldığı koşullarda üst kısımda toplanan asetonitril fazının hacimleri sırasıyla 190 ± 5 , 188 ± 3 , 185 ± 5 , 183 ± 3 ve 182 ± 3 μL olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre karıştırma süresinin artırılması, ekstraksiyon verimliliği bakımından önemli bir artış sağlamamaktadır. Bu nedenle karıştırma süresi olarak 0,5 dk seçilmiştir.



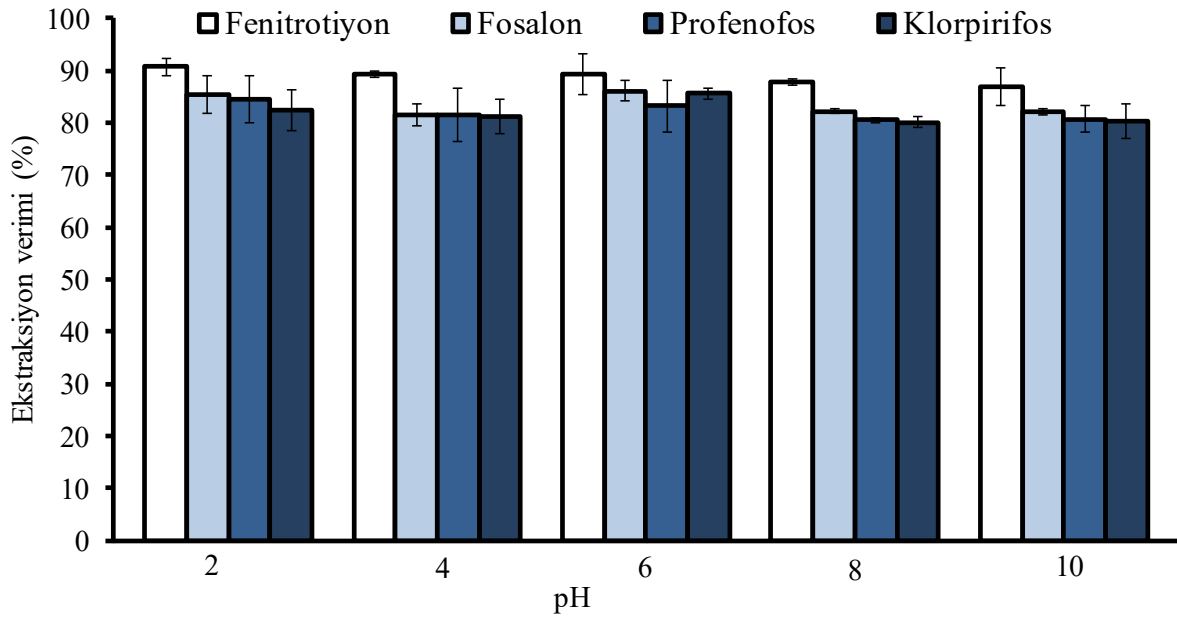
Şekil 3.4 Farklı karıştırma sürelerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri.

3.1.5 pH Seçimi

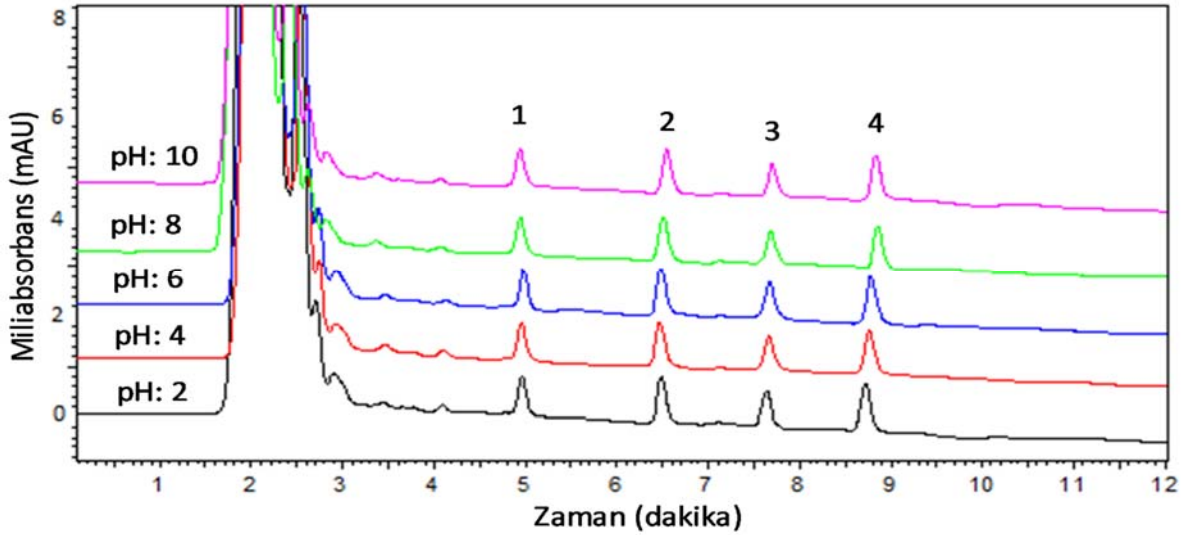
En uygun pH'nın belirlenmesi amacıyla, farklı pH'lara sahip su kullanılarak asetonitril-su (50:50, v/v) karışımları hazırlanmış ve bu karışımlar reçel örneklerindeki organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Farklı pH'lara sahip suların hazırlanmasında 0,1M fosfat tamponu kullanılmış ve ardından istenilen pH değerine ulaşmak için 1M HCl veya 1M NaOH çözeltileri damla damla ilave edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında asetonitril-su (50:50, v/v) karışımının hacmi 600 μL ve karıştırma süresi 0,5 dk olarak sabit tutulmuştur. Farklı pH'larda yapılan ekstraksiyon işlemi sonrasında organofosforlu pestisitler için elde edilen ekstraksiyon verimleri Şekil 3.5'de verilmiştir. Ayrıca, farklı pH'larda yapılan ekstraksiyon ve analiz sonrasında elde edilen HPLC-UV kromatogramları örnek olarak Şekil 3.6'da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, pH'nın 2 ile 10 arasında değiştirilmesiyle organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyon verimlerinde önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir. Farklı pH'larda ekstraksiyon işleminin uygulanması, faz ayrımı sonrasında üst kısımda toplanan

asetonitril fazının hacminin hafifçe artmasına neden olmuştur. Ekstraksiyonda, pH'nın 2, 4, 6, 8 ve 10 olarak ayarlandığı koşullarda üst kısımda toplanan asetonitril fazının hacimleri sırasıyla 180 ± 5 , 193 ± 3 , 197 ± 3 , 208 ± 3 ve 212 ± 3 μL olarak ölçülmüştür. Bu çalışma kapsamında kullanılan fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos için literatürde pKa değeri rapor edilmemiştir. Dolayısıyla bu bileşikler, sulu ortamda geniş bir pH aralığında iyonlaşmadan kalabilmektedir. Bu sayede ekstraksiyon sırasında ortamın pH'sından etkilenmeden organik çözücü fazına transfer oldukları değerlendirilmektedir. Ekstraksiyon verimlerinde önemli bir değişiklik meydana gelmediğinden dolayı bu çalışma kapsamında pH ayarlama işlemi yapılmamıştır.



Şekil 3.5 Farklı pH'larda organofosforlu pestisitler için elde edilen ekstraksiyon verimleri.



Şekil 3.6 Farklı pH’larda yapılan ekstraksiyon ve analiz sonrasında elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.

3.2 SD-SSME YÖNTEMİNİN ANALİTİK PERFORMANSI

SD-SSME yönteminin analitik performansı optimize edilmiş koşullar altında incelenmiştir. SD-SSME yöntemi için belirlenen doğrusallık, belirleme katsayısı, algılama limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve kesinlik sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Organofosforlu pestisitler için doğrusallık, 0,05 ile 5 µg/g konsantrasyon aralığında incelemiştir. Bu konsantrasyon aralığında organofosforlu pestisitleri içeren vişne reçeli örneklerinin SD-SSME yöntemi ile ekstraksiyonu ve ardından HPLC-UV ile analizlerinden elde edilen sonuçlarla kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Organofosforlu pestisitler için elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 3.7’de verilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin belirleme katsayıları (r^2), 0,9992 değerinin üzerindedir.

Metot algılama limitleri (LOD), organofosforlu pestisitler için sinyal/gürültü (S/N) oranı 3 alınarak, metot tayin limitleri (LOQ) ise S/N oranı 10 alınarak hesaplanmıştır. Organofosforlu pestisitler için LOD değerleri 12–25 µg/kg, LOQ değerleri ise 41–83 µg/kg aralığında bulunmuştur.

SD-SSME yönteminin kesinliği gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik olarak belirlenmiştir. Organofosforlu pestisitleri 1 µg/g konsantrasyonunda içeren vişne reçeli örneği gün içerisinde üç kez ve sıralı üç gün boyunca analiz edilmiştir. Yöntemin gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliği yüzde bağıl standart sapma (% RSD) olarak hesaplanmıştır. Organofosforlu pestisitler için gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla % 3,2–5,1 ve % 2,5–

7,9 arasında değişiklik göstermiştir. Optimum koşullardaki ortalama ekstraksiyon verimleri, fenitrotiyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos için sırasıyla % 89, 83, 81 ve 82 olarak bulunmuştur.

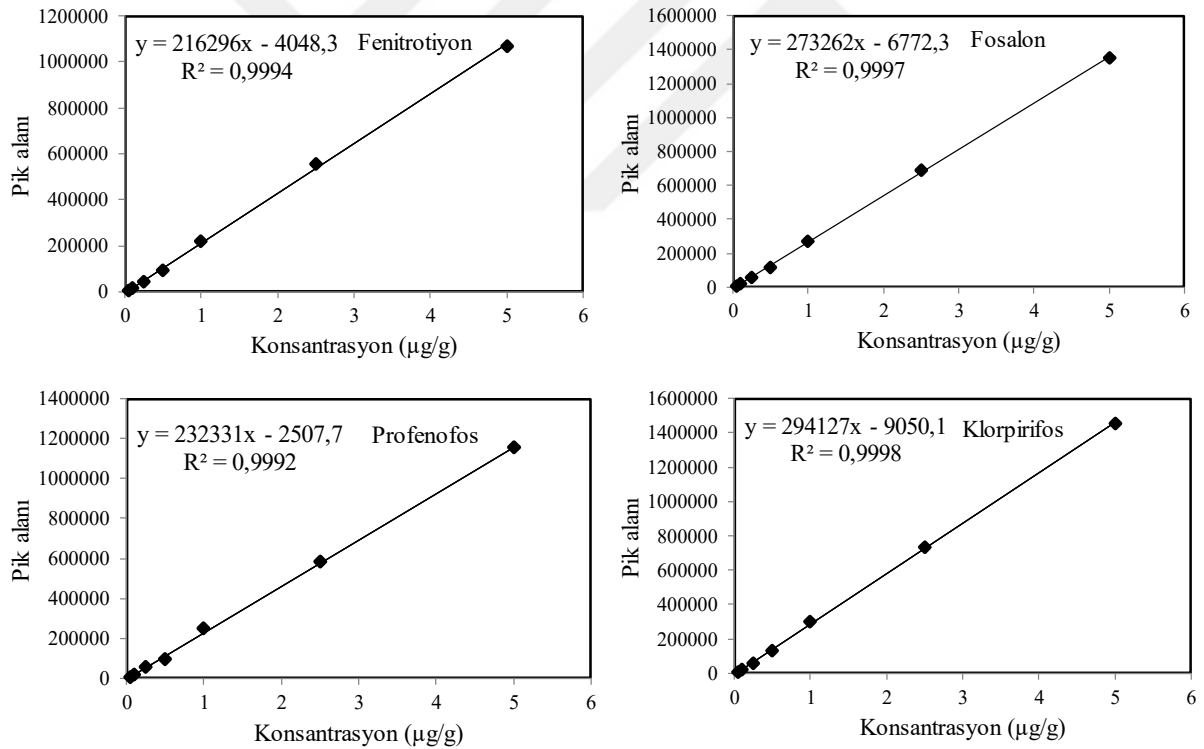
Çizelge 3.1 SD-SSME yönteminin analitik performans parametreleri.

Organofosfat pestisitler	Lineer aralık (µg/g)	Kalibrasyon denklemini	r^2	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)	EV ^c (%)
Fenitrotiyon	0,05-5	$y = 216296x - 4048$	0,9994	12	41	4,1	2,5	89
Fosalon	0,05-5	$y = 273262x - 6772$	0,9997	15	51	4,3	5,6	83
Profenofos	0,05-5	$y = 232331x - 2508$	0,9992	25	83	5,1	4,2	81
Klorpirifos	0,05-5	$y = 294127x - 9050$	0,9998	18	58	3,2	7,9	82

^aGün-içi tekrarlanabilirlik (1 µg/g, n = 3).

^bGünler-arası tekrarlanabilirlik (1 µg/g, n = 3)

^cEkstraksiyon verimi (2,5 µg/g, n = 5)



Şekil 3.7 SD-SSME yöntemiyle organofosforlu pestisitler için elde edilen kalibrasyon grafikleri.

3.3 SD-SSME YÖNTEMİNİN FARKLI REÇEL ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI

SD-SSME yönteminin doğruluğu, organofosforlu pestisitlerin ilave edildiği farklı meyve reçeli örneklerinin analiz edilmesiyle test edilmiştir. Bu amaçla vişne, çilek, böğürtlen, kayısı ve mavi yemiş reçelleri kullanılmıştır. İncelenen reçel örneklerinde organofosforlu pestisitler tespit edilmemiştir. Dolayısıyla aynı reçel örneklerine 0,25 µg/g ve 2,5 µg/g konsantrasyonlarında olacak şekilde organofosforlu pestisitler ilave edilmiş ve sonrasında önerilen yöntem ile analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

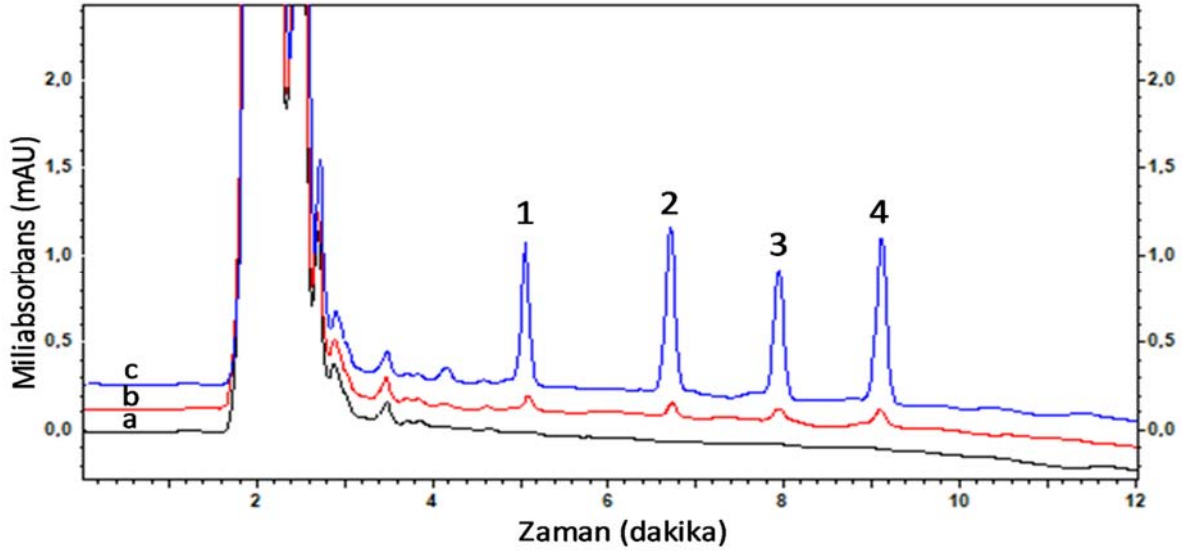
Organofosforlu pestisitlerin eklendiği reçellerin SD-SSME-HPLC-UV yöntemiyle analizleri sonrasında tespit edilen konsantrasyonların ekleme yapılarak oluşturulan konsantrasyon değerlerine oranlanmasıyla organofosforlu pestisitler için yüzde bağıl geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Analizler, düşük ve yüksek konsantrasyon değerleri için üç kez tekrarlanmış ve tekrarlı analiz sonuçlarından yöntemin yüzde bağıl standart sapması (% RSD) hesaplanmıştır. Reçel örneklerindeki organofosfat pestisitler için bulunan bağıl geri kazanım değerleri ve % RSD değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Reçel örneklerine uygulanan SD-SSME-HPLC-UV yöntemiyle organofosforlu pestisitler için geri kazanım değerlerinin % 89 ile % 107, RSD değerlerinin ise % 1,2 ile % 6,1 arasında değişim gösterdiği bulunmuştur.

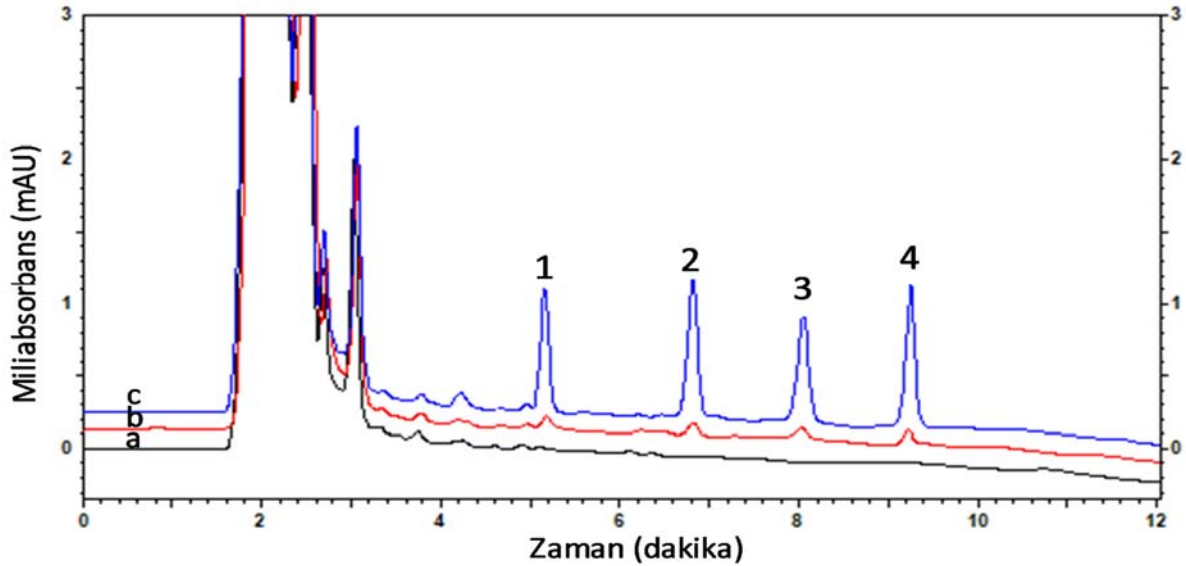
Çizelge 3.2 Standart madde eklenen meyve reçellerinin analizlerinden elde edilen yüzde geri kazanım ve RSD değerleri.

Reçel Örnekleri	Eklenen (µg/g)	Fenitrotyon		Fosalon		Profenofos		Klorpirifos	
		Geri kazanım (%)	RSD (%)	Geri kazanım (%)	RSD (%)	Geri kazanım (%)	RSD (%)	Geri kazanım (%)	RSD (%)
Vişne	0,25	94	4,8	95	3,9	103	3,9	91	2,4
	2,5	106	3,3	102	2,0	101	2,8	98	3,8
Çilek	0,25	95	6,1	103	1,6	91	5,6	102	4,4
	2,5	107	5,2	104	3,9	104	3,8	102	3,1
Böğürtlen	0,25	102	2,6	103	5,9	92	1,3	102	4,2
	2,5	104	4,5	104	4,8	99	3,1	103	3,5
Kayısı	0,25	103	3,4	103	3,0	97	2,0	98	1,6
	2,5	105	4,4	105	2,9	104	3,0	106	3,5
Mavi yemiş	0,25	89	4,6	95	4,0	90	2,9	96	2,2
	2,5	97	1,2	99	3,9	101	5,0	99	5,8

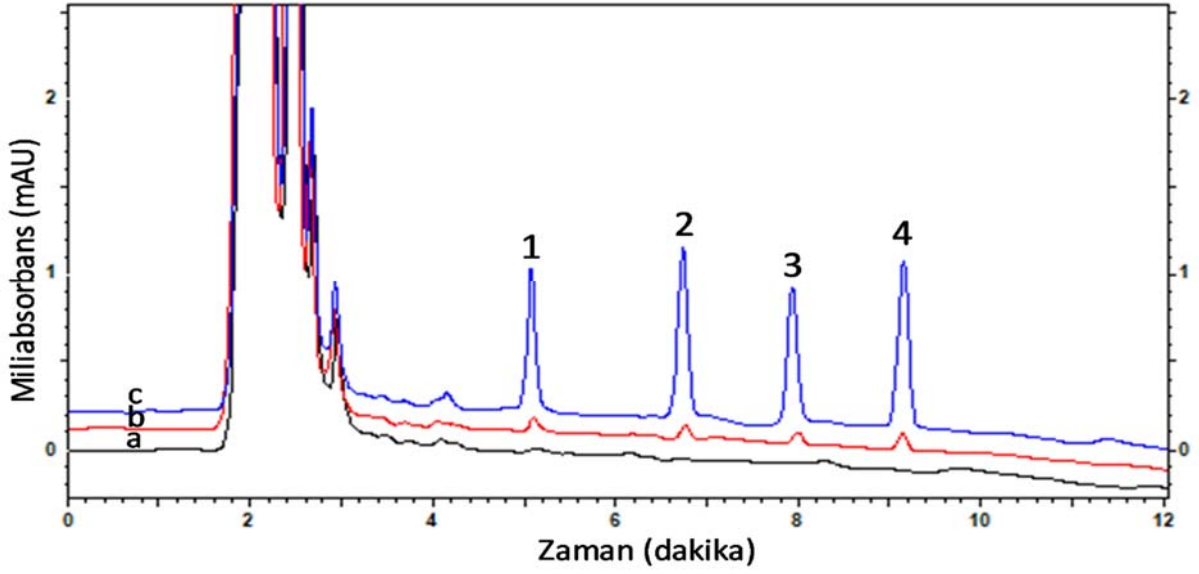
Standart madde ilavesi yapılmayan ve yapılan farklı meyve reçellerinin SD-SSME yöntemi sonrasında HPLC-UV ile analizlerinden elde edilen örnek kromatogramlar Şekil 3.8-Şekil 3.12’de verilmiştir.



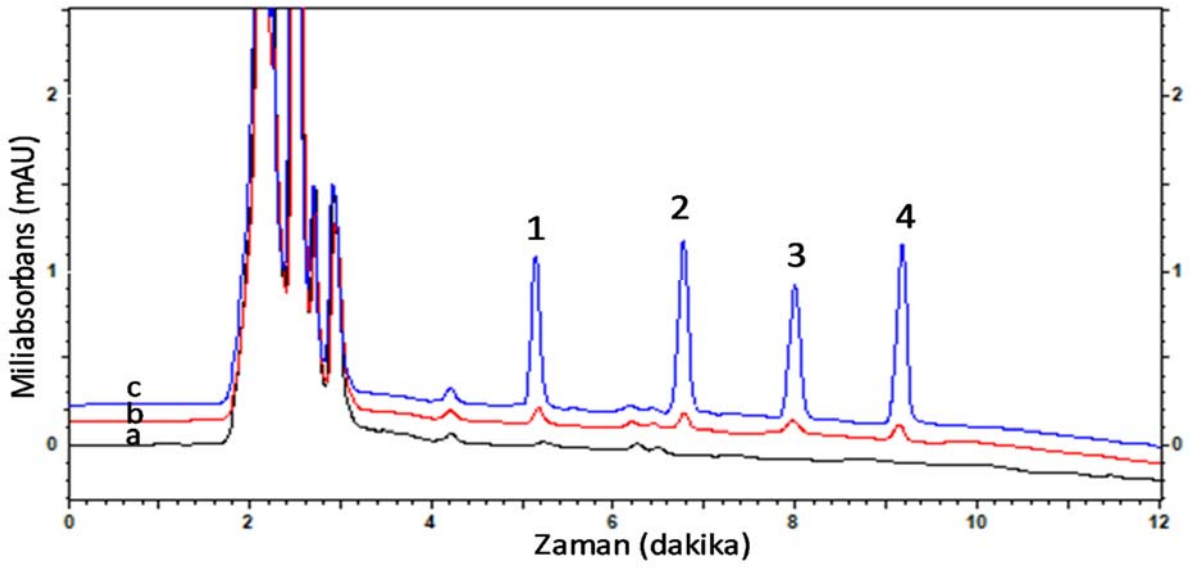
Şekil 3.8 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 $\mu\text{g/g}$ ve c) 2,5 $\mu\text{g/g}$ olacak şekilde standart madde eklenen vişne reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.



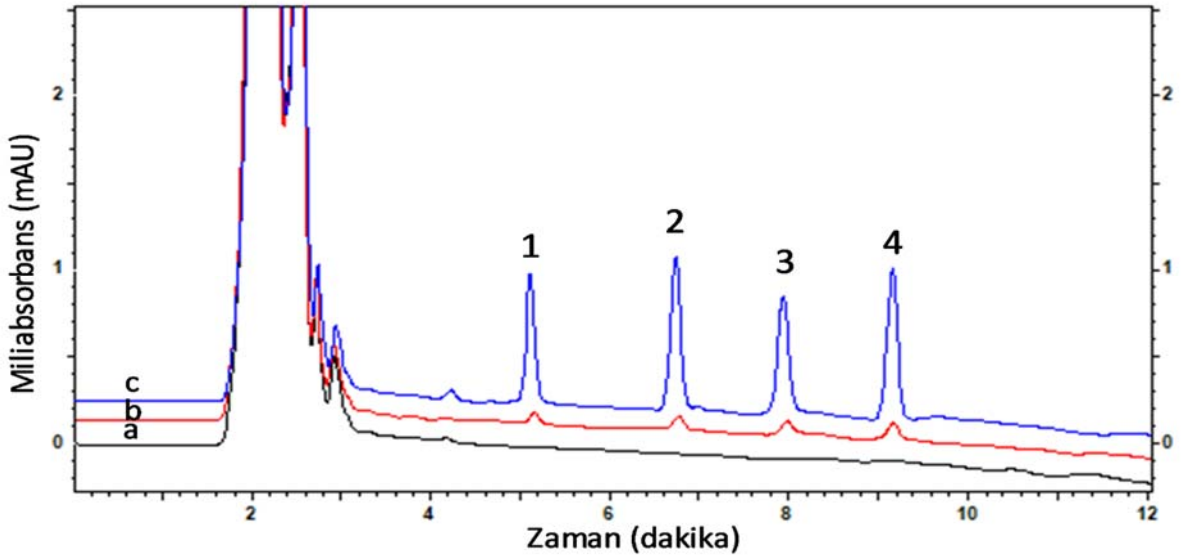
Şekil 3.9 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 $\mu\text{g/g}$ ve c) 2,5 $\mu\text{g/g}$ olacak şekilde standart madde eklenen çilek reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.



Şekil 3.10 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 $\mu\text{g/g}$ ve c) 2,5 $\mu\text{g/g}$ olacak şekilde standart madde eklenen böğürtlen reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.



Şekil 3.11 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 $\mu\text{g/g}$ ve c) 2,5 $\mu\text{g/g}$ olacak şekilde standart madde eklenen kayısı reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.



Şekil 3.12 a) Standart madde eklenmeyen ve b) 0,25 µg/g ve c) 2,5 µg/g olacak şekilde standart madde eklenen mavi yemiş reçelinin SD-SSME sonrası analizinden elde edilen HPLC-UV kromatogramları. 1: Fenitrotiyon, 2: Fosalon, 3: Profenofos, 4: Klorpirifos.

3.4 LİTERATÜRDEKİ YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRMA

Bu çalışma kapsamında geliştirilen SD-SSME yöntemi, literatürdeki organofosforlu pestisitlerin bazı katı numunelerde tayini için kullanılan yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada, numune hazırlama süresi, LOD, RSD ve geri kazanım gibi bazı analitik performans parametreleri dikkate alınmıştır. Karşılaştırma detayları Çizelge 3.3’de özetlenmiştir. SD-SSME yönteminin numune hazırlama basamağında kullanılan temel işlemler için harcanan süre, diğer yöntemlerde harcanan sürelerle kıyasla oldukça kısadır. SD-SSME yönteminde temel işlemler için harcanan süre yaklaşık 4,5 dakika iken, diğer yöntemlerin çoğunda bu süre 20 dakikadan daha fazladır. Diğer yöntemlerde ekstraksiyon dengesine ulaşmak için uzun süreli karıştırma işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. SD-SSME yönteminde ise ekstraksiyon çözücüsü olarak suyla her oranda karışabilen asetonitril kullanılmaktadır. Yöntemin ilk aşamasında reçel örneğine asetonitril:su karışımının ilave edilmesi ve sonrasında kısa süren bir karıştırma işlemiyle ekstraksiyon çözücüsünün numune içinde dağılması büyük oranda gerçekleşmektedir. Bu sayede analit-çözücü etkileşimi çok kısa bir sürede dengeye ulaşmaktadır. Kesinlik ile ilgili olarak, önerilen SD-SSME yönteminin RSD değerleri, diğer yöntemler için bildirilenlerden daha iyi veya bunlarla karşılaştırılabilir niteliktedir. Doğruluk ile ilgili kıyaslama yapıldığında ise, organofosforlu pestisitlerin ilave edildiği reçel örneklerinden elde edilen geri kazanım değerlerinin, diğer yöntemlerde rapor edilenlerle benzerlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Genel olarak incelenen yöntemlerde % 74’den daha

yüksek geri kazanım değerleri rapor edilmiştir. SD-SSME yöntemi, rapor edilen diğer yöntemlere kıyasla tatmin edici bir hassasiyet sağlamasa da, az miktarda numune kullanarak doğru analiz, iyi kesinlik ve yüksek ekstraksiyon verimliliği sağlamaktadır.

Çizelge 3.3 SD-SSME yönteminin literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırılması.

Metot	Analit	Örnek Tipi ve Miktarı	Temel işlemler ve harcanan süre	LOD (µg/kg)	RSD (%)	Geri kazanım (%)	Ref.
UD-DSSME-HPLC-UV	Fosalon Klorpirifos	Sebze (1 g)	Sonikasyon (30 dk) Santrifüj (6 dk) Katılaştırma (5 dk)	2-8	<9,0	91-109	[89]
UD-DSSME-HPLC-UV	Fenitrotiyon Fosalon Profenofos Klorpirifos	Meyve ve sebze (1 g)	Sonikasyon (25 dk) Santrifüj (7 dk) Katılaştırma (5 dk)	1-4	<9,0	88-110	[90]
KFE-DSSME-GC-FID	Fosalon Klorpirifos	Meyve (7 g)	Karıştırma (4 dk) Kurutma (5 dk) Sonikasyon (4 dk) Santrifüj (5 dk)	1-6	<9	81-107	[91]
SDSSE-DSSME-GC-MS	Fenitrotiyon Fosalon Profenofos Klorpirifos	Pekmez (0,5 g)	Sonikasyon (5 dk) Santrifüj (4 dk)	0,8-6,1	<5,6	79-100	[70]
BNE-HPLC-PDA	Fenitrotiyon Klorpirifos	Meyve (10 g)	Karıştırma (60 dk) Santrifüj (30 dk)	5-10	<5,8	78-95	[92]
MMBP-HPLC-UV	Klorpirifos	Pirinç (2 g)	Sonikasyon (10 dk) Santrifüj (5 dk) Karıştırma (10 dk)	7,2	<4,6	81-92	[93]
IS-DSSME-HPLC-DAD	Klorpirifos	Tahıl (2 g)	Karıştırma (15 dk) Sonikasyon (3 dk) Santrifüj (15 dk)	4,5	<2.8	99-102	[94]
QuEChERS-GC-MS	Fenitrotiyon Fosalon	Salatalık (10 g)	Karıştırma (3 dk) Santrifüj (2 dk)	1-4	<17	74-91	[95]
SD-SSME-HPLC-UV	Fenitrotiyon Fosalon Profenofos Klorpirifos	Reçel (1 g)	Karıştırma (0,5 dk) Santrifüj (4 dk)	12-25	<7.9	89-107	Bu çalışma

UD-DSSME: Ultrasonik destekli-dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon; KFE-DSSME: Katı-faz ekstraksiyon-dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon; SDSSE-DSSME: Şeker destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon-dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon; BNE: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu; MMBP: Manyetik molekül baskılı polimer; IS-DSSME: İyonik sıvı destekli dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon; QuEChERS: Hızlı, kolay, ucuz, etkili, dayanıklı ve güvenilir ekstraksiyon yöntemi; SD-SSME: Şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon; HPLC: Yüksek performans sıvı kromatografisi; GC: Gaz kromatografisi; UV: Ultraviyole dedektör; FID: Alev iyonlaşma dedektörü; MS: Kütle spektrometresi; PDA: Fotodiyot dizi dedektörü; DAD: Diyet dizi dedektör.

3.5 GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, meyve reçellerindeki bazı organofosforlu pestisitlerin ekstraksiyonu ve analizi için basit ve hızlıca uygulanabilen şeker destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi (SD-SSME) geliştirilmiştir. Yöntemde, ekstraksiyon çözücüsü olarak suyla karışabilen bir çözücü olan asetonitril kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında faz ayrımı, reçel örneğinin kendi şeker içeriği sayesinde gerçekleşmektedir. Son aşamada ise analitleri içeren asetonitril fazının HPLC-UV ile analizleri gerçekleştirilmektedir.

Seçilen dört organofosforlu pestisit için yüksek ekstraksiyon verimleri elde etmek için çeşitli deneysel parametreler sistematik olarak incelenmiş ve en uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Suyla karışabilen çözücü olarak asetonitril, asetonitril-su bileşimi olarak 50:50 (v/v), asetonitril-su karışımının hacmi olarak 600 µL ve karıştırma süresi olarak 0,5 dakika seçilmiştir. Ekstraksiyon performansında dikkate değer bir farklılık meydana gelmediğinden dolayı bu çalışma kapsamında pH ayarlama işlemi yapılmamıştır. Optimum koşullarda fenitrotyon, fosalon, profenofos ve klorpirifos için ortalama ekstraksiyon verimleri sırasıyla % 89, 83, 81 ve 82 olarak bulunmuştur.

SD-SSME yönteminin analitik performansı optimize edilen deneysel koşullar altında incelenmiştir. Organofosforlu pestisitler için doğrusallık, 0,05 ile 5 µg/g konsantrasyon aralığında incelenmiş ve 0,9992 değerinin üzerinde belirleme katsayıları (r^2) elde edilmiştir. Organofosforlu pestisitler için LOD değerleri 12–25 µg/g, LOQ değerleri ise 41–83 µg/g aralığında bulunmuştur. Gün-ici ve günler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları ise sırasıyla % 3,2–5,1 ve % 2,5–7,9 arasında değişiklik göstermiştir.

SD-SSME yönteminin doğruluğu, standart madde ilave edilmiş (0,25 µg/g ve 2,5 µg/g) farklı meyve reçeli örneklerinden organofosforlu pestisitlerin geri kazanımı hesaplanarak incelenmiştir. Bu amaçla vişne, çilek, böğürtlen, kayısı ve mavi yemiş reçelleri kullanılmıştır. Organofosforlu pestisitler için geri kazanım değerleri % 89–107, RSD değerlerinin ise % 1,2–6,1 olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada, meyve reçellerinde organofosforlu pestisitlerin belirlenmesi için SD-SSME ile HPLC-UV'yi birleştiren hızlı ve kolay bir numune hazırlama prosedürü sunulmaktadır. Asetonitril ihtiyaç duyulan tek kimyasal olduğundan ve homojen çözeltiden faz ayrımı, numune matrisinin yüksek şeker içeriğinin desteği ile gerçekleştiğinden, yöntem ucuzdur ve çevre dostudur. Analitlerin ilave edildiği reçel numuneleri ile elde edilen tatmin edici geri kazanımlar, yöntem için yüksek güvenilirlik ve uygulanabilirlik ortaya koymaktadır. SD-SSME yönteminin, daha hassas kütle spektrometrik dedektörlerle birleştirilmesi durumunda, şeker açısından zengin bazı gıdalarda çok sayıda kirleticinin taranması için gelecekte uygulamalar bulabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] **Songa E A and Okonkwo J O** (2016) Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. *Talanta*, 155, 289–304.
- [2] **Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P and Hens L** (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health*, 4, 148.
- [3] **Lewis K A, Tzilivakis J, Warner D J and Green A** (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.*, 22, 1050–1064.
- [4] **Yan X, Li H and Su X** (2018) Review of optical sensors for pesticides. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 103, 1–20.
- [5] **Yadav I C and Devi N L** (2017) Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environ. Sci. Eng.*, 6, 140–158.
- [6] **Pundir C S and Malik A** (2019) Bio-sensing of organophosphorus pesticides: a review. *Biosens. Bioelectron.*, 140, 111348.
- [7] **Kwong T C** (2002) Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.*, 24, 144–149.
- [8] **Pehkonen S O and Zhang Q** (2002) The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 32, 17–72.
- [9] **Pundir C S and Chauhan N** (2012) Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.*, 429, 19–31.
- [10] **Debayle D, Dessalces G and Grenier-Loustalot M F** (2008) Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1011–1020.
- [11] **Parrilla P, Vidal J L, Galera M M and Frenich A G** (1994) Simple and rapid screening procedure for pesticides in water using SPE and HPLC/DAD detection. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 633–637.
- [12] **Hart E, Coscollà C, Pastor A and Yusà V** (2012) GC–MS characterization of contemporary pesticides in PM10 of Valencia Region, Spain. *Atmos. Environ.*, 62, 118–129.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [13] **Xu L, Basheer C and Lee H K** (2007) Developments in single-drop microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1152, 184–192.
- [14] **Spietelun A, Marcinkowski Ł, de la Guardia M and Namieśnik J** (2014) Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, 119, 34–45.
- [15] **Poole C F** (2003) New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 22, 362–373.
- [16] **Plotka-Wasyłka J, Owczarek K and Namieśnik J** (2016) Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 85, 46–64.
- [17] **Tobiszewski M, Mechlińska A, Zygmunt B and Namieśnik J** (2009) Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 28, 943–951.
- [18] **Farajzadeh M A, Nouri N and Khorram P** (2014) Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 55, 14–23.
- [19] **Arthur C L and Pawliszyn J** (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145–2148.
- [20] **Risticvic S, Lord H, Gorecki T, Arthur C L and Pawliszyn J** (2010) Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nat. Protoc.*, 5, 122–139.
- [21] **Lord H and Pawliszyn J** (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, 885, 153–193.
- [22] **Kataoka H, Lord H L and Pawliszyn J** (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 880, 35–62.
- [23] **Prosen H and Zupančič-Kralj L** (1999) Solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 18, 272–282.
- [24] **Sarafraz-Yazdi A and Amiri A** (2010) Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 29, 1–14.
- [25] **Yamini Y, Rezazadeh M and Seidi S** (2019) Liquid-phase microextraction—The different principles and configurations. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 112, 264–272.
- [26] **Liu H and Dasgupta P K** (1996) Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal. Chem.*, 68, 1817–1821.
- [27] **Psillakis E and Kalogerakis N** (2002) Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 21, 54–64.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [28] **Han D, Tang B, Ri Lee Y and Ho Row K** (2012) Application of ionic liquid in liquid phase microextraction technology. *J. Sep. Sci.*, 35, 2949–2961.
- [29] **Tang S, Qi T, Ansah P D, Fouemina J C N, Shen W, Basheer C and Lee H K** (2018) Single-drop microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 108, 306–313.
- [30] **Zanjani M R K, Yamini Y, Shariati S and Jönsson J A** (2007) A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Anal. Chim. Acta*, 585, 286–293.
- [31] **Dadfarnia S, Salmanzadeh A M and Shabani A M H** (2008) A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 623, 163–167.
- [32] **Leong M-I and Huang S-D** (2008) Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*, 1211, 8–12.
- [33] **Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M-R M, Aghaee E, Ahmadi F and Berijani S** (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1116, 1–9.
- [34] **Zgola-Grześkowiak A and Grześkowiak T** (2011) Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 30, 1382–1399.
- [35] **Xiao-Huan Z, Qiu-Hua W U, Zhang M-Y, Guo-Hong X I and Zhi W** (2009) Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chin. J. Anal. Chem.*, 37, 161–168.
- [36] **Rezaee M, Yamini Y and Faraji M** (2010) Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2342–2357.
- [37] **Pedersen-Bjergaard S and Rasmussen K E** (1999) Liquid– liquid– liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71, 2650–2656.
- [38] **Rasmussen K E and Pedersen-Bjergaard S** (2004) Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 23, 1–10.
- [39] **Lee J, Lee H K, Rasmussen K E and Pedersen-Bjergaard S** (2008) Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. *Anal. Chim. Acta*, 624, 253–268.
- [40] **Psillakis E and Kalogerakis N** (2003) Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *J. Chromatogr. A*, 999, 145–153.
- [41] **Lasarte-Aragonés G, Lucena R, Cárdenas S and Valcárcel M** (2011) Effervescence-assisted dispersive micro-solid phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 1218, 9128–9134.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [42] **Lasarte-Aragonés G, Lucena R, Cárdenas S and Valcárcel M** (2014) Effervescence assisted dispersive liquid–liquid microextraction with extractant removal by magnetic nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, 807, 61–66.
- [43] **Liu X, Liu C, Wang P, Yao G, Liu D and Zhou Z** (2018) Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on cohesive floating organic drop for the determination of herbicides and fungicides in water and grape juice. *Food Chem.*, 245, 653–658.
- [44] **Sorouraddin S M, Farajzadeh M A and Qarajeh H N** (2019) Phthalic acid as complexing agent and co-disperser for analysis of zinc and cadmium at trace levels from high volumes of sample on the base of an effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *Microchem. J.*, 147, 886–893.
- [45] **Molaei S, Saleh A, Ghoulipour V and Seidi S** (2016) Centrifuge-less Emulsification Microextraction Using Effervescent CO₂ Tablet for On-site Extraction of PAHs in Water Samples Prior to GC–MS Detection. *Chromatographia*, 79, 629–640.
- [46] **Yıldız E and Çabuk H** (2018) A new solidified effervescent tablet-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of fungicides in fruit juice samples. *Anal. Methods*, 10, 330–337.
- [47] **Jiang W, Chen X, Liu F, You X and Xue J** (2014) Effervescence-assisted dispersive liquid–liquid microextraction using a solid effervescent agent as a novel dispersion technique for the analysis of fungicides in apple juice. *J. Sep. Sci.*, 37, 3157–3163.
- [48] **Jafarinejad M, Ezoddin M, Lamei N, Abdi K, Babbadi-Ashar N, Pirooznia N and Akhgari M** (2020) Effervescent tablet-assisted demulsified dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for determination of methadone in water and biological samples prior to GC-flame ionization and GC-MS. *J. Sep. Sci.*, 43, 3266–3274.
- [49] **Li Y, Hu J, Liu W, Jin L, Zhou P, Zhang Y, Zhang B, Dahlgren R A, Wang X and Zhou Y** (2019) Magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of polybrominated diphenyl ethers in liquid matrix samples. *Talanta*, 195, 785–795.
- [50] **Shishov A, Sviridov I, Timofeeva I, Chibisova N, Moskvina L and Bulatov A** (2017) An effervescence tablet-assisted switchable solvent-based microextraction: On-site preconcentration of steroid hormones in water samples followed by HPLC-UV determination. *J. Mol. Liq.*, 247, 246–253.
- [51] **Shishov A, Gerasimov A, Nechaeva D, Volodina N, Bessonova E and Bulatov A** (2020) An effervescence-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent decomposition: Determination of ketoprofen and diclofenac in liver. *Microchem. J.*, 156, 104837.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [52] Medinskaia K, Vakh C, Aseeva D, Andruch V, Moskvina L and Bulatov A (2016) A fully automated effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a stepwise injection system. Determination of antipyrine in saliva samples. *Anal. Chim. Acta*, 902, 129–134.
- [53] Dmitrienko S G, Apyari V V, Gorbunova M V, Tolmacheva V V and Zolotov Y A (2020) Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds. *J. Anal. Chem.*, 75, 1371–1383.
- [54] Torbati M, Farajzadeh M A, Torbati M, Nabil A A A, Mohebbi A and Mogaddam M R A (2018) Development of salt and pH-induced solidified floating organic droplets homogeneous liquid-liquid microextraction for extraction of ten pyrethroid insecticides in fresh fruits and fruit juices followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 176, 565–572.
- [55] Matkovich C E and Christian G D (1973) Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. *Anal. Chem.*, 45, 1915–1921.
- [56] Valente I M and Rodrigues J A (2015) Recent advances in salt-assisted LLE for analyzing biological samples. *Bioanalysis*, 7, 2187–2193.
- [57] Wu H, Zhang J, Norem K and El-Shourbagy T A (2008) Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48, 1243–1248.
- [58] Wang B, Ezejias T, Feng H and Blaschek H (2008) Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system. *Chem. Eng. Sci.*, 63, 2595–2600.
- [59] Zhang C, Huang K, Yu P and Liu H (2012) Sugaring-out three-liquid-phase extraction and one-step separation of Pt (IV), Pd (II) and Rh (III). *Sep. Purif. Technol.*, 87, 127–134.
- [60] Zhu Z, Zhang Y, Wang J, Li X, Wang W and Huang Z (2019) Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey. *J. Chromatogr. A*, 1601, 104–114.
- [61] Nugbienyo L, Malinina Y, Garmonov S, Kamencev M, Salahov I, Andruch V, Moskvina L and Bulatov A (2017) Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine. *Talanta*, 167, 709–713.
- [62] Zhang J, Myasein F, Wu H and El-Shourbagy T A (2013) Sugaring-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for bioanalysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.*, 108, 198–202.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [63] **Mahdavi P, Nojavan S and Asadi S** (2019) Sugaring-out assisted electromembrane extraction of basic drugs from biological fluids: Improving the efficiency and stability of extraction system. *J. Chromatogr. A*, 1608, 460411.
- [64] **Tu X, Sun F, Wu S, Liu W, Gao Z, Huang S and Chen W** (2018) Comparison of salting-out and sugaring-out liquid–liquid extraction methods for the partition of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly and their co-extracted protein content. *J. Chromatogr. B*, 1073, 90–95.
- [65] **Zhang Y, Xu M and Aðalbjörnsson B V** (2021) Sugaring-out: a novel sample preparation method for determination of fucoxanthin in Icelandic edible seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 33, 515–521.
- [66] **Tu X, Wu S, Liu W, Gao Z, Huang S and Chen W** (2019) Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of bisphenol A and bisphenol B in royal jelly. *Food Anal. Methods*, 12, 705–711.
- [67] **Tsai W-H, Chuang H-Y, Chen H-H, Wu Y-W, Cheng S-H and Huang T-C** (2010) Application of sugaring-out extraction for the determination of sulfonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1217, 7812–7815.
- [68] **Timofeeva I, Shishov A, Kanashina D, Dzema D and Bulatov A** (2017) On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices. *Talanta*, 167, 761–767.
- [69] **Chen W, Wu S, Zhang J, Yu F, Hou J, Miao X and Tu X** (2019) Matrix-induced sugaring-out: a simple and rapid sample preparation method for the determination of neonicotinoid pesticides in honey. *Molecules*, 24, 2761.
- [70] **Yıldız E and Çabuk H** (2021) Dispersive liquid-liquid microextraction method combined with sugaring-out homogeneous liquid-liquid extraction for the determination of some pesticides in molasses samples. *J. Sep. Sci.*, 44, 4151–4166.
- [71] **Jessop P G, Phan L, Carrier A, Robinson S, Dürr C J and Harjani J R** (2010) A solvent having switchable hydrophilicity. *Green Chem.*, 12, 809–814.
- [72] **Vanderveen J R, Durelle J and Jessop P G** (2014) Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. *Green Chem.*, 16, 1187–1197.
- [73] **Shahvandi S K, Banitaba M H and Ahmar H** (2018) Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine. *Talanta*, 184, 103–108.
- [74] **Bazel Y, Rečlo M and Chubirka Y** (2020) Switchable hydrophilicity solvents in analytical chemistry. Five years of achievements. *Microchem. J.*, 157, 105115.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [75] **Ma W and Row K H** (2021) pH-induced deep eutectic solvents based homogeneous liquid-liquid microextraction for the extraction of two antibiotics from environmental water. *Microchem. J.*, 160, 105642.
- [76] **Çabuk H, Köktürk M and Ata Ş** (2014) pH-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction using dialkylphosphoric acid as an extraction solvent for the determination of chlorophenols in water samples. *J. Sep. Sci.*, 37, 1343–1351.
- [77] **Murata K, Yokoyama Y and Ikeda S** (1972) Homogeneous liquid-liquid extraction method. Extraction of iron (III) thenoyltrifluoroacetate by propylene carbonate. *Anal. Chem.*, 44, 805–810.
- [78] **Anthemidis A N and Ioannou K-I G** (2009) Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta*, 80, 413–421.
- [79] **Sorouraddin S M, Farajzadeh M A and Okhravi T** (2019) A green solventless temperature-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction method based on 8-hydroxyquinoline simultaneously as complexing agent and extractant for preconcentration of cobalt and nickel from water and fruit juice samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 99, 124–138.
- [80] **Liu G, Zhou N, Zhang M, Li S, Tian Q, Chen J, Chen B, Wu Y and Yao S** (2010) Hydrophobic solvent induced phase transition extraction to extract drugs from plasma for high performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 1217, 243–249.
- [81] **Hu L, Tao Y, Luo D, Feng J, Wang L, Yu M, Li Y, Covaci A and Mei S** (2019) Simultaneous biomonitoring of 15 organophosphate flame retardants metabolites in urine samples by solvent induced phase transition extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 233, 724–732.
- [82] **Cai B-D, Ye E-C, Yuan B-F and Feng Y-Q** (2015) Sequential solvent induced phase transition extraction for profiling of endogenous phytohormones in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1004, 23–29.
- [83] **Keikotlhaile B M, Spanoghe P and Steurbaut W** (2010) Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: a meta-analysis approach. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1–6.
- [84] **Reichert B, Pizzutti I R, Costabeber I H, Uclés A, Herrera S and Fernández-Alba A R** (2015) Validation and application of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. *Talanta*, 134, 415–424.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [85] del Castillo M L R, Rodríguez-Valenciano M, Flores G and Blanch G P (2019) New method based on Solid Phase Microextraction and Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry to determine pesticides in strawberry jam. *LWT*, 99, 283–290.
- [86] Valera-Tarifa N M, Santiago-Valverde R, Hernandez-Torres E, Martinez-Vidal J L and Garrido-Frenich A (2020) Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS. *Food Chem.*, 315, 126304.
- [87] Pérez-Ortega P, Lara-Ortega F J, García-Reyes J F, Beneito-Cambra M, Gilbert-López B, Martos N R and Molina-Díaz A (2016) Determination of over 350 multiclass pesticides in jams by ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOFMS). *Food Anal. Methods*, 9, 1939–1957.
- [88] Shi Z, Li Z, Qiu L, Sun M, Zhang D and Zhang H (2015) Sugaring-out assisted liquid/liquid extraction coupled with HPLC for the analysis of honokiol and magnolol in traditional Chinese herbal formula huoxiang-zhengqi oral liquid. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 38, 722–728.
- [89] Majlesi M, Massoudinejad M, Hosainzadeh F and Fattahi N (2016) Simultaneous separation and preconcentration of phosalone and chlorpyrifos in fresh vegetables using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and high performance liquid chromatography. *Anal. Methods*, 8, 3795–3801.
- [90] Pirsaeheb M, Fattahi N and Shamsipur M (2013) Determination of organophosphorous pesticides in summer crops using ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. *Food Control*, 34, 378–385.
- [91] Feriduni B, Mohebbi A, Farajzadeh M A and Namvar M (2019) Magnetic graphene oxide-based solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous preconcentration of four typical pesticide residues in fruit juice and pulp. *Food Anal. Methods*, 12, 2742–2752.
- [92] Seebunrueng K, Santaladchaiyakit Y and Srijaranai S (2012) Study on the effect of chain-length compatibility of mixed anionic–cationic surfactants on the cloud-point extraction of selected organophosphorus pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 404, 1539–1548.
- [93] Ma G and Chen L (2014) Determination of chlorpyrifos in rice based on magnetic molecularly imprinted polymers coupled with high-performance liquid chromatography. *Food Anal. Methods*, 7, 377–388.
- [94] Zhang L, Yu R, Zhang X and Zhang D (2021) Ionic Liquid–Based Dispersive Liquid–Liquid Micro-extraction of Five Organophosphorus Pesticides in Coarse Cereals. *Food Anal. Methods*, 14, 10–17.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [95] Wang J, Duan H-L, Fan L, Lin Y-M, Sun J-N and Zhang Z-Q (2021) Magnetic tetraethylenepentamine modified multi-walled carbon nanotubes as matrix clean-up materials for organophosphorus pesticide residues analysis in cucumber. *Food Control*, 124, 107904.





ÖZGEÇMİŞ

Cansu ALKAN, ilkokulu Yayla İlköğretim, ortaokulu Ahmet Erdoğan İlköğretim ve liseyi de Zonguldak Atatürk Lisesinde tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdi ve 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2020 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

