

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YUMURTADA PERMETHRİNİN HPLC/UV SİSTEMDE TAYİNİ:  
OYUK (HOLLOW) FİBER SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON  
YÖNTEMİ İLE ZENGİNLEŞTİRME VE ÖN TEMİZLEME**

**GAMZE YILMAZ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Ayla DEMİRCİ**

**KIRIKKALE-2023**

# ÖZET

## YUMURTADA PERMETHRİNİN HPLC/UV SİSTEMDE TAYİNİ: OYUK (HOLLOW) FİBER SIVI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ZENGİNLEŞTİRME VE ÖN TEMİZLEME

YILMAZ, Gamze

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayla DEMİRCİ

Mayıs, 2023, 104 Sayfa

Bu çalışmada, yumurtada permethrin tayini için hollow (oyuk)-fiber sıvı faz mikroekstraksiyon metoduna dayanan bir sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Permethrinin zenginleştirme işleminde ön temizleme materyali olarak hollow fiber kullanılmıştır. Çalışmanın başında, zenginleştirme faktörüne (EF) etkili ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı, tuz ve pH gibi HF-LPME parametrelerinin etkileri kısmi faktöriyel deney tasarımı ( $2^{4-1}$ ) ile incelenmiştir. Bir sonraki basamakta, merkezi kompozit tasarım kullanılarak ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı ve NaCl (%w/v) parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Optimize edilmiş HF-LPME koşulları: ekstraksiyon süresi: 18 dakika, karıştırma hızı: 950 rpm, alıcı faz: toluen, % 7.0 NaCl ve pH: 8.0. Hollow-fiber mikroekstraksiyon ile optimum koşullar belirlendikten sonra yumurtada geri alınabilirlik çalışmaları yapıldı. Ekstraksiyon kalibrasyon doğruları 10–1000 ng g<sup>-1</sup> aralığında doğrusallık gösterirken ( $r^2$ : 0.9904–0.9932), permethrin için en düşük tayin sınırları ve zenginleştirme faktörleri 2.68–8.35 ng g<sup>-1</sup> ve 386–532 (RSD≤11.3) aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada HF-LPME tekniği, yumurtada permethrinin belirlenmesi başarılı bir şekilde geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Yöntemde, iyi bir zenginleştirme faktörü, tekrarlanabilirlik ve düşük tayin limiti elde

edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon gibi geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, bu yöntem organik çözücünün asgari tüketimini sağlarken yeşil kimyaya katkıda bulunmaktadır. Önerilen yöntem, basit, ucuz, hızlı ve farklı yumurta örneklerinde pestisitlerin konsantre edilmesinde ve belirlenmesinde başarıyla uygulanabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Permethrin, Yumurta, Mikroekstraksiyon, HPLC



# ABSTRACT

## DETERMINATION OF PERMETHRIN IN EGG BY MEANS OF HPLC/UV SYSTEM: ENRICHMENT AND CLEAN-UP BY HOLLOW FIBER LIQUID PHASE MICROEXTRACTION METHOD

YILMAZ, Gamze

Kirikkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master's Thesis

Supervisor: Associate Professor Ayla DEMİRÇİ

May, 2023, 104 Pages

In this work, a liquid chromatographic method based on hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) was developed to determine permethrin in eggs. Hollow fiber was used as a clean-up material for enrichments of permethrin. At first, the effects of the HF-LPME experimental parameters such as extraction time, stirring speed, salt and pH on the enrichment factor (EF) were studied simultaneously using a  $2^{4-1}$  fractional factorial design. In the next step, centre composite design was performed to evaluate the effects of three parameters, extraction time, stirring speed and NaCl (% w/v). The optimized HF-LPME conditions were as follows: an extraction time of 18 min, a stirring speed of 950 rpm, an acceptor phase of toluene, 7.0% NaCl and a source pH of 8.0. After optimizing hollow-fiber microextraction conditions in terms of recoveries for eggs were studied. The extraction calibration plots were linear over the range of 10–1000 ng g<sup>-1</sup> ( $r^2$ : 0.9904–0.9932) and the limits of detection (LODs) for permethrin studied were from 2.68 to 8.35 ng g<sup>-1</sup>. Enrichment factors (EFs) were achieved from 386 to 532 (RSD ≤ 11.3). In this study the HF-LPME technique has been successfully developed and optimized for the determination of permethrin in

eggs. The method provides a good enrichment factor, good repeatability and low detection limit. Compared to the traditional methods such as liquid-liquid extraction, this method provides minimal consumption of organic solvent, which is in agreement with green chemistry. The proposed method is simple, inexpensive, fast, and can be successfully applied for preconcentration and determination of pesticides in different egg samples.

**Key Words:** Permethrin, Egg, Microextraction, HPLC



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi hazırlarken yaptığım araştırmalar ve deneyler sırasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Ayla DEMİRCİ' ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve yüreklendiren annem, babam ve tüm aile üyelerime teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1.1. Pestisitler .....	1
1.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	2
1.1.2. Organik Klorlu Pestisitler (OCPs) .....	5
1.1.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
1.1.4. Kullanım Alanları .....	8
1.1.5. Pestisitler ve Çevre .....	9
1.1.6. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	10
1.1.7. Pestisitlerin Tayin Yöntemleri.....	11
1.2. Yumurta ve Kimyasal Yapısı .....	13
1.2.1. Yumurta ve Pestisit.....	14
1.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemi .....	15
1.4. Gıdalarda Pestisitlerin Kromatografik Analizlerinde Örnek Hazırlama Tekniklerinin Geliştirilmesi .....	19
1.4.1. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE).....	21
1.4.2. Katı Faz Ekstraksiyon (SPE) .....	23
1.4.3. Matriks Katı Faz Dağılımı (MSPD) .....	26
1.4.4. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) .....	28
1.4.5. Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (SBSE).....	30
1.4.6. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME).....	33

1.4.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE).....	41
1.4.8. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE).....	44
1.4.9. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon (PLE).....	46
1.5. Deneysel Tasarım.....	48
1.5.1. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Deney Tasarımı ( $2^k$ ).....	49
1.5.2. Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarımı ( $2^{k-p}$ ).....	51
1.5.3. Plackett-Burman Deney Tasarımı.....	52
1.6. Yüzey Yanıt Tasarımları.....	53
1.6.1. Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^k$ , $3^k$ ya da karışık seviyeli).....	54
1.6.2. Merkezi Kompozit Tasarım (CCD).....	54
1.6.3. Box Behnken Tasarımı.....	56
1.6.4. Doehlert Tasarımı.....	56
1.6.5. D-Optimal Tasarım.....	57
1.6.6. Karışık Tasarım.....	57
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	58
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	58
2.1.1. Cihazlar.....	58
2.1.2. Cihaz ve Materyaller.....	58
2.2. Kromatografik Koşullar.....	59
2.3. Permethrin Çözeltileri.....	59
2.4. Yumurta Permethrinin Klasik Sıvı- Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi ile Geri Alma Çalışmaları.....	61
2.5. HF-LPME Yöntemi.....	63
2.6. Deneysel Tasarım.....	65
2.6.1. İki Seviyeli Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarım.....	65
2.6.2. Merkezi Kompozit Tasarım (CCD).....	66
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	68



3.1. İki Seviyeli Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarım .....	68
3.2. Merkezi Kompozit Deney Tasarım .....	76
3.3. Yumurtada Permethrinin Geri Alınabilirlik Çalışmaları.....	82
3.3.1. HF-LPME Yöntemi .....	82
3.3.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (LLE) .....	83
4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	88
KAYNAKÇA.....	90



# ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. İnsektisitlerin Türleri [8].....	4
Şekil 1.2. Permethrinin cis ve trans izomeri .....	5
Şekil 1.3. HPLC Sistemi .....	16
Şekil 1.4. Sıvı Sıvı Ekstraksiyonun Şematik Gösterimi [53].....	22
Şekil 1.5. Katı faz ekstraksiyonun basit şematik gösterimi [59].....	24
Şekil 1.6. MSPD Prosesi [64] .....	27
Şekil 1.7. SPME Sistemi [71] .....	29
Şekil 1.8. SBSE'nin basit şematik gösterimi [69].....	31
Şekil 1.9. DLLME Sistemi [91].....	34
Şekil 1.10. SDME Sistemi [99] .....	37
Şekil 1.11. HF-LPME Sistemi .....	38
Şekil 1.12. SFODME Prosedürü [111] .....	41
Şekil 1.13. MAE Sistemi [118].....	43
Şekil 1.14. SFE Sistemi [125].....	45
Şekil 1.15. PLE Sistemi [132].....	47
Şekil 1.16. (a) iki faktörlü ( $\alpha= 1.41$ ) ve (b) üç faktörlü ( $\alpha = 1.68$ ) CCD'lerin gösterimi, (●) faktöriyel tasarım noktaları (○) eksen noktaları (□) merkez nokta.....	55
Şekil 2.1. Cis-permethrin kalibrasyon doğrusu .....	60
Şekil 2.2. Trans-permethrin kalibrasyon doğrusu.....	60
Şekil 2.3. Permethrin kalibrasyon doğrusu .....	61
Şekil 2.4. Oyuk (Hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyon (HF-LPME) sistemi.....	64
Şekil 2.5. Polipropilen hollow fiberin duvar kesiti [136].....	64
Şekil 3.1. FFD'de cis-permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri.....	70
Şekil 3.2. FFD'de cis-permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri.....	71
Şekil 3.3. FFD'de trans-permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri.....	72
Şekil 3.4. FFD'de trans-permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri .....	73

<b>Şekil 3.5.</b> FFD'de permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri.....	74
<b>Şekil 3.6.</b> FFD'de permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri .....	75
<b>Şekil 3.7.</b> Cis-permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl(% <sub>w/v</sub> ) derişimine bağlı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri.....	77
<b>Şekil 3.8.</b> Trans-permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl(% <sub>w/v</sub> ) derişimine bağlı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri .....	78
<b>Şekil 3.9.</b> Permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl(% <sub>w/v</sub> ) derişimine bağlı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri.....	79
<b>Şekil 3.10.</b> Üç faktör içeren CCD tasarımında cis-permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi .....	80
<b>Şekil 3.11.</b> Üç faktör içeren CCD tasarımında trans-permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi .....	80
<b>Şekil 3.12.</b> Üç faktör içeren CCD tasarımında permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi .....	81
<b>Şekil 3.13.</b> HF-LPME ekstraksiyonu sonrası elde edilen kromatogramlar: .. (A) Blank yumurta örneği (B) 100 ng g <sup>-1</sup> derişiminde permethrin. Eklenmiş yumurta (C) 100 ng mL <sup>-1</sup> standart permethrin (1) cis-permethrin (2) trans-permethrin.....	83
<b>Şekil 3.14.</b> Cis-permethrin için LLE ile elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	84
<b>Şekil 3.15.</b> Trans-permethrin için LLE ile elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	84
<b>Şekil 3.16.</b> Cis-permethrin için LLE (ön temizleme) ile elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	85
<b>Şekil 3.17.</b> Trans-permethrin için LLE (ön temizleme) ile elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	86
<b>Şekil 3.18.</b> LLE sonrası elde edilen kromatogramlar: (A) 250 ng g <sup>-1</sup> derişiminde permethrin eklenmiş yumurta (florisil ön temizleme) (B) 200 ng g <sup>-1</sup> derişiminde permethrin eklenmiş yumurta (C) 100 ng mL <sup>-1</sup> standart permethrin (1) cis-permethrin (2) trans-permethrin .....	87

# TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Yumurthanın kimyasal yapısı.....	14
<b>Tablo 1.2.</b> 4 faktör için Placett-Burman deneysel tasarımı.....	52
<b>Tablo 1.3.</b> CCD için deney matrisi: (a) iki faktörlü (b) üç faktörlü.....	55
<b>Tablo 2.1.</b> $2^{4-1}$ fraksiyonlu faktöriyel tasarımda faktörler ve seviyeleri.....	65
<b>Tablo 2.2.</b> Fraksiyonlu faktöriyel deney matrisi ( $2^{4-1}$ ).....	66
<b>Tablo 2.3.</b> Merkezi kompozit tasarım matrisi.....	67
<b>Tablo 3.1.</b> CCD tasarımda cis-permethrin için elde edilen varyans analiz sonuçları....	76
<b>Tablo 3.2.</b> Hollow fiber mikroekstraksiyon yönteminde optimum koşullar.....	81
<b>Tablo 3.3.</b> Yumurtada permethrinin HF-mikroekstraksiyonunda çalışma aralığı, tayin sınırları, zenginleştirme faktörleri, tekrarlanabilirlik.....	82
<b>Tablo 3.4.</b> Yumurtada permethrinin sıvı-sıvı ekstraksiyonunda çalışma aralığı, tayin sınırları, yüzde geri alınabilirlik, tekrarlanabilirlik.....	87

## KISALTMALAR DİZİNİ

AB	Avrupa Birliği
CCD	Merkezi Kompozit Tasarım
DDT	Diklor fenol trikloretan
DEL	Deltamethrin
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FFD	Fraksiyonel Fonksiyonel Tasarım
GC	Gaz Kromatografi
GC-ECD	Elektron Yakalama Dedektörü ile Donatılmış Gaz Kromatografi
HCB	Heksaklorobenzen
HCH	Heksaklorosikloheksan
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
LC	Sıvı Kromatografi
LC-MS/MS	Kütle Spektroskopisi ile Donatılmış Sıvı Kromatografi
MRL	Maksimum Kalıntı Seviyeleri (MRLs)
MS	Kütle Dedektörü
OCPs	Organik Klorlu Pestisitler
ODS	Oktadesiloksan
OP	Organofosfat
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PCB	Poliklorlu Bifenil
PDMS	Polidimetilsiloksan
PYR	Piretroid Pestisitler
RID	Kırılma İndisi Dedektörü
RSD	Bağıl Standart Sapma
QEChERS	Hızlı, Kolay, Ucuz, Etkili, Sağlam ve Güvenli
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
LOD	Limit of Detection (En küçük tayin sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Minimum tespit edilebilir değer)

# 1. GİRİŞ

Pestisit, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından “insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin, hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması, pazarlanması sırasında bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi, yok edilmesi, kontrol altına alınması amacıyla hayvanların üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması için kullanılan maddeler” şeklinde tanımlanmıştır [1]. Kısaca besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanması sırasında besin değerini bozan ve bitkilere zarar veren böcekleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları yok etmek için kullanılan kimyasal maddelere pestisit adı verilir. Bu tanımdan anlaşıldığı gibi pestisitler tarımsal amaçlı kullanımının yanı sıra zararlıların farklı alanlarda kontrol altına alınabilmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

## 1.1. Pestisitler

Pestisitler, canlıların yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek amacı ile ihtiyaç duydukları besin maddelerinin üretim aşamasından tüketimine kadar korunabilmeleri için kullanılan madde veya madde karışımlarıdır [3].

Pestisitler, tarım ürünlerinin hastalıklardan, zararlılardan ve yabancı otlardan korumak amacıyla kullanılan kimyasal bazlı ticari ürünler olup tarımsal üretimin vazgeçilmezidir. Pestisitler, kullanım amaçlarına göre herbisit (yabani ot kontrolü), fungusit (mantar hastalıkları) ve insektisit (zararlı haşere kontrolü) olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Özellikle, 1970'lerden sonra pestisitlerin kullanımı giderek artmış ve ürün kalitesini korumak ve verimi artırmak amacıyla tarımsal üretimin önemli bir parçası haline gelmiştir. FAO verilerine göre 1997-2017 yılları arasında küresel pestisit kullanım miktarı 1.4 kat artarak 2.91 milyon tondan 4.11 milyon ton olduğu tespit edilmiştir [4]. Türkiye'nin pestisit kullanım miktarı ise 1.6 kat artarak 54 bin tona ulaşmıştır. Pestisitler, verim kaybını azaltarak ekonomik olarak fayda sağlarken, ürünler üzerindeki pestisit kalıntıları tüketim yoluyla insan vücuduna geçmekte ve

birçok akut ve kronik hastalığa neden olmaktadır. Bunun yanında faydalı organizmaların yok edilmesi, toprak ve su kaynaklarının kirlenmesi gibi ciddi çevresel sorunlara neden olurlar. Pestisitler modern tarımın ayrılmaz bir parçası konumundadır. Bununla birlikte, bilinçsiz pestisit kullanımı insan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etkiler bırakmaktadır. Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı sorunları üzerindeki etkisinin en aza indirilebilmesi için toksikolojik etkileri üzerindeki çalışmaların yanı sıra esas uygulayıcı olan çiftçilerin davranışlarının ve risk algılamalarının incelenmesine ilişkin çalışmalara da gereksinim duyulmaktadır.

### 1.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. En yaygın olan sınıflandırma biçimi etkiledikleri canlı gruplarına göre sınıflandırmadır [5]. Buna göre pestisitler;

- İnsektisitler (Böcekleri öldüren): Klorlanmış hidrokarbonlular, organik fosforlular, karbamatlılar, sentetik pretroidler, bakteriler.
- Akarisitler (Akarları öldüren): Amin ve hidrazin türevleri, kükürtlüler, organik kalaylılar.
- Nematosisitler (Nematodları öldüren)
- Mollusisit (Yumuşakçaları öldüren)
- Rodentisit (Kemirgenleri öldüren)
- Avisit (Kuşları öldüren)
- Fungisit (Fungusları öldüren): Bakırlılar, kalaylılar, kükürtlüler, dithiokarbamatlılar, benzimidazoller, piperazinler, triazoller.
- Bakterisit (Bakterileri öldüren)
- Herbisit (Yabancı otları öldüren): Benzimidazoller, karbamatlılar, anilidler, triazinler, uraciller.
- Algisit (Algleri öldüren) olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

Bu pestisitlerden en çok kullanılanları herbisitler, insektisitler ve fungusitlerdir.

**Akarisitler:** Keneler, halı böcekleri, toz böcekleri gibi canlılar akarlar olarak bilinmektedir. Akarların kontrol edilmesinde ve öldürülmesinde kullanılan pestisitler akaristlerdir. Akarisit olarak kullanılan bazı pestisitler Azoxystrobin, Malathion'dur.

**Rodentisitler:** Kemirgen ve fare türü canlıların öldürülmesinde ve kontrol altında tutulmasında kullanılır.

**Avisitler:** Tarım zararlısı kuşların öldürülmesinde ve kontrol altına alınmasında kullanılırlar.

**Mollusisitler:** Yumuşakçaların öldürülmesinde ve kontrol altına alınmasında kullanılırlar. Örnek olarak Thiodicarb, Methiocarb sayılabilir.

**Nematositler:** Nematodların, topraktaki segmentsiz kurtların öldürülmesi ve kontrol altına alınması için kullanılırlar. Nemosit olarak kullanılan pestisitlere örnek olarak; Cadusafos, Ethoprophos verilebilir [6].

**Herbisitler:** İstenilmeyen yabancı otları temizlemek için kullanılan kimyasal ilaçlar genel olarak herbisit olarak sınıflandırılır. Pestisitlerden olan herbisitlerin kullanımı fazla olduğu için bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe önem kazanarak devam etmektedir. Çeşitli besin kaynaklarındaki herbisitlerin transferi; herbisitlerin tipine, ortam pH'ına, sıcaklık ve nem miktarına, toprağın organik madde içeriğine, büyümenin evresine ve hayvan türlerine bağlıdır. Herbisitler besin zinciri içinde güçlü olduklarından insan, hayvan ve çevre için tehlike arz etmektedir.

**Fungusitler:** Herbisit ve insektisitlerden sonra dünyada yaygın olarak kullanılan diğer bir pestisit grubu ise fungusitlerdir. Fungusitler mantarları öldürmede kullanılmakta ve ekonomik olarak en önemli pestisit grubunda yer almaktadırlar. Fungusitlerin en geniş kimyasal sınıflarından biri azole (penkonazol, mayklobutanil ve triadimenol vb.) bileşikleridir. Özellikle şaraplık üzümlerde ve şarapçılıkta çok kullanılan bu bileşikler şarabın özelliklerinin korunması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fungusitler doğal kimyasal yapılarından dolayı toksiktirler bu yüzden biyolojik olarak parçalanmaları oldukça güçtür. Fungusitlerin kimyasal kalıntıları toprakta ortaya çıkarak gıda zincirine girmekte ve bu sebeple insan ve hayvan sağlığı için fungusitlerin bilinçli kullanımı önem teşkil etmektedir [7].

**İnsektisitler:** İstenmeyen böceklerin öldürülmesini sağlayan kimyasal ilaçların genel ismine insektisit adı verilmektedir. Günümüzde en çok kullanılan sentetik insektisitlerdir. Bu insektisitler arasında en çok organoklorlu (siklodienler, diklor difenol trikloretan (DDT) vb.), organo fosforlu (kloropirifos, fention vb.), karbamat (aldikarb, metiyokarb vb.) pestisitleri ve piretroid (permethrin, deltamethrin) kullanılmaktadır.

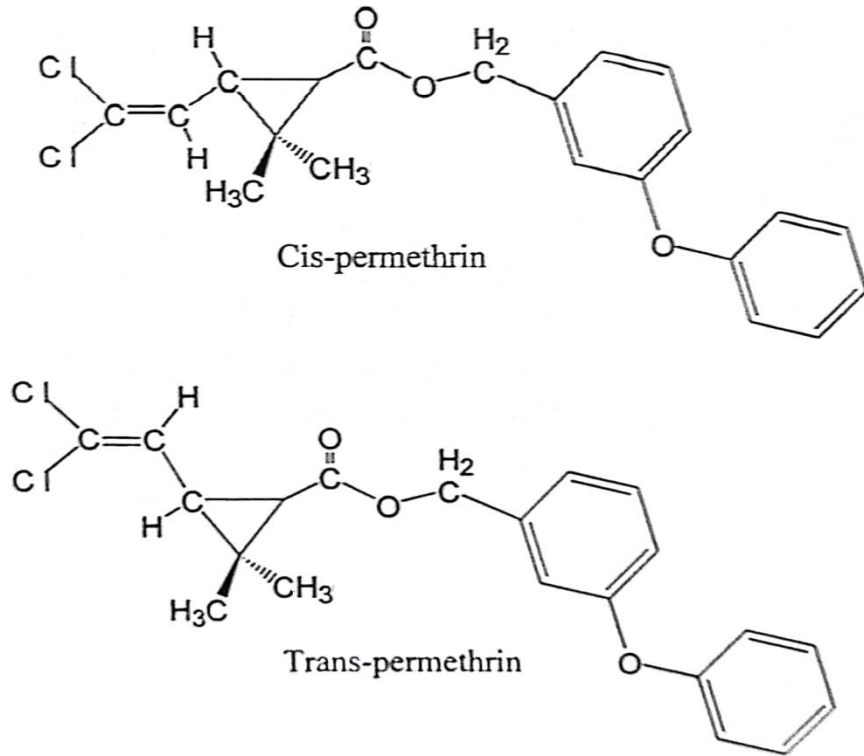




Şekil 1.1. İnsektisitlerin Türleri [8]

Çalışmamızda kullanılan insektisit türü piretroid sınıfından permethrindir. Permethrinin kimyasal adı; 3-fenoksi benzil (1RS)-cis, trans-3-(2.2-diklorovinil-2.2-dimetilsiklopropan karboksilatıdır ve moleküler formülü:  $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$  olarak gösterilir. Permethrin, pratik olarak ılımlı toksik olmayan formülüne göre 2. veya 3. EPA zehirlilik sınıfında bir pestisitir. Göz ve deri tahrişine sebep olma potansiyelinden dolayı kesin olarak belirtilenler 2. grupta yer alır. Permethrin içeren ürünler uyarı ya da dikkat etiketi taşımak zorundadır. Tarım alanlarında kullanılan bütün ürünler (çiftlik hayvanları ve arazi kullanımları dışında) suda yaşayan organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle sınırlandırılmış kullanımlı böcek ilaçlarıdır. Permethrin, kabuklu yemiş, meyve, sebze, pamuk, süs bitkileri, mantar, patates ve hububat üzerindeki böcek çeşitlerine karşı kullanılan geniş spektrumlu sentetik piretroid böcek öldürücüdür. Seralarda, evlerin bahçelerinde ve termit kontrolünde kullanılır. Ayrıca ısırıcı sinek ve hamam böceği gibi hayvan ektoparazitlerinin kontrolünde de kullanılır. Permethrinin toprakta ve çevrede etkisi düşüktür. Yarılma ömrü 30-38 gün arasındadır. Organik tiplerin dışındaki topraklarda kolayca bozunabilir niteliktedir. Toprak mikroorganizmaları permethrinin topraktaki seviyesini düşürmede büyük rol oynar. Toprağa besin eklenmesi permethrin seviyesindeki düşmeyi artırabilir.

Toprağa permethrin eklendiğinde toprakta sodyum ve fosfor oluşması olasılığı düşmektedir. Permethrin toprak tarafından özellikle organik maddeler tarafından sıkıca sarmalanır. Permethrinin su tarafından yıkanması ve yer altı sularını kirletmesi beklenmektedir çünkü permethrin toprak parçacıkları tarafından sıkıca sarılır ve neredeyse suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. Permethrinin cis ve trans izomerleri aşağıda gösterilmiştir [9,10].



Şekil 1.2. Permethrinin cis ve trans izomeri

### 1.1.2. Organik Klorlu Pestisitler (OCPs)

C, H atomlarından oluşan organik maddelerin klorlanmasıyla elde edilen, yapılarında yüksek oranda Cl bulunan pestisitlere organoklorlu pestisitler adı verilir. 1940'ların başında DDT'nin insektisit özelliğinin keşfedilmesiyle kullanılmaya başlanılmıştır. Organoklorlu pestisitler oldukça kararlı yapılar olup bozunmadan uzun yıllar çevrede kalabilirler. Bu sebeple kalıcı organik kirleticiler sınıfında değerlendirilirler. Suda çözünürlükleri düşük olan pestisitlerin yağda çözünürlüklerinin yüksek olması

nedeniyle canlıların yağ dokusunda depolanırlar. Biyotransformasyonlarının oldukça yavaş olması nedeni ile canlılarda birikmeye başlarlar. Bu olay biyoakümülyasyon olarak adlandırılır. Organoklorlu pestisitler bitkilerin ve hayvanların yağ dokusunda birikerek canlıların besin zincirine girerler. Besin zincirinin daha üst seviyelerine doğru gittikçe canlıdaki organoklorlu pestisit miktarı artış gösterir. Bu duruma biyomagnifikasyon adı verilir. Organoklorlu pestisitler çeşitli akut ve kronik zehirlenmelere yol açmakta ve organizma üzerinde ciddi problemlere yol açmaktadır.

Organoklorlu pestisitler kimyasal yapısına göre

1. Diklorodifeniletanlar
2. Klorlu siklodienler
3. Klorlu benzen ve sikloheksan yapısında olanlar olmak üzere üç ana sınıfta toplanmıştır [11].

Bu çalışmada insektisit grubunda olan permethrinin tavuk yumurtalarındaki analizi esas alınmıştır. Küresel olarak, organofosfat (OP) pestisitlerinin kullanımı azaldıkça piretroid insektisitlerin kullanımı artmaktadır. Piretroid insektisitler, hedeflerine sinir ve kas hücrelerindeki sodyum-iyon kanallarının bozulması ve değiştirilmesi yöntemiyle ulaşır. Bununla birlikte, piretroid insektisitlerinin OP ve karbamat pestisitleri de dahil olmak üzere diğer pestisit sınıflarına kıyasla düşük toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. ABD ve Kanada'da permethrin en sık kullanılan piretroiddir. Permethrin, zararlıları ve böcekleri kontrol etmek için birkaç farklı biçimde kullanılır. Öncelikle, tarımsal ortamlarda, iç ve dış mekanlarda, konutlarda insektisit olarak ekinlere püskürtülür. Permethrin dışında yaygın olarak kullanılan diğer piretroid insektisitler arasında cypermethrin, deltamethrin, cyfluthrin, fenvalerat ve d-fenothrin bulunur. Ancak bunlarla sınırlı değildir.

Piretroid insektisitlerin yaygın ve çeşitli kullanımı insanlarda solunum, yutkunma ve dermal yollar ile hastalık oluşturma riski taşır [12]. Tavuk çiftliklerinden alınan yumurta örneklerinde ise sıklıkla fibronil kalıntılara rastlanmıştır. Fibronil, düşük polariteye ve küçük molekül ağırlığına sahiptir. Aseton ve toluen gibi düşük polar organik çözücülerde çözünür. Merkezi sinir sistemi aktivitesini bozmak ve hatta ölüme neden olmak için glutamatla aktive edilmiş klorür kanalının yanı sıra  $\gamma$ -aminobütirik asiti hedef alan nörotoksik aktiviteye sahip etkili bir fenilpirazol insektisittir. Bir kiral pestisit olarak, fibronil uzun zamandır katı, sıvı sprey veya granül üründe karışım

olarak kullanılmaktadır. Erken zamanlarda, yüksek toksik organofosfor pestisitlerinin yerine fibronil kullanılmıştır. Böcekler bu insektisitlere daha duyarlıdır [13].

Kimyasal yapılarına göre pestisitler aşağıda şekilde sıralanabilir;

- Organik klorlu pestisitler: BHC, DDT
- Organik fosfatlı pestisitler: Paration, Tenitrotion
- Karbamatlı pestisitler: Karbaril, Benomil
- Herbisit asitler: 2,4-D, 2,4,5-T
- Üre herbisitler: Dinuron, Linuron
- S-triazinler: Atrazin, Simazin
- Piretroidler: Deltamethrin, Cyfluthrin, Bifenthrin, Lambda-cyhalothrin, Permethrin
- Diğerleri: Kalay ve Organo-Civa bileşikleri [14].

### 1.1.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Organoklorlu Pestisit (OCP)'ler doğada kalıcı özellikte olup toprakta birikebilme özelliği gösterir. Çevreye ve insan sağlığına olumsuz etkileri görüldüğü için son yıllarda dikkat çekmeye başlamıştır [15]. Organoklorlu pestisitler yapılarında klor bulunan aromatik veya alifatik bileşiklerdir. Yapılarında karbon, hidrojen ve klor gibi çeşitli bileşikler içerir. Bu bileşikler son derece toksik olabilirler. Bunun yanı sıra doğada yavaş bozunmaları ve toksisiteleri sebebiyle yasaklanmışlardır. Bunlar arasında en dikkat çekici örnek diklorodifenil trikloroetan (DDT) 'dir. 1930'ların sonlarında İsviçreli kimyager Paul Müller'in sentezi ve daha sonra insektisit olarak etkinliğinin gösterilmesiyle bu buluş Müller'e 1948'de Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır [16]. Organik klorlu pestisitler, çeşitli hidrokarbonların % 33-67 oranlarında klorlandırılmasıyla elde edilir. Organik klorlu pestisitler, çoğunlukla inert ve stabil olabilirler. Suda çözünmeyip organik çözücülerde, mineral, bitkisel ve hayvansal yağlarda çözünürler. Bu birikim bazen insan ve hayvanları tek dozda, akut olarak zehirleyebilecek miktarın çok üzerine çıkabilmektedir. Pestisitlerin taşınımı ve yeraltı sularına karışmasında en önemli faktör kimyasal ve biyolojik özellikleridir. Suda çözünürlüğü ve buharlaşma yeteneği yüksek olan pestisitler kolaylıkla su döngüsüne girebilir ve çözünürlüğü düşük, biyolojik yarı ömürleri yüksek olan pestisitler toprak partiküllerine tutunarak uzun süre kalarak zamanla bu çevrelerde

birikmektedirler. Pestisitler toz halinde uygulanmaları durumunda rüzgârlarla taşınırlar. Özellikle uygulama yüksekten olursa çok küçük partiküller halinde havada asılı kalarak çok uzaklara taşınabilirler. Bu durum rüzgâr ve su ile pestisitlerin taşınmasının bir sonucudur [17].

Permethrin gibi Piretroid (PYR) pestisitler krizantem çiçeklerinden elde edilen piretrinlerin doğal pestisit olarak modifikasyonundan elde edilen sentetik kimyasallar içerir. Piretrinler, siklopropan karboksilik asit ve siklopentanonun alkolden üretilen esterlerdir. PYR pestisitleri, biyolojik aktiviteyi ve stabiliteyi iyileştirmek ve piretrinlerin temel asit/alkol bileşimini korumak için 1949'dan beri sentezlenmektedir. Tarım, veterinerlik ve tıbbi uygulamalarda üretilen ve kullanılan bir düzineden fazla PYR vardır. Sentetik PYR'ler ve türevleri, kimyasal yapılarına ve varsayılan etki mekanizmalarına göre tip I ve tip II olarak sınıflandırılır. Genel olarak, PYR bileşikleri oldukça hidrofobiktir. PYR pestisitlerinin tarımda, ormancılıkta, evlerde, halk sağlığında ve depolanan ürünlerde sürekli kullanımı maruz kalma riskini artırır. PYR'ler, sinir sistemindeki aksonal zarlara etki ederek elektrik impulslarının iletimini etkiler ve sodyum kanalları ile etkileşerek haşerede felce yol açtığı tespit edilmiştir. PYR bileşiklerinin memeliler üzerinde OP ve karbamat bileşiklerinden daha düşük toksisitesi vardır. Bu nedenle hassas PYR tespit yöntemlerine ihtiyaç vardır. Piretrinler, su, nem ve güneş ışığı varlığında gücü artırmak ve ömrü uzatmak için sentetik olarak modifiye edilmiş siklopropan, karboksilik asit ve siklopentenolon alkol esterleridir. PYR bileşiklerinin kimyasal yapıları benzerdir ve piretrinlerin temel asit/alkol bileşiminden oluşur. PYR bileşikleri, sırasıyla iki, dört veya sekiz stereoizomer oluşturan bir, iki veya üç kiral merkeze sahip olabilir. Çoğu sentetik PYR, deltamethrin (DEL) ve esfenvalerat dışında optik olarak saf bir bileşik yerine karmaşık bir izomer karışımını temsil eder [18].

#### **1.1.4. Kullanım Alanları**

Organik klorlu (OC) pestisitler, haşarat kontrolü amaçlı kullanılmaları sonucu çevrede uzun süre kalmaları ve potansiyel toksisitelerinden dolayı ciddi problemlere yol açarlar. Yağlı dokularda biriken bu bileşiklerin hayvanlarda yüksek seviyeye ulaşması, gıda zincirinde de yüksek seviyede bulunabileceğini açıkça göstermektedir [19]. Özellikle et ve et ürünleri, süt ürünlerinde sıklıkla organik klorlu pestisitlerin varlığına

rastlanmaktadır. Pestisitlerin kullanım amaçları sağlığı korumak ve aynı zamanda ülke ekonomisine katkı sağlamaktır. Besin maddelerinin ve diğer yararlı ürünlerin üretimini artırmaları ve muhafaza edilmeleri esnasında korunmalarını sağlamaları ise ekonomiye direkt olarak katkı sağlamaktadır. Bu katkı sebebiyle pestisitler tarımsal üretime stabilizasyon garantisi sağlayan ajanlar olarak belirtilirler. Pestisitlerle artırılan tarımsal verim ve kıtlığın önlenmesi bu ajanların hem ekonomiye hem de insan sağlığına olan katkılarının dikkat çekici örneğidir [20]. Pestisit kalıntılarının belirlenmesi, yeterli ve doğru kullanımı ve analizlerinin düzenli yapılması tüketici ve çevre sağlığı açısından çok önemli bir konudur. Pestisit kalıntı analizleri ile ilgili birçok deneme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalarda degradasyon eğrilerinin çıkarılması, piyasadan araştırılan örneklerde en yüksek sınıra uygunluklarının saptanması (MRL) ve diyet çalışmalarda toplam günlük alım değerlerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu yapılan araştırmalarda elde edilen sonuca göre farklı analitik yöntemler uygulanabilmektedir [21].

Pestisit kalıntılarının gıda veya yemlerde insan tüketimi için kabul edilemez bir risk teşkil eden seviyelerde bulunmamasını sağlamak için, Avrupa komisyonu tarafından maksimum kalıntı seviyeleri (MRL'ler) belirlenmiştir. MRL'ler, gıda ve yemdeki veya gıda üzerindeki pestisit kalıntıları için üst yasal konsantrasyon sınırlarıdır. Bitki ve hayvansal kaynaklı çok çeşitli gıda kaynakları için ayarlanırlar ve genellikle piyasaya sürüldükleri ürün için geçerlidirler [22].

#### **1.1.5. Pestisitler ve Çevre**

Pestisitler uygulandıkları alanlardan fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak rüzgâr, yağmur gibi etkenlerle farklı yerlere sürüklenerek çevre sorunlarına sebep olabilmektedir. Bir kısmı buharlaşma yoluyla atmosferde kalıcı toksik madde birikimine sebep olurken bir kısmı da fotokimyasal yolla parçalanarak toksik veya toksik olmayan maddelere dönüşebilmektedir. Diğer bir bölümü ise toprakta tutulmakta, toprağı kirletmekte ve toprak içinde kimyasal ve mikrobiyolojik parçalanma tepkimeleri geçirmektedir. Bir kısmı ise yağmur, sel ve kar suları ile topraktan sürüklenmekte, nehir, göl ve deniz sularını kirletebilme özelliklerine sahiptir. Tarımda pestisitlerin kullanılması nedeniyle hava, toprak ve su zamanla kirletilmektedir. Bu sebeple pestisitler, doğal besin zincirinde yer alan tüm canlıların

hayatını tehdit etmektedir [23]. Hava, su ve toprağa karışabilen pestisitler insan sağlığını için tehlike arz etmektedir.

Pestisitler çevreye; atmosfer, su, toprak ve pestisitlerin yapımı ya da geniş alanda kullanımını sonucunda bulaşabilmektedir. Su içerisinde istenmeyen bazı akuatik bitkilere ya da böceklere karşı pestisitlerin doğrudan suya uygulanması, pestisitli bitkilerden toprağa, toprak altı sularına, dolayısıyla su ekosistemine karışması ya da pestisitle bulaşmış atmosfer içindeki partiküllerin yağmur suları ile taşınması sonucu sulara pestisit bulaşmaktadır. Pestisitler doğrudan toprak yüzeyine ve içine, bitki üzerine veya tohum ilaçlaması şeklinde uygulanmaktadır. Bitki yüzeyine atılan pestisitlerin önemli bir kısmı toprağa düşmekte ve toprağa düşen pestisitler toprak tipine, çözünürlüğüne, kalıcılık ve iklim faktörlerine bağlı olarak toprak içinde zamanla hareket edebilme kabiliyetine erişmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu bazı organik klorlu pestisitlerin toprağa uygulanması halinde % 50 'den fazlasının 15-16 yıl toprakta kalabileceği tespit edilmiştir [24]. Hayvansal besinler, özellikle organik klorlu pestisitlerin birer kalıntı kaynağı olup yapılan araştırmalar hayvansal besinlerin daha yüksek oranda pestisit kalıntısı taşıdığını açıkça göstermektedir. Pestisitler hayvanların dokularında pestisitlerin cinsine ve derişimine bağlı olarak birikebilmektedir.

#### **1.1.6. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri**

İnsanlar pestisitlere oral, solunum, göz ve deri gibi farklı yollarla maruz kalabilmektedir. Pestisitler maruziyet miktarı, pestisit tipi ve metabolizmaya bağlı olarak, basit alerjik reaksiyonlardan başlayarak kişiyi ölüme kadar götürebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), yılda en az 3 milyon pestisit kaynaklı zehirlenme vakası ve buna bağlı olarak yaklaşık 220.000 ölüm olayı yaşandığını bildirmektedir. Gelişmiş ülkelerde bitki koruma ürünlerinin pazara sunulmasına ilişkin düzenlemeler üzerinde çalışılmaktadır. Bir pestisit ürünündeki tüm aktif maddelerin farklı biyolojik sistemlere uygulanması kapsamlı bir dizi testle araştırılmaktadır. Pestisitler akut veya tekrarlayan düşük seviyeli maruziyet sonrası kronik toksik etkide bulunabilirler. Akut zehirlenme, pestisitlere maruziyet sonrası genellikle 24 saat içerisinde meydana gelen kalıcı olmayan zehirlenmeler olup belirtileri; karın ağrısı, mide bulantısı, kusma,

diyare, kilo kaybı, iştahsızlık, baş dönmesi, baş ağrısı, zihin karışıklığı, burun ve boğazda tahriş, ciltte kaşıntı/döküntü, gözlerde batma, bulanık görme, körlük ve nadiren ölümdür. Pestisitler içerdiği aktif bileşiklerin toksik tehlike derecesine göre sınıflandırılması WHO tarafından yapılmıştır [25]. Yaş, cinsiyet, ırk, sosyoekonomik durum, beslenme düzeni, sağlık durumu, maruziyet süresi ve şekli, pestisit derişimi, pestisitlerin etkisi ve etkisi altındaki insanlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Pestisitlerin akut etkileri tahriş, dermatite, sistemik absorpsiyona bağlı olarak ölüme dahi sebebiyet verebilmektedir. Solunum ve kardiyovasküler hastalıklar, pestisitlerin etkilerine daha duyarlıdır. Astım veya şiddetli alerjiler, bunlardan yanıt düzeyi yüksek olanlardır. Pestisitlerin insanlar üzerindeki kronik etkileri kanser, doğum sonrası etkiler, nörolojik etkiler, epilepside artış ve Parkinson, hipertansiyon, doğurganlığın ciddi ölçüde azalması ve kısırılık olarak sıralanabilir [26]. Pestisitlerle insanların teması, ilaç üretimi, taşıma, depolama, kullanma ve ilaç kalıntısı içeren ürünlerin tüketimi sırasında olmaktadır. Bu etkileşim sonunda insan vücuduna girmeleri ise özellikle ağız, deri ve solunum yoluyla olmaktadır. Pestisitlerin yanı sıra, parçalanma ürünleri olan metabolitleri de insanlar üzerinde ciddi etkileri olabilmektedir. Bu maddelerin bir kısmının biriktiği, bir kısmının da birikmediği halde sinir hücrelerinde tahribat yaptığı için tehlikeli sonuçları olabilmektedir. Pestisitlerin çoğu kanserojenik ve alerjik etkiler gösterirler. Pestisitler, insanların yakın çevresinde bulunan ve insanlara yarar sağlayan büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanları gibi canlılar üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir. Hayvanlarda da insanlarda olduğu gibi zehirlenmelere sebep olurlar. Pestisitlerin, çiftlik hayvanlarının yağ, süt, et ve yumurta gibi ürünlerinde birikebileceği göz ardı edilmemelidir. Pestisitler, suya taşınmaları sonucu balıklarda da zehirli etki gösterirler. Bu etkiler sonucu, suda yaşayan canlılar kitleler halinde ölebilirler [17].

### **1.1.7. Pestisitlerin Tayin Yöntemleri**

Gıdalarda organoklorlu pestisitlerin kromatografik tayinlerine ilişkin farklı çalışmalar yapıldığını literatürdeki çalışmalar açıkça göstermektedir. Bu çalışmalardan bazılarını sıralamak gerekirse;

G. M. M. Anwarul Hasan ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada yumurta örnekleri işlenmeden önce, kabuğu çıkarılarak yüksek hızlı bir karıştırıcıda bütün yumurta



harmanlanmıştır. Ekstraksiyon yöntemi, küçük değişikliklerle orijinal QuEChERS yöntemine gerçekleştirilmiştir [27]. Yumurta örneklerinden OCP'lerin ekstraksiyonu için toplam 10 g numune homojenize edilerek tartıldıktan sonra 50 ml'lik polipropilen tüpe aktarılmıştır. Daha sonra 1 g sodyum klorür ve 20 mL (n - hekzan: aseton = 1/1, v/v) tüp içindeki örneğe eklenmiş ve örnek vorteks karıştırıcı ile 5 dakika iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan numuneler daha sonra 10 dakika ultrasonik banyoya alınarak daha sonra 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, susuz sodyum sülfat ile 100 mL'lik başka bir tüpe aktarılmıştır. Tüm süreç tekrar edilmiştir. Gaz kromatografisi (GC) analizinden önce, saflaştırılmış çözücü 0.22 µm membran filtreden süzülmüştür. Daha sonra her bir özütü GC-MS/MS Analizi için 2 mL'lik numune şişelerine aktarılmıştır. Yumurta örneklerinde bilinen iki konsantrasyon: 1 µg kg<sup>-1</sup> ve 2 µg kg<sup>-1</sup> eklenmiş örneklerdir. Eklenmiş numuneler ve boş numuneler arasındaki karşılaştırmadan geri kazanım performansı değerlendirilmiştir. OCP kalıntılarının geri kazanım yüzdesi (%) yumurta için % 82.19 olarak tespit edilmiştir.

Rafat Ahmad ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada Ürdün'den toplanan yumurta, tavuk ve etten (kuzu ve dana) oluşan 519 numunede organoklorlu pestisit (OCP) kalıntıları örnekler belirlenmiştir. Tüm numuneler, aldrin, diklorodifeniltriokloroetan ve metabolitler (DDT'ler), dieldrin, endosulfan izomerleri, endrin, heksaklorosikloheksan izomerleri (HCH'ler), heptaklor, heptaklor epoksit ve heksaklorobenzen (HCB) kalıntı içerikleri açısından analiz edilmiştir. Örnekler, 25 °C' de 8 saat boyunca Soxhlet ile ekstrakte edilmiştir. Numunelerin temizlenmesi Florisil kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve analiz bir elektron yakalama detektörü (GC-ECD) ile donatılmış bir gaz kromatografisi üzerinde yapılmıştır. Sonuçlar, incelenen yumurta, tavuk ve et numunelerinin sırasıyla yumurtada % 28'inin (38/134), tavukta % 20'sinin (23/115) ve ette % 49'unun (131/270) OCP kalıntıları ile kontamine olduğunu göstermiştir [28].

Octavio P. Luzardove arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Kanarya Adaları pazarlarından toplanan üç farklı üretim türünden (geleneksel, serbest dolaşan ve organik) yumurtalar üzerinde 16 polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), 20 organoklorlu pestisit (OCP) ve 18 poliklorlu bifenil (PCB) analizi yapılmıştır. Konvansiyonel olarak üretilen yumurtalardaki PAH konsantrasyonları, serbest dolaşan veya organik yumurtalardan neredeyse 4 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Seçilen türe bakılmaksızın, yumurta tüketimine dayalı olarak organoklorlu

kirleticilerin ortalama diyet alımı tahminleri, Kanarya Adaları nüfusu için ihmal edilebilir düzeydedir. Bununla birlikte, PAH'ların medyan diyet alım tahminleri, büyük ölçüde seçilen yumurta tipine bağlıdır [29].

Canbay ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 20 adet bal örneğinde, Isparta ve çevresinde sıkça kullanılan organofosforlu pestisit ve piretroid grubu 10 adet pestisit analizi yapılmıştır [30]. Elde edilen veriler ışığında Isparta ve çevresinde sıkça kullanılan organofosforlu ve piretroid ester insektisitlerin kalıntı miktarları ölçülebilir değerde bulunmuştur. Kovan ballarında diklorvos, paratyonmetil, methidathion ve azinfos-etil dedekte edilememiştir. Bunun yanında diazinon 0.021 ng g<sup>-1</sup>; klorpirifos 0.024 ng g<sup>-1</sup>; malathion 0.020 ng g<sup>-1</sup>; ethion 0.046 ng g<sup>-1</sup>; sipermethrin 0.021 ng g<sup>-1</sup>; deltamethrin ise 0.019 ng g<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Paketlenmiş bal örneklerinde ise, çalışmada yer alan pestisitlerden hiçbiri ölçülebilir değerde değildir.

Hepsağ tarafından yapılan bir çalışma ise domatesler üzerinde yapılmıştır bu çalışmada Mersin ili ve çevresindeki illerden temin edilen domates örneklerinde 205 farklı pestisit taraması yapılmıştır. Domateslerde bulunan pestisitlerin Türk Gıda Kodeksi ve AB (Avrupa Birliği) MRL (Maksimum Residue Limiti)'ne göre değerlendirilmiş, örneklerin % 74'ünde pestisit kalıntısına rastlanmazken, Örneklerin % 18'inde dimethoate (ortalama 3.289 mg kg<sup>-1</sup>), chlorpyrifos (ortalama, 3.528 mg kg<sup>-1</sup>) ve endosülfan (ortalama 2.854 mg kg<sup>-1</sup>) bulunmuştur. Sadece kalıntı seviyesi dedekte edilebilen seviyenin (LOQ) üzerinde çıkan 4 örnekte methomyl 0.487-0.687 mg kg<sup>-1</sup>, 4 örnekte acetamiprid 0.584-0.682 mg kg<sup>-1</sup> aralığında tespit edilmiştir. Ancak bu değerler Türk Gıda Kodeksi (TGK) ve Avrupa Birliği (AB) Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL)'nin altında değerlerdir [31].

## 1.2. Yumurta ve Kimyasal Yapısı

Yumurta, embriyonun gelişimi için gerekli olan tüm etkili maddeleri yapısında bulunduran tek gıda maddesi olarak öne çıkmıştır. Yumurtanın % 9.5'ni kabuğu, % 63'nü yumurta akı ve % 27.5'ni yumurta sarısı olup yumurta kabuğu mineral kaynağı, yumurta akı protein kaynağı ve yumurta sarısı yağ açısından önemli ve fonksiyonel bir biyoaktif bileşen olup insan sağlığı açısından önemli bir gıda maddesidir. Ayrıca koruyucu amaçla antibakteriyel, antiviral, anti-kanser ve hastalıklara karşı koruyuculuk gibi özelliklerinden dolayı tercih sebebidir. Bir adet yumurta bir bireyin günlük yağ

ihtiyacının % 7.5'ni, doymuş yağ ihtiyacının % 8'ni ve günlük kolesterol alım ihtiyacının % 7'sini karşılayabilmektedir. Yumurta sarısı A, D, E ve K vitaminlerini içermekte olup yumurta akında B1 ve B12 vitaminleri bulunmakta ve B2 ve B9 vitaminleri hem sarısında hem akında bulunmaktadır. Yumurtanın kimyasal yapısı tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 1.1.** Yumurtanın kimyasal yapısı [32]

Yumurtanın kompozisyonu (100 g)			
Bileşen	Bütün Yumurta	Yumurta Akı	Yumurta Sarısı
Protein	12.0	10.2	16.1
Karbonhidrat	1.0	1.0	1.0
Yağ	10.9	-	34.1
Kül	1.0	0.680	1.7

Yaklaşık %10 kabuk, %30 sarı ve %60 aktan ibaret olan ve %10 düzeyinde protein içeren yumurta ortalama olarak 50-60 g ağırlığındadır. Tavuk yumurtası, erişkin bir insanın günlük protein ihtiyacının yaklaşık olarak %10'unu karşılayabilmekte olup yetişkin bir insanın günlük alması gerekli hayvansal kaynaklı protein miktarının (kadın için günlük 24.2 g, erkek için günlük 28.6 g olduğu düşünülürse) hemen hemen 1/4' ünü bir yumurta ile karşılanabilir [33].

### 1.2.1. Yumurta ve Pestisit

Yumurta ve yumurta ürünlerindeki pestisit kalıntıları son dönemlerde büyük bir küresel endişe haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda, yumurta ve yumurta ürünlerinde fibronil ve metabolitleri gibi insektisitler için analitik yöntemler tespit edilerek giderilmeye çalışılmaktadır. Bununla birlikte, yumurtalar için çoklu kalıntı analiz yöntemleri üzerinde az sayıda çalışmalar yapılmıştır. Gıdalardaki pestisit kalıntılarını izlemek için en faydalı olan çok kalıntılı analitik bir yöntemdir; kullanımı insan sağlığına yönelik olası riskleri önleyebilmek adına çok önemlidir. Bugüne kadar, yumurta matrikslerinin çoklu kalıntı analizlerinde pestisitlerin ekstraksiyonu için LC-MS/MS ile birleştirilmiş QChERS kullanımını bildiren çok az sayıda çalışma vardır

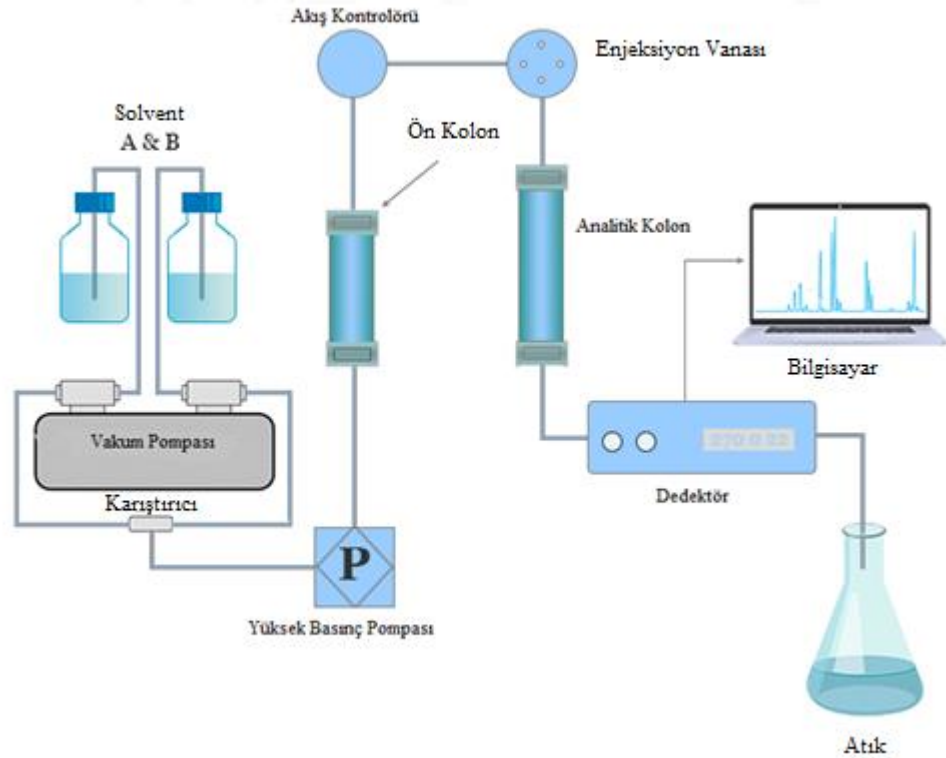
[34]. Yumurtanın besin zincirinde yüksek tüketimi nedeniyle kalitesi ve güvenliği göz önünde bulundurulmalı ve bunun için geçerli ve güvenilir önlemler alınmalıdır. Pestisitler ve veteriner ilaçları yumurtada bulunabilecek maddelerdendir. Pestisitler, veteriner ilaçları ile birlikte genellikle tehlikeli hastalıklara neden olabilecek hastalıkların yayılmasını önlemek amacıyla kullanılır. Pestisitlerin kötüye kullanılması yumurta, süt ve bal gibi özellikle hayvansal gıdalarda tehlikeli sonuçlara sebep olabilmektedir. Sonuç olarak, bu ürünlerdeki pestisitlerin değerlendirilmesi tüm dünyada büyük bir talep ve ihtiyaç haline gelmiştir [35].

### **1.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi**

Kromatografi, bir karışım içerisindeki bileşiklerin biri hareketli diğeri sabit iki faz arasındaki farklı tutunma özelliklerine dayanarak yapılan ayırma işlemine dayanan bir tekniktir. Kromatografi kelime anlamı olarak, renkli yazılım (Chromatography: chroma renk, graphy ise yazılım) anlamına gelmektedir. Kromatografi ilk kez 1900'lerin başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett, klorofil ve ksantofil gibi çeşitli bitki pigmentlerini ayırmak için bu yöntemi kullanmıştır. Tswett, cam bir kolonda, CaCO<sub>3</sub> adsorbanı üzerinden bitki ekstresinin petrol eterli çözeltisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu görmüştür. Kromatogram; kolondan çıkan maddenin derişimlerinin uygun bir dedektör ile ölçülerek zamana karşı çizilen grafik olarak tanımlanmaktadır. Grafikte X-ekseni zamanı göstermektedir. Y-ekseni ise kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans, fluoresans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.) göstermektedir. Alıkonma zamanı genellikle dakika cinsinden verilmektedir [36]. Kromatografik analizlerde kullanılan Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) son dönemlerde bilim insanları tarafından zaman ve enerji tasarrufu sebebiyle tercih edilmektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi günümüzde analitik kimyanın en önemli araçlarından biridir. Sıvıda çözünebilen herhangi bir numunedeki bileşenleri ayırma, tanıma ve miktarını belirleme kapasitesine sahiptir. Günümüzde ppt (trilyonda bir

kısım) seviyesinde eser konsantrasyona sahip bileşikler bile kolayca tanımlanabilmektedir. HPLC farmasötik, gıda, kozmetik, çevre ve endüstriyel gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi veya Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi olarak tanınan HPLC tekniği; sağlıktan ziraata kadar fen bilimlerinin birçok dalında kullanılan gelişmiş bir kromatografi tekniğidir. Çözünür forma geçebilen tüm bileşikler (aminoasitler, şekerler, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler, gıda tatlandırıcıları ve renklendiricileri ve bunların türevleri vb.) bu teknik ile kantitatif olarak hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilebilmektedir. HPLC cihazını oluşturan başlıca bileşenler; mobil faz, pompa, kolon ve kolon fırını, degazör, otoörnekleyici ve enjektör, dedektörlerden oluşur [37, 38].



**Şekil 1.3.** HPLC Sistemi

**Mobil faz;** kullanılacak olan çözücüü içeren hareketli fazdır. HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan yapılmış hazne içermektedir. Hazne içinde bulunan fazlarda çözülmüş gazlar bant genişlemesine ve dedektör performansının düşmesine sebep olmaktadır. Hareketli faz, hazneye doldurulmadan önce vakum altında süzülerek gaz halindeki maddeler uzaklaştırılmalıdır.

**Kolon;** ayrımın gerçekleştiği esas yerdir ve seçimi bu yüzden önem taşır. Eğer sistemimizde kolon fırını da varsa sıcaklığı da kontrol edebiliriz ki bu çalışmamızın hassasiyetini arttıracaktır. Her yeni kolon ilk takıldığında üreticinin tavsiye ettiği gibi bir mobil faz geçirilerek şartlandırılmalıdır. Bu işlem yaklaşık 30-45 dakikadır. Ayrıca kolon değişimi yaparken de sökülen kolonlar uygun çözücü ile yıkanıp, her iki ucu kapatılıp saklanabilir.

**Degazör;** mobil fazın kolona gelene kadar sistemde oluşabilecek hava kabarcıklarının atılması görevini görür.

**Oto örnekleyici ve enjektörler;** örnekten istenilen miktarda çekilerek mobil fazla beraber kolona verilmesini sağlar. Eski HPLC cihazlarında manuel enjeksiyon kullanılıyordu, bu hem hata payını arttırıyordu hem de kullanıcının cihaz başında beklemesini mecbur bırakıyordu. Oysa oto örnekleyiciye (otosampler) sahip bir HPLC sisteminde 90 örneğe kadar yükleme yapıp çalıştırılabilir.

**Dedektörler;** örnekteki analitleri ölçülebilir sinyallere çevirerek kantitatif analize imkân sağlar. Absorbans (UV, DAD) dedektör, floresans dedektör, kırılma indisi dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör ve iletkenlik dedektörü gibi çeşitleri vardır. Hatta son zamanlarda HPLC ye kütle dedektörü (MS) bile eşzamanlı olarak entegre edilebilmektedir [39].

Yüksek basınçta yapılan kromatografide, sisteme verilmeden önce, hareketli fazın içerisindeki çözülmüş gazlar uzaklaştırılmalıdır; aksi halde HPLC' de, hava, hareketli fazda, yüksek basınç altında çözüneceğinden, pompa başında veya dedektör hücresinde, doğru analize imkân vermeyen, hava kabarcıkları oluşur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur. Hareketli fazdan gaz uzaklaştırma işlemi ısıtma veya vakum uygulayarak olur. Vakum Uygulama işlemi degazör ile sağlanır. Degaze işlemi özellikle, gazların kolayca çözüldüğü su, alkol ve asetonitril veya bunların karışımı için gereklidir [40].

Kullanılacak HPLC metodunun geliştirilmesi için öncelikli olarak analizin amacı ve gerekçeleri öncelik olarak belirlenmelidir. Bu kapsam ve amaçla, analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek kullanılacak olan dedektör, mobil faz, durgun faz ve çalışılacak olan HPLC sistemi belirlenir. Devamında ise; metodu geliştirmek için ayrılacak olan zaman, enjeksiyon başına maksimum analiz zamanı, birim zamanda incelenecek olan örnek sayısı, olası analit degradasyonları (hidroliz, fotoliz, dehidrasyon, termoliz vb.) ve bozunma ürünleri öngörülerek belirlenmelidir. Son olarak ise geçerliliğin gereği olarak tayin sınırı, doğrusalılık, doğruluk ve kesinlik

parametreleri tespit edilmelidir. Bu bahsedilenlerden yola çıkarak yapılacak aşamaları aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz [41].

- Örneğe ait fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi
- Örnek hazırlanmasına ait detayların belirlenmesi
- Dedektör seçiminin yapılması
- Kromatografik ayırma koşullarının saptanması
- Kromatografik koşulların optimize edilmesi
- Muhtemel problemler için özel çözüm işlemlerinin saptanması
- Rutin laboratuvar analizleri için metodun validasyonu

HPLC, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde, kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Belirli bir bileşiğin, sabit ve hareketli faz üstünde, ayırt edici bir hareket sabitliğinin olduğu göz önünde bulundurularak yapılan ayırmadır. Herhangi bir karışım içerisindeki hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılması işlemi HPLC ile rahatlıkla yapılmaktadır. Saflaştırma işleminde, saflaştırılacak bileşiğin özelliklerine uygun hareketli faz ve kolon seçimi yapıldığında iyi bir ayırım gerçekleştirilir ve ayrıca yüksek saflık elde edebilmek içinde diğer bileşiklerin kolon içerisindeki göç hızlarının yeteri derecede birbirinden farklı olması gerekmektedir. Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla HPLC yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HPLC 'nin yaygın bir şekilde kullanılması kısmen hızına, basitliğine ve ayırmalarda oldukça başarılı oluşuna ayrıca ayrılan türlerin kantitatif olarak belirlenmesine bağlıdır. Kantitatif analiz analit pikinin pik yüksekliği veya pik alanı ölçümleri esas alınarak yapılmaktadır. Pik alanı derişim ile doğrusal olarak değişmektedir. Dikkat edilmesi gereken parametreler, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır [42]. Bunlara ek olarak kolonun aşırı yüklenilmesinden kaçınılması gerekmektedir. Numune enjeksiyon hızının etkisi, kromatogramda erken gelen pikler için özellikle önemlidir.

## 1.4. Gıdalarda Pestisitlerin Kromatografik Analizlerinde Örnek Hazırlama Tekniklerinin Geliştirilmesi

Gıda analizlerinde kullanılan çok çeşitli pestisitler vardır. Analitik kimya alanında çalışan araştırmacılar için gıda örnekleri üzerinde çalışmak oldukça zordur. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar için kromatografik tekniklerin etkili olması gerekir. Yasal olarak güvenli tüketim için gıdalardaki kalıntı analizleri düzenli bir şekilde izlenmeli ve gerekli analizler yapılmalıdır. Maksimum kalıntı seviyelerinin (MRL) sağlıklı şekilde değerlendirilebilmesi için örnek hazırlama yöntemlerinin doğru tespit edilmesi ve uygulanması gereklidir. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için numune hazırlama tekniklerine önem vermek gerekir. Birçok analizde olduğu gibi gıda örnekleri analizlerinde de örnek hazırlama yöntemi en yorucu ve uzun kısımdır. Doğru analizin formülü çok sayıda analiz yapmaktır. Bu yüzden analitik laboratuvarlarda numune hazırlama işlemleri çok önemlidir. Besin kaynağına bağlı olarak pestisitlerin sayısı geniş bir aralıkta değişebilir. Çok sayıda gıda matriksi üzerinde farklı numune hazırlama yöntemleri gerekmektedir [39].

Türkiye’de pestisit kullanımına bakıldığında ise Ege ve Marmara Bölgeleri’nde diğerlerine nazaran çok daha yoğun pestisit kullanılması sorun teşkil etmektedir [43]. AB ülkelerine göre kıyaslandığında ise Türkiye’de çok daha az pestisit kullanıldığı görülmektedir [44]. Tarımsal olarak benimsenen ilke ise pestisitlerin gerekli olduğu kadar ve çevreye, insan sağlığına zarar vermeyecek düzeyde kullanılmasıdır [45].

Pestisit kullanımının yararları yabancı ot ve haşereleri kontrol etmek, böceklerden kaynaklanan hastalıkları azaltmak ve gıda güvenliğini sağlamak olsa da ekosistem üzerindeki olumsuz etkileri oldukça endişe vericidir. Zararlıları öldürmenin yanı sıra, pestisitler, belirtilen talimatlarla çelişiyorsa evcil hayvanlar, kuşlar, balıklar, faydalı böcekler ve hedef olmayan bitkiler de dahil olmak üzere hedef olmayan organizmalar için toksik olabilmektedir [46].

Çevre ve gıda örneklerindeki pestisit kalıntı analizleri yıllardır dünyanın her yerinde birçok resmi ve özel laboratuvar tarafından uygulanmaktadır. Pestisit kalıntı analizleri için en etkin yaklaşım ise kuşkusuz birden çok pestisit sınıfını içeren çoklu kalıntı analiz metodlarıdır. Çoklu kalıntı analiz metodları, yüksek analiz maliyetini düşürür ve laboratuvarların performanslarının artmasını sağlayarak daha fazla talebin karşılanmasına katkı sağlar [47]. Pestisit çoklu kalıntı analizi, gıda matrikslerindeki iz



bileşenleri belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin sınırlamalarını ve dezavantajlarını ortadan kaldırmak için solvent ekstraksiyonu ve temizleme adımları da dahil olmak üzere etkili ve kullanışlı bir numune hazırlama yaklaşımına ihtiyaç vardır. QuEChERS (hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli) numune hazırlama tekniği minimum çözücü sağlayarak basit ekstraksiyon ve temizleme adımları içerir. Bu yaklaşım yüksek analit geri kazanımları nedeniyle pestisit kalıntılarının analizi için geliştirilmiş ve yaygın olarak uygulanmıştır [48]. Çoklu kalıntı analiz metotları yüksek verim ve zaman ve ekonomi tasarrufu sebebiyle son yıllarda bilim insanlarının tercihi haline gelmiştir. Bu sebeple gıda analizlerinde farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bu teknikler aşağıda sıralanmıştır.

- Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE)
- Katı Faz Ekstraksiyon (SPE)
- Matriks Katı Faz Dağılımı (MSPD)
- Katı Fazlı Mikroekstraksiyon (SPME)
- Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (SBSE)
- Sıvı Fazlı Mikroekstraksiyon (LPME)
- Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)
- Tek Damla Mikroekstraksiyon (SDME)
- Oyuk Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME)
- Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME)
- Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)
- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)
- Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon (PLE)

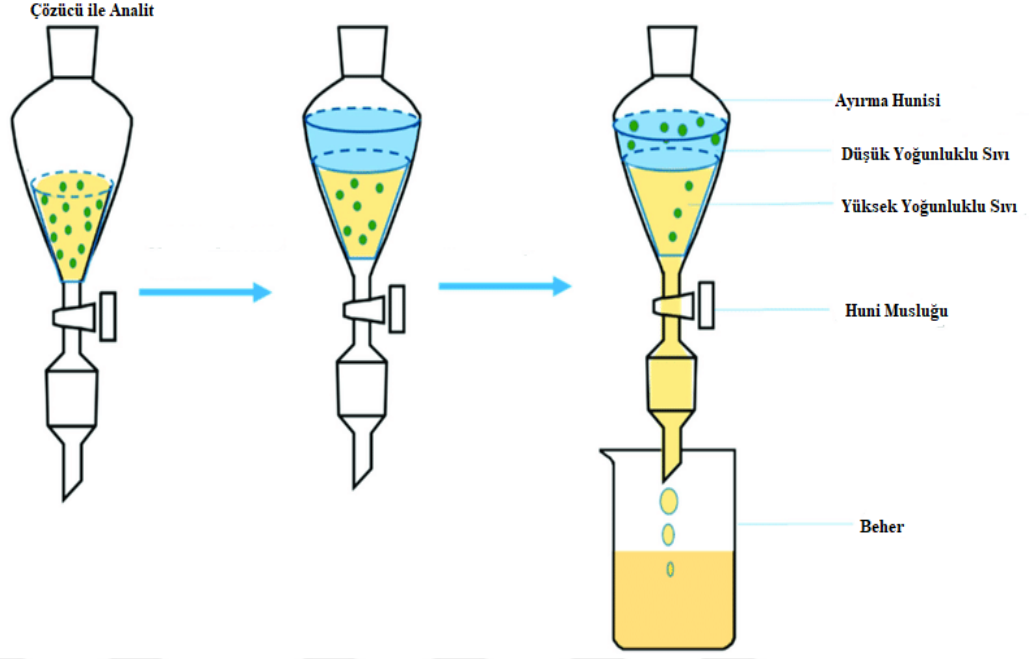
#### 1.4.1. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE)

Birbiri içerisinde homojen olarak karışmayan iki analitin dağılmasıyla oluşan ekstraksiyon işlemine sıvı sıvı ekstraksiyon denir.

Çeşitli maddelerin zenginleştirilmesinde ve var oldukları ortamdan geri kazanılması gibi işlemlerde sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) işlemi uygulanır. Bu metotun esası sulu karışmayan örnekten organik çözücü yardımıyla maddenin ekstraktına dayanır. Bazı dezavantajlara da sahiptir. Bunlardan birkaçını sıralamak gerekirse çevreye zarar verebilmesi, toksik çözücü ve örneğin çok kullanılabilmesi, çok fazla aşamada gerçekleşerek zaman alıcı olması gibi faktörler sıralanabilir [49]. Prosesin uygun şekilde düzenlenmesine olanak verdiği için katı-sıvı ekstraksiyona göre daha çok tercih edilir [50]. Enerji maliyetleri düşünüldüğünde son yıllarda sıvı sıvı ekstraksiyonun çözelti bileşenlerini ayırma açısından büyük bir öneme sahip olduğu görülmüştür [51].

LLE genel olarak organik maddelerde kullanılan geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Ekstraksiyon numuneden gelen pestisit kalıntılarının matriksi yüksek oranda parçalaması yoluyla olur [38].

Sıvı sıvı ekstraksiyonu iki aşamada gerçekleştirmek mümkündür. Bunlar kesintili ve sürekli olarak ikiye ayrılır. Kesintili ekstraksiyonda katı karışımların ekstraksiyonu için cam kapaklı bir erlendeki çözelti sadece ayrılacak olan maddeyi çözebilen bir çözücü ile bir süre çalkalanır. Daha sonra aktarma, süzme ve santrifüjleme ile ayrılma sağlanır. Bu işlemde önemli olan kısım ayrılacak olan maddenin miktarı ve çözünürlüğüne bağlı olarak uygun hacimdeki bir çözücü ile birkaç kez çalkalanmasıdır. Sürekli ekstraksiyon ise ayırma hunisi ile yapılır. Burada önemli olan analit içeren çözeltide analiti daha çok çözen ayrıca analit ile de karışmayan bir çözücü ile karıştırmaktır. Analitin mümkün olduğu kadar ayrılabilmesi için kaç defa karıştırılması gerektiğini matematiksel olarak hesaplamak gerekebilir [52].



**Şekil 1.4.** Sıvı Sıvı Ekstraksiyonun Şematik Gösterimi [53]

Pestisitler geniş bir uygulama yelpazesinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve yüksek tüketim oranları nedeniyle uzun süre dayanabilecekleri çevre ve su kaynakları gibi yerlerde bulunurlar. Pestisitlerin genellikle tehlikeli yan etkileri vardır ve düşük konsantrasyonlarda bile bir dizi zararlı hastalığa neden olabilir. Bu amaçla, çevresel örneklerden pestisitlerin çıkarılması ve belirlenmesi, numune karmaşıklığından ve birçok numunedeki düşük pestisit konsantrasyonlarından kaynaklanan önemli zorluklar sunar. Genellikle, düşük konsantrasyonları ve numunelerin karmaşıklığı nedeniyle pestisitlerin doğrudan ekstraksiyonu ve belirlenmesi imkansızdır. Numune hazırlamanın ana hedefleri, karışan türleri ortadan kaldırmak, hedef analit/analitleri önceden konsantre etmek ve analitleri (gerektiğinde) daha kararlı formlara dönüştürmektir. Bu sebeple sıvı sıvı ekstraksiyon pestisit analizlerinde tercih edilen bir yöntem olarak yerini almıştır [54].

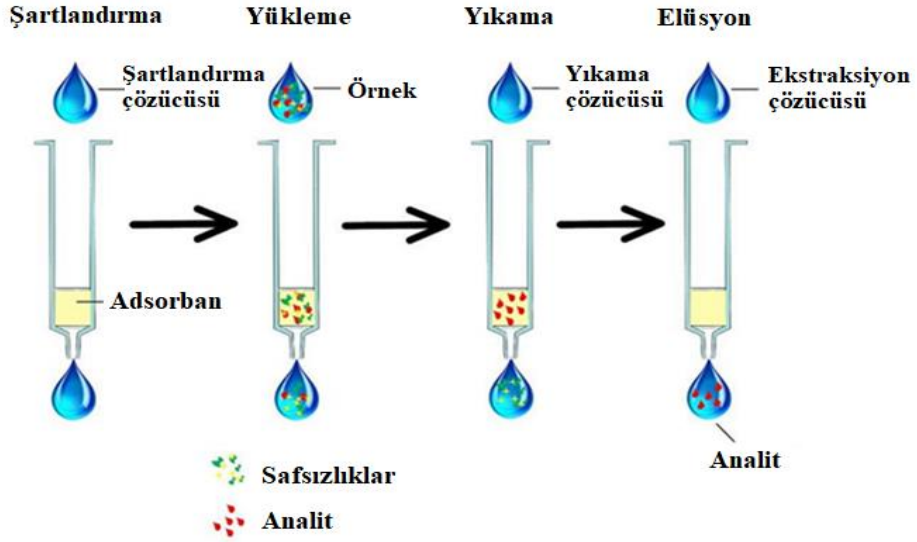
Mahdavi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise elmada pestisit kalıntıları belirlenmiştir. Bu çalışmada elma homojenize edilerek %1 asetik asit içeren 10 mL ACN eklenmiş ve karışım yaklaşık 1 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra, susuz magnezyum sülfat (4 g), sodyum klorür (1 g) ve sodyum asetat (1.5 g) eklenerek karışım 5 dakika boyunca 3450 rpm'de santrifüjlenmiştir. Saflaştırma işlemi yapmak için ekstraksiyondan elde edilen çözeltiliye 0.6 g susuz magnezyum sülfat ve 0.2 g poli

ikincil âmin (PSA) eklenmiştir. Örnekler 1 dakika boyunca çalkalanmış ve daha sonra 3 dakika santrifüjlenmiştir. Üstte kalan faz bir şırınga filtresi kullanılarak filtreden geçirilmiştir ve ardından 1 mL 'ye buharlaştırılmıştır. Kalan çözelti LC-MS/MS'e enjekte edilmiştir. Bu sonuçlara göre elmalarda % 68 oranında pestisit kalıntısı tespit edilmiştir. Sağlık açısından değerlendirildiğinde tüketicilerin yüksek risk altında olmadığını ancak tespit edilen pestisit kalıntısı nedeniyle kontrol planlamasının yapılması gerektiği belirtilmiştir [55].

Timofeeva ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada elma, kiraz, ahududu, portakal ve ananas suları süpermarketlerden (Rusya'nın Saint Petersburg kentinden) satın alınarak malathion, diazinon, imidacloprid ve triadimefon düzeyleri belirlenmiştir. İlk adımda 0.3 mL numune alınmış ve üzerine 0.6 mL asetonitril ilave edilmiştir. Örnek ve asetonitril 30 s boyunca karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiş, 0.3 mL glikoz çözeltisi ( $400 \text{ g L}^{-1}$ ) eklenerek karışım 60 s boyunca karıştırılmıştır. Şırınga pompası ve karıştırıcı, ekstraksiyon ve faz ayrımını sağlamak amacıyla 20 s durdurulmuştur. Son aşamada pestisit içeren üst asetonitril fazı HPLC-MS/MS sistemine verildi. Elde edilen sonuçlara göre doğrusal kalibrasyon aralıkları malathion ve triadimefon için  $0.01\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$ , diazinon için  $0.001\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$  ve imidacloprid için  $0.1\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Yöntemin RSD (n=4) olarak ifade edilen tekrarlanabilirliği % 3- % 5 aralığında tespit edilmiştir [56].

#### **1.4.2. Katı Faz Ekstraksiyon (SPE)**

SPE ayırma teknikleri arasında sık kullanılan bir yöntemdir. Numunelerden genellikle pestisitleri, zararlı organik bileşikleri, zehirli metal iyonlarını belirlemede ve ayırmada tercih edilen bir yöntemdir [57]. SPE eser elementlerin zenginleştirilmesinde kullanılan bir katı faz özütleme tekniğidir. Katı faz özütleme alanında bazı yeni çalışmalar yapılmıştır. Bunlar geniş yüzey alanı, analite karşı seçicilik, asit ve bazlara dayanıklılık, yüksek adsorpsiyon kapasitesi gibi iyi performanslı materyallerin sentezi ve elde edilmesi ile ilgilidir. [58].



**Şekil 1.5.** Katı faz ekstraksiyonun basit şematik gösterimi [59]

SPE yöntemi ile küçük ve tek kullanımlık ekstraksiyon diskleriyle veya kolonlara dolgu maddeleri doldurularak yoğunlaştırma, istenmeyen bileşenlerden ayırma gibi işlemler yapılmaktadır. Daha sonraki analiz aşamaları için uygun matriksler, kolon ve disk değişimleri sağlanmaktadır. Kolondan geçirilme esnasında örnek molekülleri ile dolgu maddesi olarak adlandırdığımız tutucu madde arasında kimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Bu şekilde iki ayırım meydana gelir. En çok tercih edilen analiz edilecek örnek tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde kalırken istenmeyen bileşenler madde ile herhangi bir temas geçemez ve bu şekilde uygun bir yıkama çözeltisi ile ayrımları sağlanır. Analiz edilecek madde ise tutucu materyalden uygun bir çözücüyle çözdürülerek ayrılır. Diğer yöntem ise çok fazla tercih edilmez. Burada istenmeyen maddenin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Bu yöntem matrisden ayrılması zor olan maddelerde kullanılır. Matrisde istenmeyen maddeler tutucu tarafından çok sıkı bir şekilde bağlanır ve aranan madde ile tutucu madde arasında herhangi bir etkileşim olmaz. Uygun bir çözücü kullanılarak çözdürülerek toplanır [35].

Sıvı ekstraksiyon teknikleri karşılaştırılırsa SPE yönteminin daha uygun ve uygulamasının basit olduğu görülecektir. SPE'nin daha farklı avantajları vardır.

Bunlar birkaçını sıralamak gerekirse;

- Diğer sıvı sıvı ekstraksiyon türlerine göre daha düşük hacimde solvent gerektirir
- Basit uygulanabilir ve zaman alıcı değildir
- SPE kartuşları kısa süreli depolama için kullanılabilir [40].

Han Yeong Kaw ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma yağlı biyolojik numunelere üzerinde yapılmıştır. Her gıda türünden yaklaşık 0,5 kg hemen homojenize edilmiş ve ardından 24 saat dondurularak kurutulmuştur. Tüm örnekler şişe içerisinde bir sonraki analize kadar -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır. Toplam 0.75 g ( $\pm 0.01$  g) numune hassas bir şekilde tartılmış ve 5 mL'lik bir santrifüj tüpüne alınmıştır. Her numuneye 150 ng standartlar (güçlendirilmiş numunelerde 150 ng karışık hedef analitler) eklenmiş ve ardından 1.5 mL asetoneitril ilave edilmiştir. Sonrasında 15 dakika ultrasonik banyoda ekstrakte edilen numunelerden 1 mL örnek enjekte edilmiştir. d-SPE adsorbenti kullanılarak ekstraksiyon sağlanmış ve yapılan analizde yumurtada metoksiklor saptanmıştır. Piretroid pestisitlerinin uygulanması büyük ölçüde arttığından biyota örneklerinde yaygın olarak tespit edilmiştir. Çiftlik somonlarındaki piretroidlerin tespit sıklığının % 100 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre hayvan yetiştiriciliği endüstrisinde piretroidlerin artan uygulamasının insan sağlığı ve çevre açısından yüksek antropojenik oluşuma neden olduğu saptanmıştır [60].

Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ahududu, çilek, yaban mersini ve üzüm Çin'deki süpermarketlerden satın alınmış ve örnekler homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenize edilen 10 g numune 50 mL santrifüj tüpüne aktarılmış ve 20 mL asetoneitril ile karıştırılmıştır. Karışım 2.0 dakika boyunca çalkalanmış ve daha sonra 5.0 g sodyum klorür eklenmiştir. Tekrar 2.0 dakika boyunca çalkalanmıştır. Karışım 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Katı fazlı ekstraksiyon (SPE), Envi-Carb kartuşu (3 mL ve 250 mg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler GC'ye enjekte edilmiştir. Bu çalışmada 88 pestisit analizinde SPE-GC-MS sistemi kullanılmıştır. SPE yönteminin avantajları arasında çeşitli meyvelere uygulanabilirliği, yüksek ekstraksiyon verimliliği ve düşük matriks etkileri sağlayan ön işlem ve numune başına sadece küçük hacimlerde çözücü kullanımı (44 mL asetoneitril, 8 mL toluen ve 1 mL

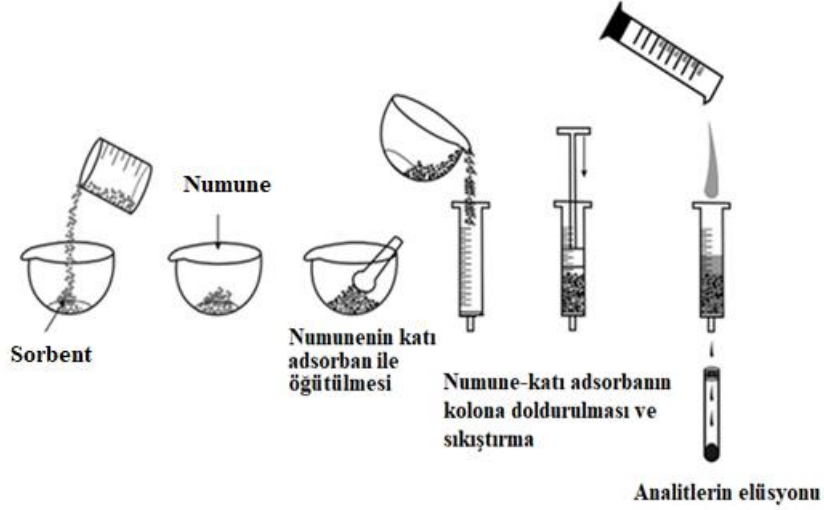
aseton) sayılabilir. Böylece, burada açıklanan yöntem, meyve matrislerindeki pestisitlerin rutin kalıntı analizi için uygulanabilir bulunmuştur [61].

### **1.4.3. Matris Katı Faz Dağılımı (MSPD)**

İdeal olarak bir numune hazırlama yöntemi aynı anda ekstraksiyon ve saflaştırma gerçekleştirebilmelidir. MSPD yöntemi bu adımları etkili bir şekilde geliştirmek için uygulanan bir yöntemdir [62].

Matris katı faz dağılımı 1989 yılında piyasaya sunulmuştur. Bu ekstraksiyon yöntemi 250'den fazla çalışmada kullanılmıştır. MSPD yöntemi çok çeşitli analitik yöntemlerin bir tür kombinasyonunu içerir. MSPD işleminde numune (katı veya sıvı) bir cam içine yerleştirilir. Uygun destek malzemeler kullanılır. Bunlar türevlendirilmiş silika (C18) veya oktadesilsiloksan (ODS) olabilir. Katı destek numune bir cam kullanılarak yaklaşık 30 saniye karıştırılır. Karıştırıldıktan sonra numune boş bir kolon veya SPE sorbentinin üzerinde elüsyondan önce temizlenir ve kurutulur. Sütun genellikle boş bir şırınga materyaline benzer. Paslanmaz çelik veya polipropilen frit, selüloz filtreden oluşabilir. SPE ve MSPD arasındaki temel fark numunenin kolon boyunca dağılmasıdır [42].

Bir dizi numuneden çeşitli bileşiklerin ekstraksiyonu ve analizinde matris katı faz dağılımının (MSPD) birçok kullanımının bir incelemesi sağlanmaktadır. Matris katı faz dağılımı (MSPD), katı, yarı-katı veya yüksek viskoziteli biyolojik numunelerin hazırlanması, özütlenmesi ve fraksiyonlanması için biraz genel bir analitik işlem olarak özel uygulama bulmuştur. Sadeliği ve esnekliği, bu amaçlar için daha klasik yöntemler yerine tercih edilmesine katkıda bulunur. MSPD numuneye mekanik karıştırma ile uygulanan ve numune matrisinin bir katı destek bağlı fazı (SPE) veya diğer katıların yüzey kimyası ile etkileşimlerini içeren birkaç basit kimya ve fizik ilkesine dayanmaktadır [63].



Şekil 1.6. MSPD Prosesi [64]

Matriks katı faz dispersiyonu (MSPD), günümüzde tek adımlı ekstraksiyon için yaygın olarak kabul edilen bir tekniktir. Son yıllarda MSPD'deki ilerleme, yeni ve özel olarak tasarlanmış malzemelerin dahil edilmesiyle devam ederek gelişme göstermiştir [65].

Kemmerich ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Brezilya'da en çok üretilen meyvelerden bazıları üzerinde (üzüm, elma, şeftali, trabzon hurması, incir, armut ve ayva) kalıntı analizi yapılmıştır. Bu sebeple meyveler üzerinde yapılan bir çalışmada organik bir üreticiden satın alınan meyveler UHPLC-MS/MS cihazları ile analiz edilmiştir. MSPD yönteminin uygulanabilirliğini değerlendirmek için yerel pazarlardan elde edilen elma, şeftali, armut ve erik meyve örnekleri analiz edilmiştir. Her numunedan 1 kg'lık bir kısım toplanarak saplar çıkarıldıktan sonra işlenmiş ve ekstraksiyona kadar  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon prosedürü 50 mL'lik bir tüpte  $0.500 \pm 0.001\text{ g}$  numune ağırlığından ve 1.0 g C18 sorbent ve 3 çelik top eklenmesinden oluşur. Analizi sağlanan meyveler  $5\text{ }\mu\text{L}$  olacak şekilde UHPLC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre meyvelerin içerisinde 133 farklı pestisit kalıntısı tespit edilmiştir [66].

P.C. Abhilash ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yerel marketlerden bazı gıda örnekleri (limon, portakal, elma, üzüm, muz, mango, havuç, patates, soğan, salatalık, domates, lahana, karnabahar, ıspanak, buğday ve yeşil gram) satın alınmıştır. Örnek hazırlama aşamasına geçmeden önce herhangi bir pestisit olmadığını doğrulamak için tüm matriks ekstraktları kontrol edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar



altında, 5 g numune matriksi 500 mg Florisil ile dağılmış ve 1 g susuz magnezyum sülfat ve 500 mg sodyum klorür ile karıştırılmıştır. Nötr alümina (2 g) ve susuz sodyum sülfat (500 mg) içeren bir cam sütuna aktarılmıştır. Dağınık numune matriksi daha sonra 10 ml *n*-hekzan-etil asetat karışımı (70:30, v/v) ile elde edilmiş ve aynı çözücü karışımının 10 ml'si ile tekrarlanmıştır. Çivili numuneler için önerilen yöntemin geri kazanımları % 93 ile % 103 arasında değişmektedir ve günlük değişkenlik % 5 ile % 10 arasında kalmıştır. *A*-, *β*-, *γ*- ve *δ*- HCH'nin algılama sınırı (LOD) sırasıyla 3, 6, 4 ve 5 ng g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Gıda matriksleri ve şifalı bitkilerdeki HCH kalıntılarının analizi için bu yöntemin güvenilirliğini ve etkinliğini doğrulayan gerçek örneklerin rutin analizinde tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Kullanılan yöntem kesin, doğru ve tekrarlanabilir olarak nitelendirilmiştir. Gıda matrikslerindeki HCH kalıntılarının analizi için bu yöntemin güvenilirliğini ve etkinliğini doğrulayan gerçek örneklerin rutin analizinde tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir [67].

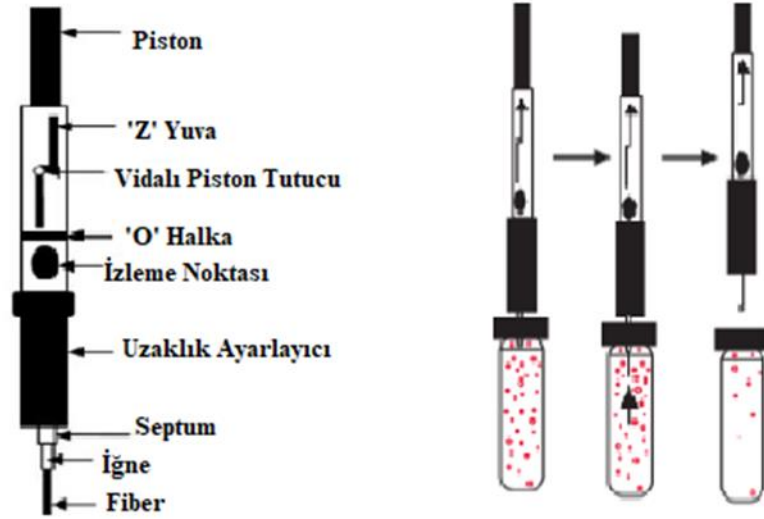
#### **1.4.4. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME)**

Geleneksel örnek hazırlama metotlarına alternatif olarak SPME metodu geliştirilmiştir. Katı fazlı mikroekstraksiyon yöntemi örnek hazırlama, konsantre etme, ekstrakte etme gibi aşamaları tek basamağa indirgemeyi başaran bir yöntemdir. Bunların yanı sıra hızlı, basit, ekonomik bir ekstraksiyon yöntemidir. Kullanım kolaylığı sağlayarak karmaşık bir aparat kullanımını da gerektirmemektedir.

SPME'nin performansını ekstraksiyon koşulları, fiber tipi, ekstraksiyon yöntemi ve desorpsiyon koşulları etkilemektedir [68].

SPME örneği maddeden zenginleştirme, matriksten ayırma ve tayin etme gibi özelliklere sahip ve bunları tek basamakta gerçekleştiren bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem son yıllarda geliştirilerek gıda, çevre gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. SPME'nin hızlı ve basit bir yöntem olması avantajı iken, pahalı olması, düşük tekrarlanabilirliği, kullanım miktarındaki sınırlamalar ve seçiciliğinin düşük olması dezavantajları olarak sıralanabilir [69].

SPME tekniği 1990 yılında geliştirilmiş ve 1993 yılında ise ticari olarak üretilmeye başlanarak piyasaya sunulmuştur [70]. Bu teknikte kullanılan enjektör dolgu materyali fiber ile kaplıdır ve fiber üzerinde de polar ya da apolar ince fiber kaplaması vardır.



Şekil 1.7. SPME Sistemi [71]

Her ülkenin gıdalardaki pestisit analizlerinde maksimum kalıntı düzeyleri için belirlediği farklı limitler vardır. Karşılaştırmalı olarak yapılan bu analizlerde her pestisit türünün detaylı olarak incelenmediği görülmüştür. SPME tekniğinin gelişmesiyle matriks etkisinden dolayı pestisitlerin kararsızlığı en aza indirilerek daha temiz özler elde etmek mümkündür [72].

Ayrıca SPME tekniği otomatik veya yarı otomatik ekstraksiyon teknikleri arasında çevresel numunelerde pestisitlerin belirlenmesi için kullanılan en yaygın metodolojilerden biridir [73].

Wen-kui Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pazarlardan pirinç ve elma örnekleri satın alınmıştır. Pirinç numuneleri ince toz haline getirilmiş ve bunun 1.0 g'ı 50 mL % 50 metanol çözeltisi ile karıştırılmıştır. Ardından 35 °C'de 20 dk. Sonikasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve ekstraktlar toplanmıştır. PH'ı 7.6'ya ayarlanarak SPME-HPLC ile analizi sağlanmıştır. Elma örneği ise takip edilen prosedür pirinç numunesi ile aynıdır. Aynı işlemler beş parti pirinç ve elma için tekrarlanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birlikte, pirinç ve elma örneklerinden asetamiprid (As), dimetipin (Dim) ve amitrole (Ami) eşzamanlı belirleme için bir SPME-HPLC yöntemi kurulmuştur. Kritik çıkarma parametreleri optimize edilerek analitik yöntemin 0.99'un üzerindeki doğrusal katsayılarla iyi doğrusallığa sahip olduğu kanıtlanmıştır. RSD % 4.9'dan az, geri kazanım % 79.3 ile % 106.8 arasında, düşük algılama sınırı (LOD) ise

As, Dim ve Ami için 0.86 ile 1.38 ng g<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Araştırılan çalışma ile istenilen doğrusalılık, doğruluk, hassasiyet, LOD'ler ve LOQ'ların yanı sıra kolaylık ve yüksek verimlilik elde edilmiştir [74].

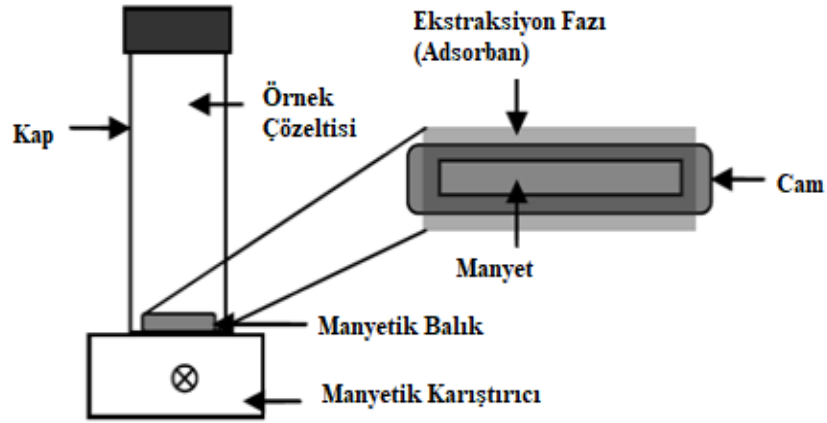
Adalberto Menezes Filho ve arkadaşlarının mango üzerinde yaptığı bir çalışmada meyvelerin yaklaşık 500 g'ı öğütülmüş ve bir gıda işlemcisinde homojenize edilmiştir. Daha sonra cam şişelere aktarılmıştır ve kullanılıncaya kadar -18°C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon için bir numune örneği (3 g) 20 mL'lik bir kaptan tartılarak üzerine 50 mikrolitre çalışma standardı eklenmiş ve dinlenmeye bırakılmıştır. Ardından 10 mL 20:80 (v/v) izopropil, %5 NaCl ve pH değeri 3 olan HCl ve su karışımı ilave edilmiştir. Bu karışım 1000 rpm'de 10 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen numune 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst tabaka 10 mL'lik bir ölçülü balon ve hacim alkol:su karışımı ile tamamlandı. Burada kullanılan SPME elyafı (85 µm poliakrilat) olarak belirlenmiştir. Elde edilen çözelti 280 °C'de 5 dakika desorpsiyon için GC enjektörüne yerleştirilmiştir. GC-MS ile tayin edilen analiz sonuçlarına göre geliştirilen yöntemin, mangolardaki pestisit kalıntılarının nitel ve nicel olarak belirlenmesine ve büyük olasılıkla diğer meyve ve gıda matrikslerine de uygulanabileceği belirtilmektedir. Yöntem seçici ve hassastır ve örneklerde 14 pestisit belirlenmesine izin verilmiştir. Bunlar klofentezin, karbofuran, fenthion, tiabendazol, bifenthrin, imazalil, difenoconazol, permethrin, prochloraz, pyraclostrobin, azoxystrobin, parathion-metil, malathion ve diazinon'dir. Sonuçlar yasal olarak kabul edilen MRL'nin altında çıkmıştır [75].

#### **1.4.5. Manyetik Karıştırma Çubuğu ile Ekstraksiyon (SBSE)**

Karıştırma çubuğu sorptif ekstraksiyon çok çeşitli ve polar olmayan çözünenlerin örnekleme ve zenginleştirilmesi için kullanılan ve solvent gerektirmeyen tekniklerden birisidir. Son yıllarda uygulanan popüler bir örnek hazırlama yöntemidir. Tipik bir SBSE karıştırma çubuğu ve birleştirilmiş mıknatıs çekirdekli bir cam üzerine kaplanmış polidimetilsiloksan (PDMS) filminden oluşur. Numune alma, doğrudan daldırma veya karıştırma çubuğunu numunenin tepe boşluğuna uygulama yoluyla gerçekleşir [76]. Teknik sorptif ekstraksiyon esasına dayanır. Bir analitin ekstraksiyonu için karıştırma çubuğunun üzerine fazla miktarda ekstraksiyon fazı

uygulanması gerekir. Kullanılan ekstraksiyon fazı için genellikle polidimetilsiloksan (PDMS) tercih edilir [77].

PDMS tercih edilmesinin sebebi ise düşük cam geçiş sıcaklığı, uygun koşullandırmadan sonra yüksek sıcaklıklarda çok düşük kanama profili, çok iyi yayılma ve geçirgenlik gibi özellikleri sıralanabilir [78]. Ortaya çıkışından bu yana SBSE gıda, çevre ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmıştır. SBSE için tercih edilen kaplamanın polidimetilsiloksan (PDMS) olması ticari olarak bir sınırlama meydana getirmiştir. Bu sebeple SBSE kullanımı apolar ve orta derecede polar bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılır [79].



Şekil 1.8. SBSE'nin basit şematik gösterimi [69]

SBSE'nin apolar ve orta derecede polar bileşiklerin ekstraksiyonunda tercih edilmesinin sebebi ise yüksek bir ekstraksiyon etkinliğidir. Özellikle son yıllarda farmasötik ürünlerde, gıdalarda, biyolojik numunelerde, doğal bileşiklerin, organik bileşiklerin, kirleticilerin ekstraksiyonunda çok sayıda yeni analitik SBSE yöntemleri geliştirilmiştir [80]. Pestisitler, yaygın kullanımları, toksisiteleri ve biyolojik birikimleri nedeniyle çevreyi kirleten toksik maddeler arasında yer almaktadır. Özellikle insanların ihtiyaç duyduğu meyve ve sebzelerde tehlikeli olabilirler. Bu nedenle, mevcut analitik yöntemleri kullanarak meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarını izlemek çok önemlidir. Bu sebeple SBSE tekniği klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre daha iyi bir analiz sunma imkânı verir [81].

Pat sandra ve arkadaşları SBSE yöntemiyle sebze, meyve ve bebek maması üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmaya göre yaklaşık 15 gr sebze, meyve veya bebek maması örneği 100 mL'lik bir şişe içerisine doğru bir şekilde tartılarak üzerine 30 mL metanol eklenmiştir. Karışım 5 dakika boyunca bir mikser kullanılarak homojenize edilmiş ve şişe daha sonra 15 dakika boyunca ultrasonik bir banyoya yerleştirilmiştir. Karışımın bir kısmı (yaklaşık 10 mL) kapalı 20 mL'lik bir şişeye yerleştirilmiş ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. 0.5 mm PDMS tabakası (24 µL) ile kaplanmış 10 mm uzunluğunda bir SBSE karıştırma çubuğu yardımıyla karışım 1000 rpm'de 60 dakika karıştırıldı. Daha sonra karıştırma çubuğu cımbızla çıkarılmış damıtılmış suya kısa bir süre daldırılarak damlacıkları çıkarmak için tüy bırakmayan dokuya yerleştirilmiştir. Elde edilen numunelerin analizi GC-MS ile yapılmıştır. 10 bebek maması örneği analiz edilmiş ve 4 tanesinde piperonil butoksit, pirimethanil (iki örnek) ve bromopropylate olmak üzere 0.5-2 ppb arasında pestisit izleri tespit edilmiştir. Bu yöntemin sebze, tavuk ve pirinçte de etkili sonuçlar vereceği tespit edilmiştir. GC-MS ile yapılan bu analizde SBSE tekniğinin 350 pestisit belirlenmesinde ppb altı seviyelerine kadar inebilmesi sebebiyle çok yönlü analiz sağladığı ve uygun olduğu belirlenmiştir [82].

Blasco ve arkadaşlarının portakallar üzerinde yaptığı bir çalışmada örneğin 5 g'lık bir kısmı tartılarak 25 mL'lik bir Erlenmeyer şişesine yerleştirilmiş ve 5 mL metanol ile 5 mL su eklenerek 15 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım 40 µm filtreden geçirilmiştir. Filtre keki 5 mL su ile yıkanmıştır. Portakal ekstresinin filtratı (15 mL) 25 mL'lik bir cam kabın içine yerleştirilmiş ve 900 rpm'de 2 saat boyunca karıştırma çubuğu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra karıştırma çubuğu sulu numunedan cımbızla çıkarılarak numune matriksinin fazlalığını gidermek için temiz suya 1 dakika daldırılmıştır. Daha sonra karıştırma çubuğu 500 µl asetonitril ile doldurulmuş 2 mL'lik şişeye yerleştirilmiştir. Pestisitlerin desorpsiyonu 10 dakika boyunca ultrasonik bir cihazla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 200 gr portakal üzerinde yapılan bir çalışmada ısırgantanol, karbendazim, fenthion, flusilazol, hexythiazox, imidacloprid, methidathion, methiocarb, pyriproxyfen ve triklorfon tayini için sıvı kromatografik-kütle spektrometrik yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma ayrıca karbendazim ve hexythiazox'un seçilen bileşiklerin en yaygın olan pestisit olduğunu göstermiştir. Portakallarda bulunan pestisit konsantrasyonları AB veya İspanyol mevzuatı tarafından belirlenen sınırlardan daha düşük çıkmıştır. Bu da İspanyol portakallarının insan tüketimi için iyi kalitesini göstermiştir. SBSE,

portakallardan pestisitlerin çıkarılması için alternatif bir yöntem olarak belirtilmiştir. Avantajları basit kullanım, ihtiyaç duyulan küçük çözücü, numune miktarları ve yüksek seçiciliğidir. Elde edilen sonuçlara göre gelecekte yaygın olarak uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine hızlı ve hassas bir alternatif olabileceği için umut verici bir teknik olduğu belirtilmiştir [83].

#### **1.4.6. Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (LPME)**

Sıvı fazlı mikroekstraksiyonun temeli klasik sıvı sıvı ekstraksiyona dayanır. Fakat bundan en önemli farkı ekstraksiyon sırasında kullanılan sıvının mikrolitre düzeylere inmesidir. Bu sayede çözücü kaybı engellendiği için buharlaştırma aşamasında herhangi bir işleme gerek kalmaz. Sıvı fazlı mikroekstraksiyon işlemi maddeler çoğunlukla sulu bir faz içerisinde yer alırlar. Burada su ile karışmayan alıcı faz ise genellikle organik çözücülerdir [69].

Sıvı fazlı mikroekstraksiyon (LPME) çevre, klinik, gıda ve endüstriyel laboratuvarlarda giderek önemli bir hale gelmiştir. Geleneksel saflaştırma ve ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla ciddi ölçüde azaltılmış solvent ihtiyacına sahiptir [84]. Özellikle metallerde LPME çevresel analizlerde önemli bir numune hazırlama tekniğidir. İyonik sıvıların da LPME ile ekstraksiyona dahil edilmesi ile oda sıcaklığındaki organik tuzların farklı özelliklerinden dolayı ilgi odağı olmuştur [85].

Sıvı fazlı mikroekstraksiyon (LPME), sıvı-sıvı ekstraksiyonuna benzer ekstraksiyon prensibine sahip minyatür bir ekstraksiyon tekniğidir. LPME'de ekstraksiyon ve zenginleştirme tek adımda gerçekleştirilebilir. Temel LPME kombinasyonu özütlemenin tek bir damla çözücü içerdiği bir kombinasyonudur. Gözenekli membran destekli içi boş fiber LPME'nin (HF-LPME) kullanımını gerektiren başka bir LPME modudur ve karmaşık çevresel matrislerin doğrudan ekstraksiyonu için uygundur. İyon çifti ekstraksiyonu, kompleks oluşturma, kimyasal türevlendirme, faz transfer katalizi ve nanoparçacık destekli kimyasal reaksiyonlar LPME' nin duyarlılığını artıran özelliklerden birkaçıdır [86].

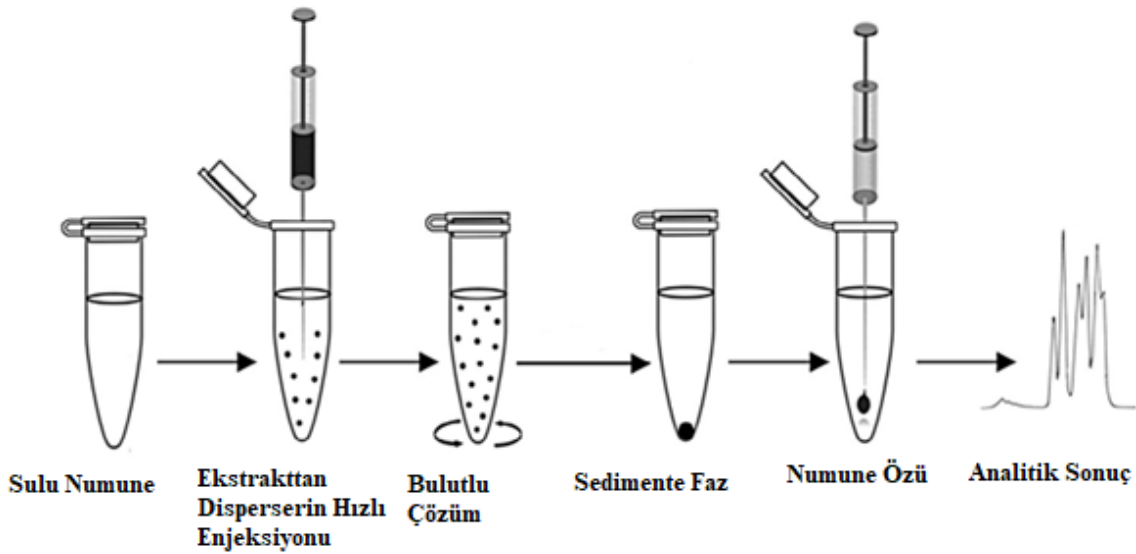
Teknolojideki ilerlemeler son derece verimli, güvenilir, sağlam ve analitik araçların geliştirilmesine yol açmıştır ve son teknolojik cihazlar dahi numune hazırlama işlemi özenle yapılmadığı takdirde yetersiz kalmaktadır. Sıvı sıvı ekstraksiyon yaygın bir

numune hazırlama tekniğiydi. Fakat uzun ekstraksiyon periyotları, düşük verim gibi sebeplerle yerini büyük ölçüde LPME tekniğine bırakmıştır [87].

#### 1.4.6.1. Dağıtıcı Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyon (DLLME)

DLLME tekniği organik ekstraksiyon çözücüsünün sulu numunelerde mikrolitre düzeyinde uygulanmasıdır. Son yıllarda ortaya çıkan bir numune hazırlama tekniğidir [88]. Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon düşük solvent, çalışma hızı ve basitliği gibi nedenlerle çevre dostu bir numune hazırlama tekniğidir. Bu nedenlerle son yıllarda bilim insanları tarafından ilgi görüp popüler bir numune hazırlama tekniği haline gelmiştir [89].

Ekstraksiyon çözücüsünün suda çözünmeyen küçük bir miktarının numune içinde dağıldığı dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon tekniği uygulama miktarı açısından en başarılı tekniklerden birisidir. Bu yöntem içerisindeki gelişmeler verimlilik ve sürdürülebilirlik açısından son derece önemlidir [90].



Şekil 1.9. DLLME Sistemi [91]

DLLME hem geleneksel hemde mikro düzeyde uygulanan numune hazırlama tekniklerinin bir kombinasyonudur [92].

Özellikle pestisit analizleri ise DLLME'nin başlıca uygulama alanlarındandır [47].

Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon numune hazırlamada en önemli tekniklerden

birisidir. Özetleyicide kullanılan organik damlanın numuneye enjeksiyonu gerçekleştirilmeden önce dağıtıcı çözücü ile karıştırılır. Bu çalkalama işlemi manuel ya da otomatik olabilir. Çalkalama işleminden sonra bulanıklığı gidermek için santrifüj işlemi uygulanır. Organik faz bu sayede ayrılarak analitik cihaza aktarılır. DDLME’de kullanılan dispersiyon işlemi numune ve özütleyici arasındaki temas yüzeyini artırır. Bu durum ise verimi ve özütleme kinetiğini artırır [93].

Farajzadeh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kayısı, üzüm, şeftali, armut, nar, ekşi kiraz ve portakal içeren yedi paketlenmiş meyve suyu yerel süpermarketlerden (Tebriz, İran) satın alınmıştır. Bu numuneler 5 dakika santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlar 1:1 (v/v) oranında deiyonize su ile seyreltilmiştir. Analitlerle sabitlenmiş 10 mL deiyonize su (200 ng /mL) veya seyreltilmiş meyve suyu 5 mL cam test tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra, çözeltiliye 50 mg sorbent eklenmiş ve sorbentin çözeltiliye dağılımını tamamlamak için karışım 3 dakika boyunca çalkalanmıştır. Bu adımda, analitler sorbent üzerine adsorbe edilmiştir. Son olarak tortulu fazın 1 µL'si (10 ± 0.5 µL) alınarak GC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, penkonazolün (32 ± 1) ng mL<sup>-1</sup> konsantrasyonunda belirlendiği üzüm suyu hariç, tüm örneklerin analitlerden arındırılmış olduğunu göstermiştir. Her deney üç taraflı olarak tekrarlanmıştır. Üzüm suyunda bulunan penkonazol konsantrasyonunun önerilen Codex maksimum kalıntı sınırının (0.4 mg kg<sup>-1</sup>) altında olduğu belirtilmelidir [94].

Abolghasem Jouyban ve arkadaşları tarafından inek sütü üzerinde yapılan bir çalışmada PET şişelerde paketlenmiş altı süt örneği yerel satıcılardan (Tebriz, İran) satın alınmıştır. İki taze örnek doğrudan yerel bir süt şirketinden (Sarab, Doğu Azerbayjan, İran) elde edilmiştir. Bu numuneler analizlerinden önce 4 °C'de bir buzdolabında muhafaza edilmiştir. Mevcut yöntemde 5 mL numune veya analiz içermeyen süt 0.5 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonda analitlerle sabitlenerek bir cam test tüpüne aktarılmış ve içine 0.5 g NaCl (% 10, w/v) eklenerek çözülmüştür. Daha sonra karışıma 1.04 g ChCl ve 0.94 g EG eklenmiş ve 1 dakika boyunca çalkalanmıştır. Tüp, 7 dakika boyunca termostatlı (50 °C'de ayarlanmış) ultrasonik bir banyoya yerleştirilmiştir. Daha sonra, karışım 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve ayrılmış süpernatant fazın tamamı (yaklaşık 1 mL) çıkarılmıştır. Son olarak, elde edilen çözeltinin 1 µL'si GC mikro şırınga kullanılarak nicel analiz için GC-FID sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, seçilen analitlerle ilgili tutma sürelerinde pik olmadığını ve seçilen örneklerin analitlerden arındırılmış olduğunu göstermiştir [95]. Seçilen numunelerin yöntemin verimliliği üzerindeki matriks etkilerini test etmek için, 50 ve



100 ng mL<sup>-1</sup> olmak üzere iki konsantrasyonda standart ekleme yöntemi gerçekleştirildi. Sonuçlara göre, gerçek örneklerin matrislerinin geliştirilen yöntemin performansı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir

#### **1.4.6.2. Asılı (Tek) Damla Mikroekstraksiyon (SDME)**

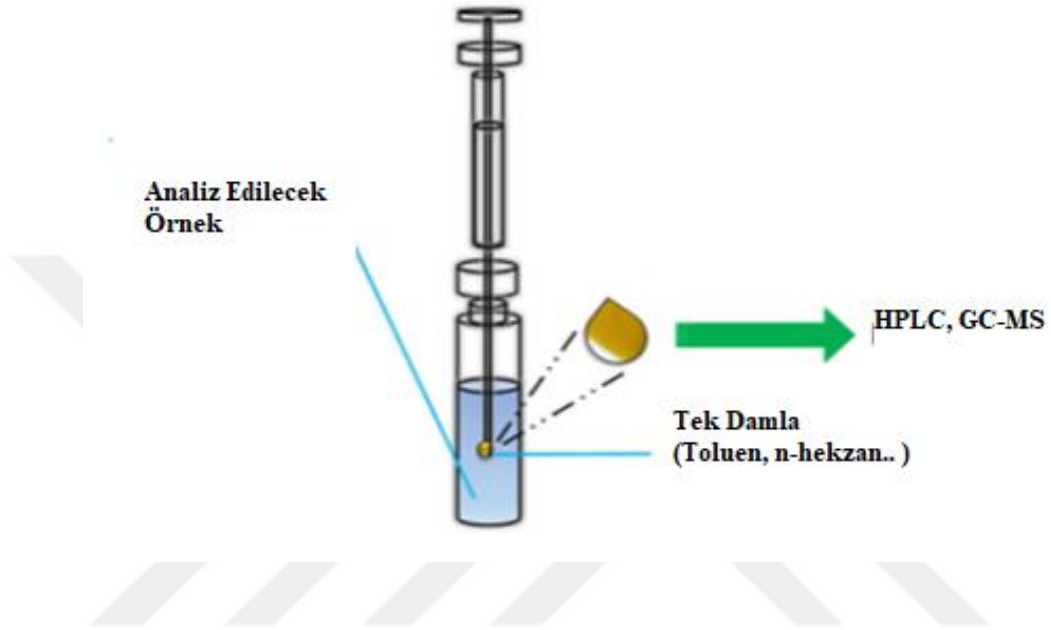
Dasgupta ve ekibi tarafından geliştirilen bu yöntem karmaşık bir numune matrisinden bazı analitlerin izole edilmesi ve zenginleştirilmesi için geliştirilen basit bir numune hazırlama yöntemi olarak kabul edilen SDME organik moleküllerin analizinde, gıda, çevre ve endüstriyel alanlarda kendine çalışma imkânı bulmuştur [96]. SDME sulu numunelerin ön hazırlık aşamalarına yönelik örnek hazırlama tekniğidir. SDME tekniğinin en önemli avantajı toksik organik çözücülerin kullanımını en aza indirerek ekstraksiyon sırasında tehlikeleri minimum düzeyde tutabilmesidir. Bu nedenle SDME teknikleri çevre dostu olup ekonomik olarak da daha uygun maliyete sahiptir [97].

Daha çok sulu ve gazlı numunelerdeki analitlerin konsantrasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılır. Mikrolitre düzeyinde ekstraksiyon çözücüsünün kullanımını içerdiğinden önemli analitik yöntemlerden biridir [98].

Tek damla mikroekstraksiyon yöntemi ucuz, kullanımını kolay, güvenilir ve neredeyse solvent kullanılmadan gerçekleştirilen bir örnek hazırlama tekniği olduğundan bilim insanları tarafından çokça tercih edilmektedir. SDME tekniğinde konsantrasyon ve özütleme minimum sayıda birleştirilerek analitik sisteme aktarılır ve bu şekilde ekstraksiyon gerçekleşmiş olur [100].

Norma S. Pano-Farias ve arkadaşları mango üzerinde SDME tekniği kullanarak araştırma yapmışlardır. Meksika'nın Colima kentinde bulunan bir çiftlikten elde edilen pestisit içermeyen mango meyveleri kullanılmıştır. Mango, matris karmaşıklığı, ekonomik önemi ve Meksika'daki üretimi nedeniyle seçilmiştir. Yıkanmış 0.6 kg mango soyulmuş ve bir mutfak robotunda homojenize edilmiştir. Koyu cam şişelere aktarılarak -20 ° C'de depolanmıştır. 3 g homojenize mango örneği 50 mL santrifüj tüpüne alınıp 9 mL %10 sulu ACN ile eklenerek 1 dakika boyunca manuel olarak karıştırılmıştır. Örnek 15 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulduktan sonra 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak, bu çözelti SDME tekniğinde kullanılmak üzere 20 mL'lik şişeye aktarılmıştır. SDME işleminden önce, kullanılan 10 µL mikro şırınga, ekstraksiyon çözücüsü (toluen) ile beş kez yıkanmıştır. Daha sonra, mikro şırıngaya 2

$\mu\text{L}$  toluen çekilerek şişe kapağının septumundan 10 mL numuneye iğne daldırma işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminden sonra, mikro damla mikro şırıngaya geri çekilerek GC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre RSD %20'den düşük ve geri kazanım % 70-120 aralığında bulunmuştur [101].



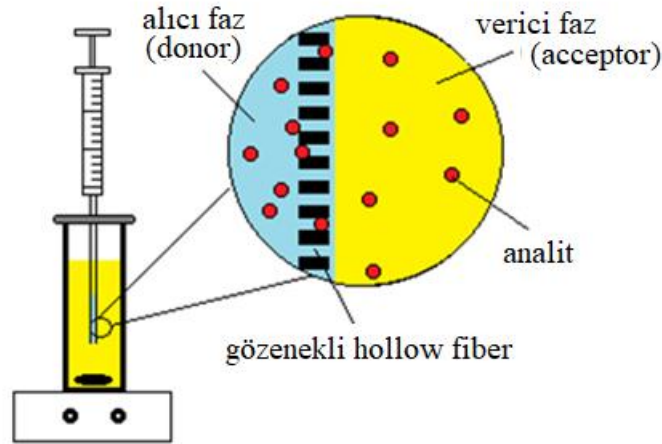
**Şekil 1.10.** SDME Sistemi [99]

Ercheng Zhao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 5 ml portakal suyu numunesi su ile seyreltilerek SDME işleminden önce santrifüjlenmiştir. Her ekstraksiyondan önce mikro şırınga iğnedeki kabarcıkları ortadan kaldırmak için çözücü ile en az 10 kez yıkanmıştır. Numune çözeltisi, 15 mm×4 mm karıştırma çubuğu ile manyetik bir karıştırıcı ile çalkalanmıştır. Ekstraksiyondan önce mikro şırıngaya belirli bir miktarda organik çözücü çekilmiştir. Sabitlenen mikro şırınga daha sonra numune şişesinin septumuna (10 ml kapasite) yerleştirilerek numuneye enjekte edilmiştir. Ekstraksiyon tamamlandığında, damla, mikro şırıngaya geri çekilmiş ve doğrudan GC'ye enjekte edilmiştir. Optimize edilmiş SDME koşullarında portakal sularındaki tüm hedef analitler için 10-500  $\mu\text{g L}^{-1}$  derişim aralığında bağıl geri kazanımların % 70'in üzerinde çıkması uygulanabilir rutin bir analitik yöntem olabileceği vurgulanmıştır [102].

### 1.4.6.3. Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME)

SDME yönteminin farklı bir versiyonu olarak kabul edilen İçi boş fiber sıvı faz mikro ekstraksiyonu (HF-LPME), 1999 yılında Pedersen-Bjergaard ve Rasmussen tarafından geliştirildi. HF-LPME'de, mikro damlayı kaybetme riskini azaltmak için üzerine bir özütleyici mikro damlanın hareketsiz hale getirildiği bir destek olarak gözenekli bir fiber kullanılır. İçi boş elyaf aynı zamanda parçacıkların mikro damlaya ulaşmasını önleyen bir koruyucu görevi görür ve böylece temiz özler meydana getirilmesi sağlanır. Hareketsizleştirilmiş sıvı, alıcı faz/çözelti olarak adlandırılır ve numune çözeltisi, donör faz/çözelti olarak adlandırılır [103].

HF-LPME'de hem numune hem de ekstraksiyon aşaması sabittir. Membran (HF) yalnızca tek bir ekstraksiyon için kullanılır ve numune işleme için pompalar gibi herhangi bir analitik cihaza gerek duyulmaz. HF-LPME ucuz membranlar kullanılır, ancak ekstraksiyon adımının otomasyonu zordur [104].



Şekil 1.11. HF-LPME Sistemi

HF-LPME yöntemleri, kullanılan sıvı fazların sayısına göre iki ana sınıfa ayrılabilir. Bunlar üç fazlı HF-LPME ve iki fazlı HF-LPME yöntemleridir. Üç fazlı yöntem basitçe, hareketsiz organik çözücünün veya destekli sıvı zarın (SLM) iki sulu numune çözeltisi fazına ve içi boş fiberin içinde bulunan sulu alıcı faza maruz bırakıldığı sulu-organik-sulu bir sistem olarak kabul edilir. Buna karşılık, iki fazlı HF-

LPME'de, alıcı faz çözültüsü de SLM'nin organik çözücüsü ile aynıdır ve her ikisi de su ile karışmaz [105].

Hem iki hem de üç modda HF-LPME, karmaşık biyolojik ve çevresel numunelerden temiz özler elde ederek en iyi şekilde ekstraksiyonu sağlamış olur [106].

Xiaojin Sun ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sazan, tilapia, yılan balığı ve turbot yerel süpermarketlerden satın alınmıştır. Yenilebilir dokular homojenize edilerek  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuştur. Sekiz gram balık kası 5 g aktif susuz sodyum sülfat ile bir santrifüj tüpünde tartılmıştır. Örnek daha sonra 25 dakika boyunca 15 mL aseton ultrasonik banyoya alınmış ve üst sıvı faz 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjleme ile ayrılmıştır. Daha sonra, numuneye 15 mL aseton eklenerek ultrasonikasyon ve ayırma adımları tekrarlanmıştır. Fiber aseton içinde bekletilerek havada kurutulmuştur. Daha sonra 2.7 cm uzunluğunda kesilmiştir. Polipropilen (PP) hollow fiber (200  $\mu\text{m}$  duvar kalınlığı, 1.2 mm iç çap, 0.2  $\mu\text{m}$  gözenek çapı) ile HF-LPME tekniği ile ekstraksiyonu gerçekleştirilen numunelerin analiz sonuçlarına göre HF-LPME yönteminin uygulanabilirliği tilapia, yılan balığı ve turbot dahil olmak üzere farklı balık türleri analiz ederek değerlendirilmiştir. Sekiz OPP için elde edilen geri kazanımlar üç balık türünde % 71.8 ve % 95.2 arasında değişmekte olduğu gözlenmiştir [107].

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HF-LPME yaklaşımı, salatalık örneklerindeki pestisit kalıntılarını belirlemek için kullanılmıştır. 0.80 mm iç çaplı, 0.16  $\mu\text{m}$  gözenek çaplı PVDF hollow fiber kullanılmıştır. Daha önce homojenize edilmiş salatalık örneği ( $2.0 \pm 0.2\text{ g}$ ) 10 mL'lik bir şişede tartılarak 5 mL saf su eklenmiştir. Şişe 1 dakika boyunca kuvvetlice çalkalanmış ve ultrasonik olarak 5 dakika karıştırılmıştır. Ekstrakt 3 dakika boyunca 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant bir pipetle alınarak 10 mL şişeye aktarılmıştır. HF-LPME tekniği ile ekstraksiyonu yapılan numuneler UHPLC-MS /MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre LOD'ler 0.01-0.31  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ve LOQ'lar 0.05-1.00  $\mu\text{g kg}^{-1}$  arasında değişmektedir [108].

#### **1.4.6.4. Yüzen Katı Organik Damla Mikroekstraksiyon (SFODME)**

SFODME yöntemi Khalili Zanjani tarafından GC-FID ile endokrin bozucu polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) yoğunlaştırmak için geliştirilmiştir. SFODME yönteminin amacı özütleyicilerle sulu çözültülerin algılama sistemlerine taşınmasını

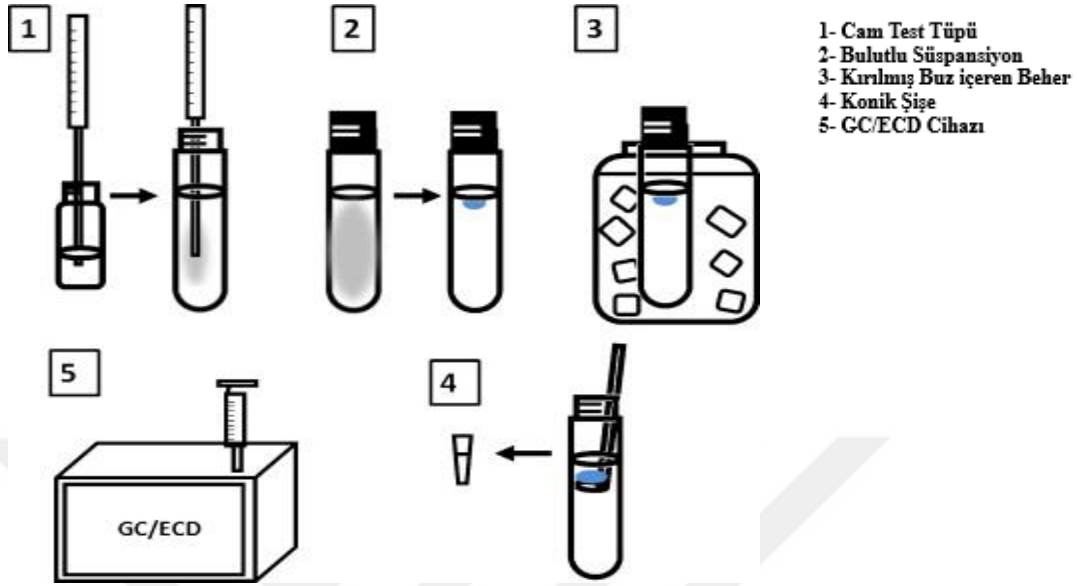
ortadan kaldırmaktır. Katılaştırılmış yüzen organik damla mikro özütleme (SFODME), bazı araştırmacılar tarafından DLLME'nin bir benzeri olarak kabul edilir, ancak organik çözücü çözeltilerden ayırma modu kendine özgüdür ve bu nedenle ayrı bir LPME yöntemi olarak ele alınır. SFODME, yüzen organik damlacıkların (LPME-SFOD) katılmasına dayalı sıvı fazlı mikroekstraksiyon tekniğidir [109].

SFODME yöntemi pestisitlere uygulanırken numune çözeltisinin bir kısmı uygun bir cam kaba konur. Genellikle bir şırınga kullanılarak sulu numuneye hızlı enjeksiyon yoluyla 1 µL hacimde uygun bir ekstraksiyon çözücüsü eklenir. Ekstraksiyon çözücüsü oda sıcaklığına yakın, 10–30°C aralığında bir erime noktasına sahip olmalıdır. Çözelti daha sonra önceden belirlenmiş bir süre boyunca çalkalanır (genellikle manyetik karıştırma ile); bu adımda analitler organik faza ekstrakte edilir. Santrifüjden sonra, cam kap bir buzlu su banyosuna daldırılır ve yüzen organik çözücü kısa bir süre sonra katılır. Daha sonra, katılan çözücü küçük bir spatula kullanılarak konik bir şişeye aktarılır, oda sıcaklığında hızla eritilir ve uygun adımlar gerçekleştirildikten sonra enjekte edilir. Manyetik karıştırmanın yanı sıra manuel olarak da çalkalanabilir [110].

SFODME, basitlik, kısa ekstraksiyon süresi, minimum organik çözücü tüketimi ve yüksek zenginleştirme faktörü elde etme gibi avantajlara sahiptir. Bu yöntemde kolay bozulan ve temizlenmesi zor olan konik tabanlı cam tüplerin kullanılmasına gerek yoktur. Yüzdürülen özütleyici katılaştırılır ve analiz için kolayca toplanır. Geleneksel DLLME'den farklı olarak, bulutlu bir çözelti üzerinde DLLME ve SFODME kombinasyonu ve ardından ekstraksiyon çözücünün katılması, organik dağıtıcı çözücüye ihtiyaç duymaz. DLLME-SFO, çok daha az miktarda ekstraksiyon çözücüsüne ihtiyaç duyar ve bu nedenle DLLME'den daha az toksiktir [112].

Li ve arkadaşları tarafından bal ve su örneklerinde pestisit analizi yapılmıştır. 1.5 g bal numunesi ile 10.5 g deiyonize su homojen bir şekilde karıştırılmış ve 0.22 mm selüloz membrandan süzülmüştür. Hazırlanan örnekler 4 °C sıcaklıkta ve karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. Su örneklerinde ise göl suyu kullanılmış ve bardağa alınan örnekler 4 °C sıcaklıkta ve karanlık bir ortamda muhafaza edilmişlerdir. Su örnekleri kullanılmadan önce 0.22 mm kalınlıktaki bir zardan geçirilmiştir. Kromatografik analiz HPLC siteminde gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre su numunelerindeki RSD değerleri % 0.9 ve

% 6.7 arasında değişmektedir. Bal numunelerinde RSD değerleri % 9.2 ve % 0.2 aralığında değişmektedir [113].



Şekil 1.12. SFODME Prosedürü [111]

Yang ve arkadaşları meyve suyu örneklerinde analiz yapmışlardır. Dört gerçek meyve suyu örneği kullanılmıştır. Meyve suyu örnekleri 4 °C'de bir buzdolabında saklanmıştır. 50 mL'lik taze meyve suyu 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Ekstrakt işlenmeden önce 0.22 µm membran ile filtrelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre dört meyve suyuna pH 7 iken aynı örnek ortam oluşturulmuştur. Bu yöntemle örneklerde hedef pestisitler tespit edilememiştir. Ayrıca, RSD'lerin % 0.2 ile % 7.3 aralığında olması, bu yöntemin yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermiştir [114].

#### 1.4.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ölçümleri kolaylaştırmadaki avantajları nedeniyle gıda ve çevre örneklerinden bir dizi organik kirleticinin hızlı bir şekilde ekstraksiyonu için etkili bir yöntem olduğundan son dönemlerde büyük ilgi görmüştür. Klasik tekniklere göre önemli ölçüde daha düşük ekstraksiyon süresine ve çözücü tüketimine sahiptir. Genel olarak, MAE cihazları, kontrollü basınç ve sıcaklık altında

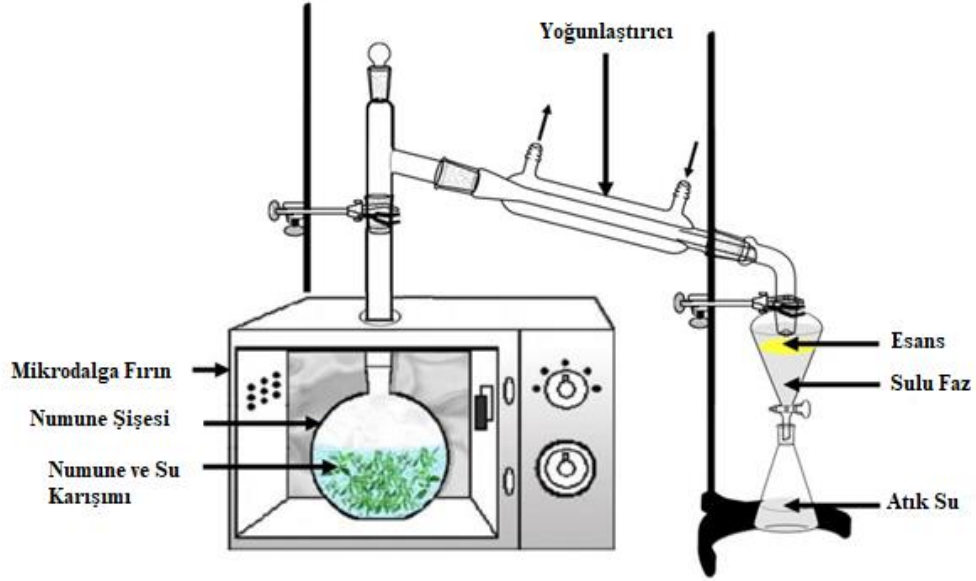
kapalı bir ekstraksiyon kabı veya atmosfer basıncında odaklanmış bir mikrodalga fırın içerir [115].

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ekstraksiyon süresinin azaltılması, çözücü ve enerji tüketiminin yanı sıra aynı anda birden fazla ekstraksiyon gerçekleştirme olasılığı gibi birçok avantaj sunan bir örnek hazırlama tekniğidir. Numune hazırlamada mikrodalga enerjisinin kullanımı ilk olarak 1970'lerin başında elementel analiz için basınçlı koşullar altında numune analizi için ortaya çıktı. MAE'nin gelişimi daha sonra gerçekleşti ve organik bileşiklerin ekstraksiyonu için mikrodalga enerjisinin ilk uygulaması Ganzler ve arkadaşları tarafından geliştirildi. 1986 yılında yerli bir ekipman olarak Mikrodalga kullanıldı ve doğal bir ürünün ekstraksiyonu ile ilgili ilk patent 1991 yılında Pare tarafından alınmıştır. Bu teknoloji 90'lı yıllarda özellikle kirleticilerin ve doğal ürünlerin ekstraksiyonu için laboratuvarlarda MAE cihazlarının tanıtılmasıyla oldukça ilgi gördü [116].

Ekstraksiyon sırasında mikrodalgaların mantığı, iki çakışan mekanizma yoluyla elektrik alanı ile enerji transferinde yatmaktadır. İlk olarak, dipol rotasyonu, dipollerin polar bileşenlerle etkileşimi ve dipollerin uygulanan alanla yeniden düzenlenmesine bağlı olarak meydana gelir, bu da ısı üreten zorlanmış moleküler hareketlere neden olur. İkincisi, iyonik iletim, elektromanyetik radyasyon sırasında çözücü içindeki yüklü iyonların hareketiyle uygulanarak çözelti içinde bir direnç oluşturur ve sürtünmeye neden olur. Sonuç olarak ısı açığa çıkar. Bununla birlikte, gıda matriksinin mikrodalga ışımasını emme ve ısı üretme yeteneği, dielektrik kaybına bağlıdır [117].

MAE performansını etkileyen ana parametreler şunlardır: çözücünün ve matriksin yapısı, çözücü hacmi, mikrodalga gücü ve sıcaklık [119].

Mikrodalga destekli ekstraksiyonun atık oluşumunu engellemesi, kirliliği azaltması, çevre dostu olması, ekstraksiyon süresini kısaltması, güvenli ve verimli olması başlıca avantajları arasındadır [111].



Şekil 1.13. MAE Sistemi [118]

Gouri Satpathy ve arkadaşlarının 35 farklı meyve ve sebze örneklerinde yaptığı bir çalışmada her taze meyve ve sebzeden bir veya iki kilogram blender kullanılarak 30 dakika karıştırılmıştır. Örnekler 1000 rpm'de 30 dk. kadar homojenize edilmiş ve derin dondurucuda  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Analiz için 10 g homojen karışım alt numune bir ekstraksiyon kabına tartılarak meyve ve sebzelerde  $0.025\text{ mg kg}^{-1}$ ,  $0.05\text{ mg kg}^{-1}$  ve  $0.1\text{ mg kg}^{-1}$  konsantrasyonları vermek için standart karışık pestisit çözeltisi ile sabitlenmiştir. 15 ml aseton karışımı eklenerek 5 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulanmıştır. MAE tekniği kullanılan numunelerden elde edilen sonuçlara göre meyve ve sebze numuneleri yüksek nem ( $\%>80$ ) sahip olduğundan, yüksek dielektrik kayba sahiptir ve mikrodalga emme yeteneğinin ekstraksiyon çözücüsünü ve verimliliğini artırır, bu nedenle ısıtma işlemi kolaylaştırır. Ayrıca matriks üzerinde şişme bir etkiye sahip olabilir ve analiz matriks etkileşimini etkileyebilir, bu da analizleri ekstraksiyon için daha kullanılabilir hale getirir. Mikrodalga ekstraksiyonu, sistemin aşırı ısınmasını önlemek için havalandırma adımı ile ayrılmış iki rampa ile programlanmıştır. Ekstraksiyon sırasında ölçülen sıcaklık  $75-80^{\circ}\text{C}$  olarak tespit edilmiştir [120].

Guihua Fang ve arkadaşlarının bebek sütü üzerinde MAE tekniğini kullanarak yaptıkları bir çalışmada bebek sütü örneklerinde prometrin, ametrin, prometon, cyromazine, atrazine, atraton, simetryn ve melamin pestisitlerinin araştırılmıştır. Sabit pestisit konsantrasyonu ( $2\text{ mg kg}^{-1}$ ,  $4\text{ mg kg}^{-1}$  hariç tüm analizler için melamin ve

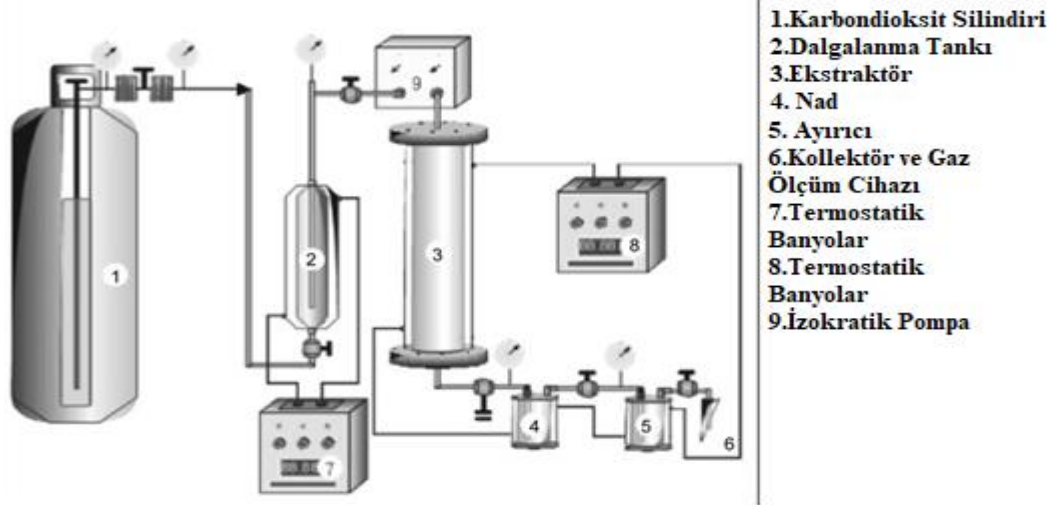


cyromazine için) metanolde hazırlanmış, 0.5 g bebek sütüne eklenerek homojenize edilmiştir. Karışım ekstraksiyondan önce bir saat kuluçkaya yatırılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsünü istenilen pH'a ayarlamak için 1 M hidroklorik asit veya 2.5 M potasyum hidroksit kullanılmıştır. Karıştırma hızı 600 rpm olarak ayarlanmıştır. Ekstraksiyondan sonra, numunelerin kapakları açılmadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Daha sonra ekstrakt 9000 rpm'de 5 °C'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Optimum MAE koşulları belirlendikten sonra, örnek LC-MS/MS sistemine verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 5-100 µg kg<sup>-1</sup> derişim aralığında tüm pestisitler için % 72- % 111 arasında değişen ekstraksiyon geri kazanımları elde edilmiştir. Bağlı standart sapmaları (RSD) % 8'den azdır. Soxhlet ile karşılaştırıldığında, MAE yönteminde daha az çözücü kullanmıştır ve daha kısa bir ekstraksiyon süresi ile daha yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir [121].

#### **1.4.8. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)**

SFE'nin ilk uygulamaları, King tarafından belirtildiği gibi 1970 yılı başlarında gıda endüstrisinde geliştirildi. Yıllar içindeki teknolojik değişimler ile SFE, hem ekstrakte edilmiş fraksiyonların toplanması yoluyla ilgili bileşiklerin izolasyonunu hem de istenmeyen bileşiklerin bir matriksten çıkarılmasını sağlar [122]. SFE, laboratuvarlarda pestisit kalıntılarının ekstraksiyonu için, yüksek enstrümantal analiz maliyeti ve her matriks için çok sayıda parametrenin optimizasyonunu sağlamak için düzenli olarak kullanılmaktadır. SFE'nin gıda analizindeki en büyük avantajları, yüksek ekstraksiyon seçiciliğidir. Bu sayede elde edilen ekstrakt nispeten saftır ve konsantre edilmiştir [123].

SFE, öncelikle katı numunelere uygulanabilen verimli bir ekstraksiyon yöntemidir. Etkinlik, seçicilik, kısa ekstraksiyon süreleri, düşük çözücü hacimleri gibi çeşitli avantajlarının yanı sıra ciddi dezavantajları da vardır. Bunlar ise zor optimizasyon, yüksek aparat ve bakım maliyeti, yüksek boşluk ve seviyeleri gibi sıralanabilir. SFE teknikleri, hayvansal kaynaklı gıdalarda pestisit analizi için yaygın olarak kullanılır [124].



Şekil 1.14. SFE Sistemi [125]

Sistemde CO<sub>2</sub> gazı kullanıldığı için herhangi bir tehlikeye yol açmaz ve üründe zararlı bir kalıntı bırakmaz. Ayrıca CO<sub>2</sub> gazı kullanılan en ucuz çözücülerden birisidir. Geleneksel yöntemlerde kullanılan çözücüler daha pahalı ve yanıcı olabilirken CO<sub>2</sub> bu gibi dezavantajlara sahip değildir. Fakat bunlara rağmen SFE'nin bazı dezavantajları da vardır. Bunlardan öncelikli olanı dielektrik sabitinin düşük olmasıdır. Çünkü düşük dielektrik sabit bazı bileşiklerin saf olarak elde edilememesine sebep olur. Bir diğeri ise ekstraktlarda matrikslerin istenmeyen bileşenlerden bağımsız gelmemesi ve bu nedenle de temizlenmeye gerek duyulmasıdır. Temizlenme basamağına ise bilhassa yağlı analitler için gerek duyulmaktadır. Bu durumu engellemek için süperkritik iki gaz karışımı içeren alternatif olabilecek yaklaşımlar son yıllarda gündemdedir [126].

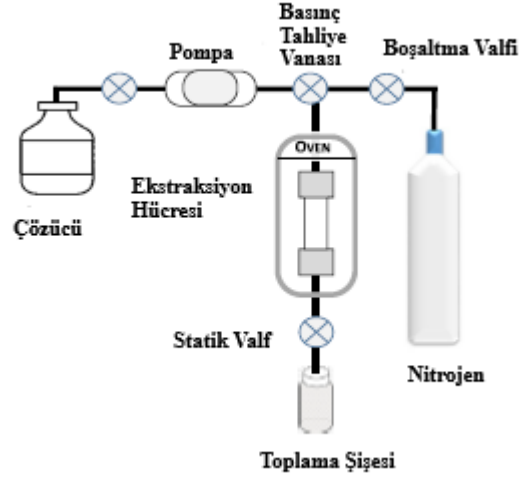
Wigfield ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yumurta örneklerinde artışa neden olan yirmi iki organoklorür pestisitlerin geri kazanımları, karbondioksit kullanılarak süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) ile gerçekleştirilmiştir. Yumurta örnekleri kabuklarından çıkarılarak blender ile homojenize edilmiş ve gerekli olana kadar dondurularak saklanmıştır. Çözülmüş yumurta örneğinin bir kısmı (1 g) bir beher içinde Hydromatrix (1.2 g) ile karıştırılmıştır. Karışım ekstraksiyon kabına eklenmiş ve Hydromatrix (2 x 0.5 g) ile durulanmıştır. SFE tekniği ekstraksiyonu yapılan numuneler konsantrasyonları 1 g mL<sup>-1</sup> olacak şekilde GC'ye enjekte edilmiştir. Elde

edilen sonuçlara göre 0.1 ppm seviyesinde geri kazanımlar elde edilmiştir. SFE tarafından LOD değerleri 0.072-0.006 ppm bulunmuştur [127].

Rissato ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 5 g bal örneği 3 mL su ile karıştırılarak 40 ° C'de bir su banyosunda ısıtılmıştır. Bal örneklerine uygun bir standart çalışma çözeltisi eklenerek daha sonra karışıma liyofilizasyon işlemi için 2 g selüloz tozu eklenmiştir. Çalkalanarak homojenize edilmiş ve liyofilizasyondan önce -18 ° C'de dondurulmuştur. Bal örneklerinde pestisit geri kazanımını optimize etmek için ekstraksiyon süresi 10, 20 ve 30 dakikada test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyi verim 400 barda 90 °C'de değiştirici olarak asetonitril kullanıldığında elde edilmiştir. Temizleme adımı için Florisil kartuşları kullanılmıştır. 0.01–0.10 mg kg<sup>-1</sup> derişim aralığında bal numunelerinden pestisitlerin çoğunluğu için geri kazanımları % 75-94 arasında değişmektedir [128].

#### **1.4.9. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon (PLE)**

PLE ilk olarak 1996 yılında Dionex tarafından başlatılan yenilikçi bir numune hazırlama sistemi olarak tanımlanmıştır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, çözücülerin ekstraksiyon verimliliğini artırmak için sıcaklık ve basınç kullanımına dayanan otomatik bir numune hazırlama yöntemidir ve katı ve yarı katı matrisler için geçerlidir. PLE koşullarında, çoğu çözücü örnek ekstraksiyonu için çok ilginç özelliklere sahiptir. Yüksek sıcaklık kullanımı ile analitlerin çözünürlüğü artar. Ayrıca, ısı daha yüksek bir difüzyon oranını teşvik eder ve matris-analiz etkileşimlerinin kırılmasına yardımcı olur. Ayrıca, yüksek basınç çözücüyü kaynama noktasının altında tutar. Yüksek basınç ve sıcaklığın birlikte kullanılması, çözücünün viskozitesini ve yüzey gerilimini de azaltır. Böylece, çözücü matris yapısında daha verimli bir şekilde nüfuz edebilir ve hedef bileşiklerin ekstraksiyonu artırılabilir [129]. PLE'nin verimliliği, özellikle Soxhlet olmak üzere diğer ekstraksiyon tekniklerine kıyasla normalde daha yüksektir [130]. PLE'de basınç değişikliği normal kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklarda sıvıların ekstraksiyon çözücülerini kullanmasına izin vermek için uygulanır [131].



Şekil 1.15. PLE Sistemi [132]

PLE, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından poliklorlu bifeniller (PCB'ler), organoklorin ve organofosforlu pestisitler (OCP ve OPP), yarı uçucular veya BNA'lar, klorlu fenoksi herbisitler ve polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH' lar) analiz etmeye yardımcı bir yöntem olarak onaylanmıştır [133].

Choi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada balıklarda 14 organoklorlu pestisit için seçici basınçlı sıvı ekstraksiyonu kullanılarak hızlı bir otomatik ekstraksiyon ve temizleme yöntemi geliştirilmiştir. Numuneler toplandıktan hemen sonra buz içeren bir kutuya yerleştirilerek laboratuvara taşınmıştır. Her balık örneğinden derileri çıkarılmış ve daha sonra kas dokuları ultra dağıtıcı kullanılarak homojenize edilmiştir. Her numune daha sonra bir kurutucuda  $-70$  °C'nin altında dondurularak kurutulmuştur. Dondurularak kurutulmuş numuneler çıkarılana kadar  $-4$  °C'de tutulmuştur. PLE tekniği uygulanan numunelerden elde edilen sonuçlara göre balık dokusu örneğinin ortalama lipid içeriği ağırlık olarak %23.3 (w/w) ve standart sapma %1.1 (n = 3) olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon hücresine alümina, florisil, asidik-silika, alümina ve silika jel veya alümina ve asidik-silika eklenmesi ekstrakttaki lipid miktarını önemli ölçüde azaltmıştır. Adsorban kütlesi başına çıkarılan lipid miktarı alümina için  $21 \text{ mg g}^{-1}$ , asidik-silika için  $20 \text{ mg g}^{-1}$ , alümina ve asidik-silika için  $19 \text{ mg g}^{-1}$  birlikte, florisil için  $19 \text{ mg g}^{-1}$  ve alümina-silika jel için  $16 \text{ mg g}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir [134].

Khan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada homojenize edilmiş yer elması ve patates örnekleri 15000 rpm'de, numunenin bir kısmı (200 g) ince bir macunla haline getirilmiş. Sodyum sülfat (~10 g) ekledikten sonra, PLE ekstresinin toplam hacmi (27 mL) su ile seyreltilmiştir (~10 mL). Ekstrakt durulama çözücünün eklenmesiyle seyreltilmiş, yeterli yöntem duyarlılığını sağlamak için bir buharlaşma adımına geçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yer elması örneklerinin analizinde karbofuran, transfluthrin ve iprobenfos kalıntılarının sırasıyla 10 (%±5), 12 (%±6) ve 8,8 (%±3) ng g<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Yer elması örneklerinin yaklaşık %90'ı herhangi bir pestisit kalıntısı içermediği belirtilmiş ve numunelerin %5'i Avrupa Birliği MRL'lerinin üzerinde kalıntılara sahip olduğu gözlenmiştir. Tatlı patates örneklerinin ikisinde, yumru bitkilerinde yaygın olarak kullanılan bir herbisit olan atrazin (EU/MRL = 50 ng g<sup>-1</sup>), sırasıyla 48 (%±6, n = 6) ve 43 ng g<sup>-1</sup> (%±8, n = 6) olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, tatlı patates örneğinde sırasıyla 8.5 (%±5, n = 6) ve 10 (%±9, n = 6) ng g<sup>-1</sup>'de triflamatin saptanmıştır [135].

## 1.5. Deneysel Tasarım

Bir deneyin tasarlanması temel olarak iki başlıkta incelenebilir. Bunlar klasik ve istatistiksel deney tasarımıdır. Klasik deney tasarımında, faktörlerin her biri tek tek değiştirilerek diğer faktörler sabit tutulur ve her kombinasyon için deneyler tekrarlanır (one-factor-at-a-time, OFAT). Bu yaklaşımın dezavantajı faktörlerin birbirleri arasındaki etkileşimi ihmal ediyor olmasıdır. Her kombinasyon için deneylerin tekrarlanması çalışma için harcanan zaman ve maliyeti arttırmaktadır. Ayrıca fazla kimyasal kullanımı gerektirmekte ve yeterli güvenilir sonuçlar vermemektedir.

İstatistiksel deney tasarımında ise her faktörün tüm farklı seviyeleri için deneylerin tekrarlanmasına gerek yoktur. Kullanılan çeşitli yöntemler ile bütünü temsil eden az sayıda deney yapılarak çalışma tamamlanır. Kesirli deneyler adı verilen bu deneylerle pratikte uygulamacılara büyük kolaylıklar sağlanır.

Bir deney tasarım çalışması temel olarak aşağıda sıralanan basamaklarda yapılmaktadır.

- İlk aşamada test edilecek kalite değişkeni tespit edilir. Kalite değişkeni ya da deney çıktısı, iyileştirilmesi amaçlanan değişkendir. Bu değişkenin değeri nitel ya da nicel olabilmektedir.

- Sonuç üzerinde etkili olduğu düşünölen tüm faktörler tespit edilerek deneye dahil edilir.
  - Faktörlerin belirlenmesinden sonra bu faktörlerin birbirleri arasında etkileşim olup olmadığına bakılır.
  - Deneye dahil edilmesine karar verilen faktörlere ve bunların etkileşim durumlarına göre uygulanacak deney tasarımının türü belirlenir.
  - Her bir faktör için seviye tespiti yapılır. Faktörlerin seviyeleri arasındaki fark ne çok küçük ne de çok büyük olmamalıdır.
  - Deneye dahil edilmeyen diğör tüm faktörlerin deney sonuna kadar sabit olması gerekir.
  - Faktör düzey kombinasyonları belirlenir.
  - Deneyde kullanılacak olan makine, ekipman, çalışacak personel tespit edilir. Deney esnasında bunların değıştirilmemesi istenir.
  - Bütün deneylerin tamamlanmasından sonra elde edilen sonuçlar, hesap tablolarına veya Minitab gibi paket programlara girilerek sonuçlar yorumlanır. Hesap tabloları çoğunlukla kullanımının kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir.
  - Hesap tabloları kullanılacak ise normal olasılık grafiğı çizilerek, etkilerin ve/veya etkileşimlerin sonuç üzerindeki etkisi tespit edilir.
  - Etkili olduğu belirlenen faktör ve etkileşimlerin düzeyleri belirlenerek kalite değışkeninin değıeri hesaplanır.
  - Son olarak ise doğrulama deneyleri yapılarak bulunan sonuçlardan emin olunur.
- Bir deneysel tasarımın seçimi, araştırılacak faktör sayısı ve türüne dayanmalıdır. Örneğın amaç, sadece faktör sayısını azaltmak ve cevaplar üzerinde etkisi en yüksek olan birkaç faktörü bulmak şeklinde ise, ayrıca araştırılacak çok fazla faktör varsa, en az sayıda deneme yapılmasına imkân veren, ancak sadece ana faktör etkilerini doğrusal modeller kurarak değıerlendiren istatistiksel deney tasarımları seçilebilir. Bu amaçla gerçekleştirilen deneysel tasarım türleri aşağıda listelenmiştir.

### **1.5.1. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Deney Tasarımı ( $2^k$ )**

Cevap değışkeninin, seçilen faktör (parametre) seviyelerinin tüm muhtemel kombinasyonları için ölçüm yapıldığı deneyler, tam faktöriyel tasarım olarak adlandırılır. Klasik tasarımda cevaplar, her faktör için sıra ile incelenirken, diğör

faktörler sabit tutulur. Deneylerin incelenmesinde cevapların faktör düzeylerine bağlı olup olmadığını belirlemek için, klasik tasarım yerine, faktöriyel tasarımın kullanılmasının iki önemli nedeni vardır:

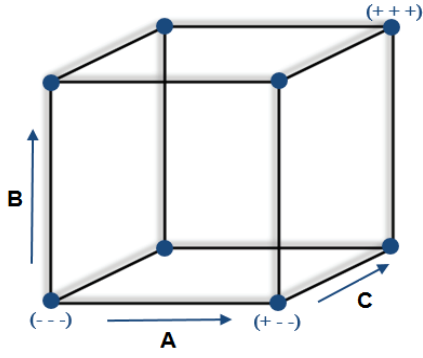
- Faktöriyel tasarım, etkileşimi bulur ve tahmin eder (tek tek deney ile yapılamaz).
- Eğer faktör etkileri toplanabilir ise, aynı kesinlik değerine ulaşabilmek için, faktöriyel tasarımda klasik yaklaşıma göre daha az ölçüm yapmak yeterlidir.

Klasik tasarımlarda (tek-tek deneylerde, one-factor-at-a-time), genel olarak  $k$  sayıda faktör için faktör tasarımına göre, aynı kesinliğe ulaşabilmek için,  $k$  kez daha fazla deney yapmak gerekir.

Analitik yöntemler daha çok eser miktarda madde tayinlerinde kullanıldıkları için, ölçülen cevapların bağlı olduğu faktör seviyelerinin, cevapların en büyük olmasını sağlayacak biçimde seçilmesi çok önemlidir. En uygun faktör düzeylerinin bulunması işleme optimizasyon denir. Optimizasyonda ilk basamak, cevabı etkileyen faktörlerden ve etkileşimlerden hangilerinin önemli olduğunu saptanmasıdır. Bunun için, genellikle faktör düzeylerinin "düşük" ve "yüksek" olarak bilindiği faktör tasarımı kullanılır. Kantitatif değişken olması durumunda, "düşük" ve "yüksek" terimleri genel anlamlarında kullanılır. Düzeylerin doğru seçimi analistin deneyimine, bilgisine ve deney sisteminin fiziksel sınırlamalarına bağlıdır. Örneğin çözücü olarak su kullanılıyor ise, 0–100°C arasında çalışılabilir.

Düzy seçiminde karşılaşılan sorunlardan bazıları aşağıda ele alınmıştır. Kalitatif değişken için "yüksek" ve "düşük" ikili farklı koşulları göstermektedir; mekanik ya da magnetik karıştırma, kataliz kullanımı, örneğin toz, tanecik ve granül olması gibi faktörleri kapsar.<sup>39</sup>

A, B ve C faktörlü bir sistemi ele aldığımızda, aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi faktör seviyelerinin  $2 \times 2 \times 2 = 8$  muhtemel kombinasyonu vardır. Pozitif işaret faktörün yüksek düzeyde, negatif işaret düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. İlk kolon kombinasyonları göstermektedir. "1" sayısı tüm faktörlerin düşük düzeyde (– eksi işareti ile gösterilmiştir) olduğunu göstermektedir.



Kombinasyon	A	B	C	Cevap (Response)
1	-	-	-	$Y_1$
A	+	-	-	$Y_2$
B	-	+	-	$Y_3$
C	-	-	+	$Y_4$
Bc	-	+	+	$Y_5$
Ac	+	-	+	$Y_6$
Ab	+	+	-	$Y_7$
Abc	+	+	+	$Y_8$

### 1.5.2. Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarımı ( $2^{k-p}$ )

Tam bir faktöriyel deneyinin yapılabilmesindeki problem, faktör sayısı arttıkça deney sayısının da hızla artmasıdır: örneğin iki düzeyde,  $k$  faktör için (her düzey kombinasyonu için 2 deney)  $2^{k+1}$  sayıda deney yapmak gerekir (5 faktör için 64 deney). Faktör sayısı üçten fazla olması halinde üçlü ve daha yüksek etkileşimlerin ihmal ile deney sayısı azaltılabilir. Bu etkileşimlere ait kareler toplamı birleştirilerek bakiye kareler toplamı bulunur. Bu durumda tekrarlı deneylere gerek yoktur. Buradaki mantık, yüksek dereceli etkileşimlerin temel etkiden ve iki-faktör etkileşimden çok küçük olduğunun kabul edilmesidir. Yüksek dereceli etkileşimler ihmal edilebilirse, faktör düzeylerinin muhtemel kombinasyonlarının uygun bir fraksiyonu temel ve iki-faktör etkileşimlerinin bulunmasında yeterli olacaktır. Bu tür bir deney tasarımı kısmi (fraksiyonlu) faktöriyel tasarım (FFD) olarak adlandırılır.

Faktör tasarımında bir başka problem, faktörlerin sürekli değişkenler olması durumunda etkinin, kullanılan yüksek veya düşük düzeylerine bağlı olmasıdır. Eğer yüksek ve düşük düzeyler birbirlerine çok yakın ise, tüm muhtemel faktör düzeyleri boyunca bu faktörün etkisi ihmal edilemeyecek bile olsa, ilgili faktöre ait etki anlamlı bulunmayabilir. Diğer taraftan, düzeyler birbirlerinden uzak ise etki, bir maksimumun her iki tarafına da düşebilir fakat yine de cevaplarda anlamlı olmayan bir fark verebilir.



### 1.5.3. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımı, 1946'da Plackett ve Burman tarafından geliştirilmiş iki seviyeli kesirli faktöriyel tasarımlardır. Bu tasarımın temel amacı, birçok sayıda faktör içerisinde hangilerinin sonuç üzerinde etkili olduğunu tespit etmektedir.

**Tablo 1.2.** 4 faktör için Plackett-Burman deneysel tasarımı

	Düzeyleler	
	Düşük	Yüksek
Faktörler	-	+
A	-	+
B	-	+
C	-	+
D	-	+

Deney	Faktörler			
	A	B	C	D
1	+	-	+	-
2	-	-	-	-
3	+	+	-	+
4	-	-	+	+
5	-	+	+	+
6	+	+	+	-
7	-	+	+	-
8	+	-	-	-
9	+	-	+	+
10	-	+	-	-
11	+	+	-	+
12	-	-	-	+

Bu tasarım türünün en büyük avantajı diğer tasarım türlerine göre daha az sayıda deneme gerektirmesi olup, dezavantajı ise yapılarının karmaşık olmasıdır.  $N$  sayıda deneyde,  $k=N-1$  değişken olduğunda ve deney sayısı  $N$ 'in 4'ün katı olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Plackett-Burman tasarımları kübik olup, geometrik olmayan tasarımlar olarak adlandırılmaktadır. Plackett-Burman tasarımında deney tekrar sayısı, 4'ün katları şeklinde belirlenmektedir (8, 12, 16, 20, 24, 32, 36, 40). Tasarlanan bir

deneyin 32 faktörü olduğunu varsayarsak Plackett-Burman tasarımı kullanılır ise 36 deney yapılmasını gerektirmekte, buna karşılık çözünürlük III tipindeki kesirli faktöriyel deneyler 64 deney gerektirmektedir. Tablo 1.2.'da 4 faktör için, Plackett-Burman tasarımı için oluşturulan deneysel tasarım örneği ve yapılacak deney listeleri verilmiştir.

## 1.6. Yüzey Yanıt Tasarımları

Klasik yöntemlerin yukarıda belirtilen dezavantajları Yüzey Yanıt Yöntem (Response Surface Methodology, RSM) gibi istatistiksel deneysel tasarım ile elde edilen parametrelerin optimizasyonu ile giderilebilir. Yüzey yanıt yöntemlerinde amaç, optimum veya kabul edilebilir deney koşullarının belirlenmesidir.

RSM' de kompleks etkileşimlerin (ikili-üçlü etkileşimler) varlığında yöntem geliştirme, iyileştirme ve optimizasyonda kullanılan istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin bir kombinasyonudur.

Yüzey yanıt yöntemleri genellikle üç temel basamaktan oluşur:

- Tasarım deneylerin gerçekleştirilmesi
- Regresyon ile yüzey modelleme
- Optimizasyon

Lineer modelleme, deneysel verilerin açıklanmasında yetersiz kalıyorsa faktöriyel deneysel tasarım tekniklerini kullanmak gerekir. Cevap fonksiyonlarının belirlenmesinde en yaygın kullanılan tasarımlar, tam faktöriyel (Full Factorial Design, FFD), fraksiyonel faktöriyel tasarım (Fractional Factorial Design, FFD), merkezi kompozit tasarım (Central Composite Design, CCD), Plackett-Burman, Box-Behnken, Doehlert tasarımlar ve karışık tasarımlardır. Mikroekstraksiyon tekniklerinde parametre sayısının çokluğunda dolayı fraksiyonel faktöriyel tasarımlar ve CCD en çok tercih edilen deney tasarımlarıdır.

### 1.6.1. Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^k$ , $3^k$ ya da karışık seviyeli)

Bu tasarımlarda, yapılacak olan denemelerde faktör seviyelerinin olası sıralanış biçimleri bulunur.  $k$  sayıda faktör için yapılacak olan deneme sayısı  $2k$  veya  $3k$  şeklinde olur. Ek olarak olarak hem 2, hem de 3 ve üzerinde seviyeli faktörlerin olduğu karışık tam faktöriyel tasarım kullanılabilir. Nicel faktörlerin bağımlı değişkenlere olabilecek etkisinin lineer olmadığından şüphelenildiği durumlarda ve nitel bir faktörde 3 seviye olması gerektiği durumlarda  $3k$  veya karışık tasarımın kullanılması yararlı olabilir. Faktör sayısı 4 ve üzerinde olduğunda,  $3k$  tasarımında deneme sayısı  $\geq 81$  şeklinde çok fazla olacağı için  $2k$  tasarımı kullanılabilir, ancak mutlaka en az 2 adet orta nokta ilave edilmelidir.

### 1.6.2. Merkezi Kompozit Tasarım (CCD)

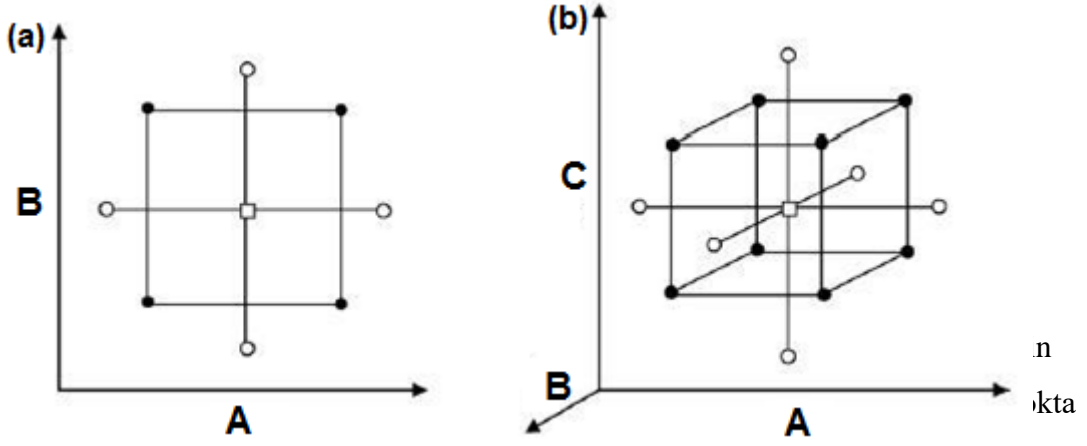
Merkezi kompozit tasarım, ardışık deneysel tasarım için çok uygun bir yöntemdir Çok fazla sayıda deney yapmaya gerek olmadan, deneylerin uygunluğu hakkında yeterli miktarda bilgi sağlamaktadır.

Box-Wilson tarafından sunulan bu tasarım başlıca:

- Tam ve fraksiyonlu faktöriyel tasarım
- Star tasarım (değişken sayısına bağlı olarak merkezden  $\alpha$  uzaklığında olan noktalardan)
- Merkez (orta değer) noktadan oluşmaktadır.
- CCD aşağıda belirtilen özelliklerle açıklanabilir:
- Toplam deney sayısı  $N = 2^k + 2k + C$  eşitliği ile verilir.
  - $k$ : faktör (parametre) sayısı
  - $C$ : merkez noktadaki tekrar sayısı
- $\alpha$ , faktör sayısına bağlı olarak değişen bir değerdir ve  $2^{(k-C)/4}$  eşitliği ile verilir. İki, üç ve dört faktör için  $\alpha$  değerleri sırasıyla 1.41, 1.68 ve 2.00 olarak verilir.
- Tüm faktörler beş seviyede verilir ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ )

Şekil 1.16.'da iki ve üç değişkenli CCD verilmiştir.

Tablo 1.3.'de ise CCD'ye ait deneysel matrisdeki kodlanmış değerler gösterilmektedir.



**Tablo 1.3.** CCD için deney matrisi: (a) iki faktörlü (b) üç faktörlü

	a			b		
	A	B		A	B	C
<b>Faktöriyel Tasarım</b>	-	-	<b>Faktöriyel Tasarım</b>	-	-	-
	+	-		+	-	-
	-	+		-	+	-
	+	+		+	+	-
				-	-	+
				+	-	+
				-	+	+
<b>Eksen Noktalar</b>	$-\alpha$	0	<b>Eksen Noktalar</b>	$-\alpha$	0	0
	$\alpha$	0		$\alpha$	0	0
	0	$-\alpha$		0	$-\alpha$	0
	0	$\alpha$		0	$\alpha$	0
				0	0	$-\alpha$
				0	0	$\alpha$
<b>Merkez Nokta</b>	0	0	<b>Merkez Nokta</b>	0	0	0

### 1.6.3. Box Behnken Tasarımı

Bu tasarım, CCD tasarımının aksine içinde tam veya kısmi faktöriyel tasarım içermeyen üç seviyeli tasarımlardır. Tüm tasarım noktaları, bir kübün veya hiperkübün kenarlarının ortasında bulunur ve bu noktaların hepsi bir kürenin yüzeyine yerleştirilmiştir. Bu tasarımlarda 1. ve 2. dereceden model katsayılarının etkili bir şekilde tahmini sağlanabilir. Ancak bu tasarımın kullanılabilmesi için en az üç faktörün nicel olması gerekir. Aynı sayıda faktörün olduğu durumlarda, CCD tasarımına göre daha az nokta içerdiği için, daha ekonomiktir. Fakat içinde faktöriyel tasarım bulundurmadığı için ardışık sıralı denemeler için uygun olmadığı, yani yapılmış bir faktöriyel tasarımdaki denemelerle birleştirilemeyeceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu tasarımda, CCD tasarımında olduğu gibi eksen noktaları bulunmadığı için faktör seviyelerinin alt ve üst limitlerinin dışına çıkılmaz. Ayrıca, tüm faktörlerin aynı anda düşük (-) ve aynı anda yüksek (+) olduğu denemeler bulunmaz. Üç faktörlü Box Behnken tasarımında 15 adet ve dört faktörlü tasarımda ise 27 adet deneme yapılması gerekmektedir.

### 1.6.4. Doehlert Tasarımı

Doehlert tasarımı, başka faktör aralıklarına geçebilme ve genişletilebilme gibi özelliklere sahip olan karesel modeller oluşturan bir tasarımdır. Tüm ana faktör etkileri, birinci dereceden etkileşimler ve karesel etkiler birbirine karıştırılmadan tahmin edilebilir. CCD tasarımlarıyla benzer özelliklere sahiptir. Geometrik olarak, hiper-üçgenler (simpleks) içeren iç içe geçmiş çok yüzlü şekillerdir. Faktör sayısının  $k$  olduğu ve merkez noktası içermeyen durumda deneme sayısı  $N= 1 + k + k^2$  şeklindedir. Bu tasarımlara mutlaka 3–4 adet merkez noktası eklenmesi tavsiye edilmektedir.

### **1.6.5. D-Optimal Tasarım**

Bu tasarımda faktör seviyelerinin oluşturduğu deneysel bölge, düzenli hiper-üçgen şeklinde değildir, düzensiz çok yüzlü şeklindedir. Klasik tasarımların uygulanmasının mümkün olmadığı, faktör seviyelerinde çeşitli kısıtlamalar olduğu, dolayısıyla düzensiz şekilli deneysel bölgenin olduğu, nitel faktörlerin fazla olduğu ve ikiden fazla seviyelerinin olduğu hem proses hem de formülasyon bileşen faktörlerinin birlikte olduğu durumlarda tercih edilebilir.

### **1.6.6. Karışık Tasarım**

Bu tasarım, optimizasyonu yapılacak olan ürünlerdeki çıktıya etki eden ana faktörlerin formülasyon içeriğinde farklı amaçlar için kullanılan maddeler olduğu, RSM tasarımlarının özel bir türüdür. Kare ve küp modeller oluşturulabilir. Bu tasarımda yanıt değişkenleri, formülasyon karışımı içindeki farklı maddelerin oranlarının bir fonksiyonudur. Formülasyon (karışım) faktörlerinin seviyeleri, toplam miktarın oranı olarak ifade edilir ve 0 – 1 arasında değişen değerler alabilir. Dolayısıyla her denemede formülasyon faktörlerinin toplamı sabittir ve eğer sabit tutulan (ör. etken madde) bir madde yoksa 1'e eşittir. Bu tasarımlarda aynı zamanda hem proses faktörleri hem de eğer karışımın toplam miktarı da çıktıya etki ediyorsa, toplam miktar faktörü de kullanılabilir. Tasarımı oluşturma sırasında faktörler tanımlanırken, karışım faktörlerinden birisi, toplam miktara tamamlayıcı görevi olan bir faktör olarak tanımlanabilir. Bu şekilde her bir denemede karışımın oranını, eğer sabit tutulan bir madde yoksa 1'e tamamlayacak olan dolgu maddesinin, çıktılar üzerinde etkisinin önemli olmadığı ya da göz ardı edilebilir olduğu varsayılır. Hiper üçgen ağırlık merkezi (centroid), hiper-üçgen kafes (lattice) ve üç köşe noktaları (ekstreme vertices) şeklinde tasarım türleri bulunmaktadır. Ağırlıklı olarak formülasyondaki maddelerin en uygun kullanım oranlarının bulunması olduğu durumlara uygun bir tasarımdır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

#### 2.1.1. Cihazlar

- Permethrin (%80 cis-%20 trans izomeri, Supelco, Bellefonte, PA, USA):
- Asetonitril (HPLC saflıkta, Merck)
- Aseton (GC saflıkta, Merck)
- Toluen (GC saflıkta, Merck)
- n-hekzan (HPLC saflıkta, Merck)
- NaCl (analitik saflıkta, Merck)
- NaOH (analitik saflıkta, Merck)
- Susuz sodyum sülfat (analitik saflıkta, Merck)
- HCl (%37 w/v, d: 1.18 g/cm<sup>3</sup>, Merck)
- Deiyonize su (HPLC saflıkta, Merck)
- Florisil (0.150–0.250 mm partikül boyutlu, Merck)
- Yumurta (Yerel marketlerden satın alındı)

#### 2.1.2. Cihaz ve Materyaller

- Yüksek Basınç Sıvı Kromatograf (HPLC), THERMO SEPARATION PRODUCTS, SPECTRA SYSTEM, P1500
- Detektör, THERMO SEPARATION PRODUCTS, SPECTRA SYSTEM, UV1000
- C18 Kolon (150 mm×4,6 mm, partikül çapı 5 µm, Supelco, USA)
- Ultrasonik banyo (BANDELIN SONAREX, SUPER, RK 51OH, Germany)
- OHAUS STARTER 3000 masa tipi pH metre (Ohaus Corporation, USA)
- pH elektrodu (Ohaus Corporation, USA)
- Santrifüj (CENTRIFUGE 5702 Eppendorf, Germany)
- Analitik terazi (0,0001 g, PRESICA 92SM-202A, Switzerland)
- Manyetik karıştırıcı (MSH-20D Wisestir, Labortechnik GmbH, Germany)
- Enjektör, 10 µL (SGE, 22 gauge, fixed needle, Supelco, USA)

- Otomatik pipet (10–100 µL, Eppendorf, Germany)
- Otomatik pipet (100–1000 µL, Eccopipette, Germany)
- Manyetik balık (10 mm uzunluğunda ve 3 mm çapında, Supelco, USA)
- Polipropilen hollow fiber (fiber iç çapı: 600 µm fiber et kalınlığı: 200 µm, gözenek çapı 0.2 µm, Wuppertal, Germany)
- PTFE silikon bölmeli örnek şişeleri (15 mL, Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Süzme Sistemi, Sartorius (45 µm)
- 0,45 µm PTFE membrane filtre (Phenomenex, USA)
- 0,45 µm nylon membrane filtre (Phenomenex, USA)

## 2.2. Kromatografik Koşullar

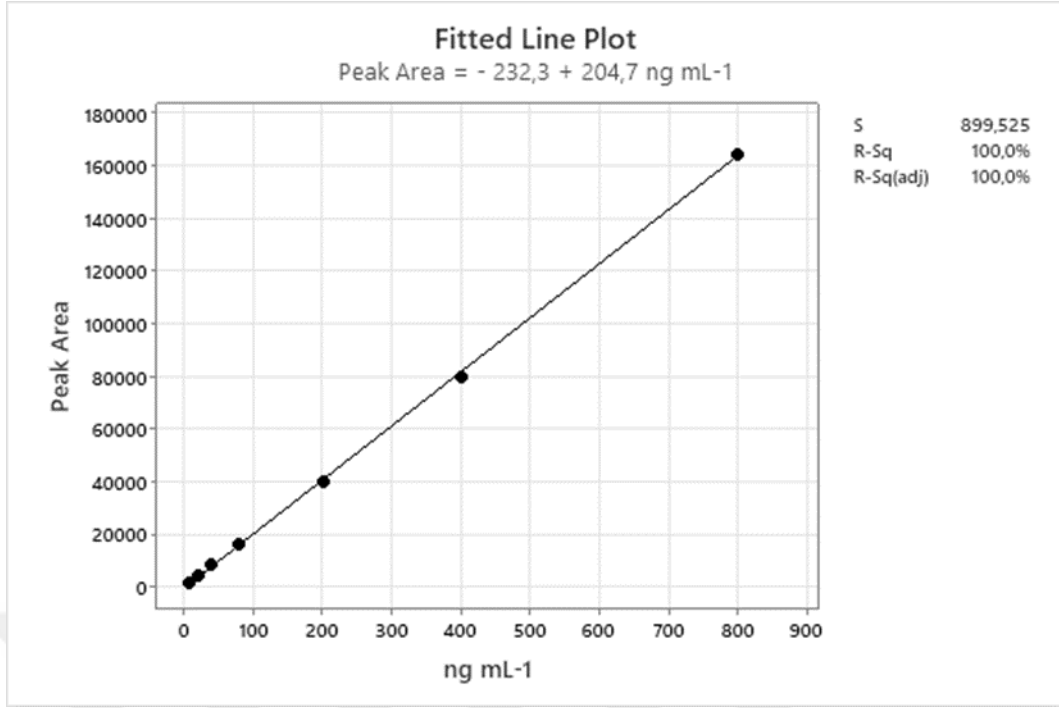
- Kolon: C18 (150 mm×4,6 mm, partikül çapı 5 µm)
- Hareketli faz: % 90 ACN–% 10 su
- Akış hızı: 0.5 mL min<sup>-1</sup>
- Detektör: UV-215 nm

## 2.3. Permethrin Çözeltileri

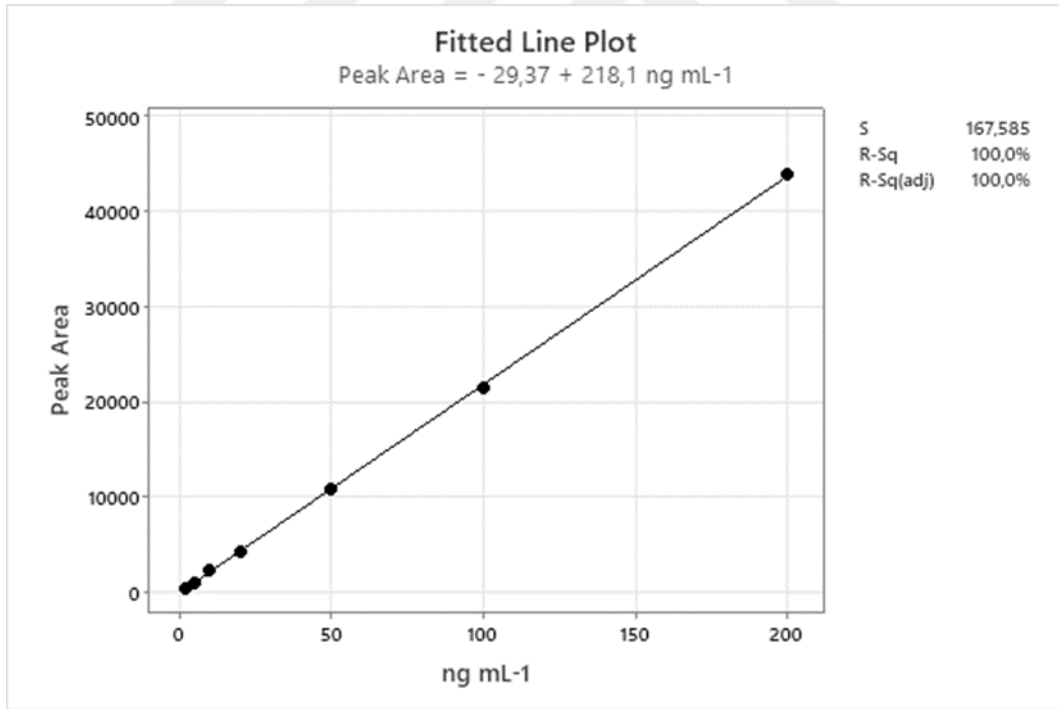
Stok permethrin çözeltisi asetonitril içinde 100 mg L<sup>-1</sup> derişiminde hazırlandı. Cis-permethrin ve trans-permethrin derişimleri sırasıyla 80 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup> 'dir.

Çalışmada permethrin terimi, cis ve trans izomerlerinin toplamı için kullanılmıştır. Standart çözeltiler, stok çözeltiden uygun miktarlarda alınarak günlük hazırlanmıştır. Permethrin ve izomerleri için elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 2.1-2.3'de verilmiştir.

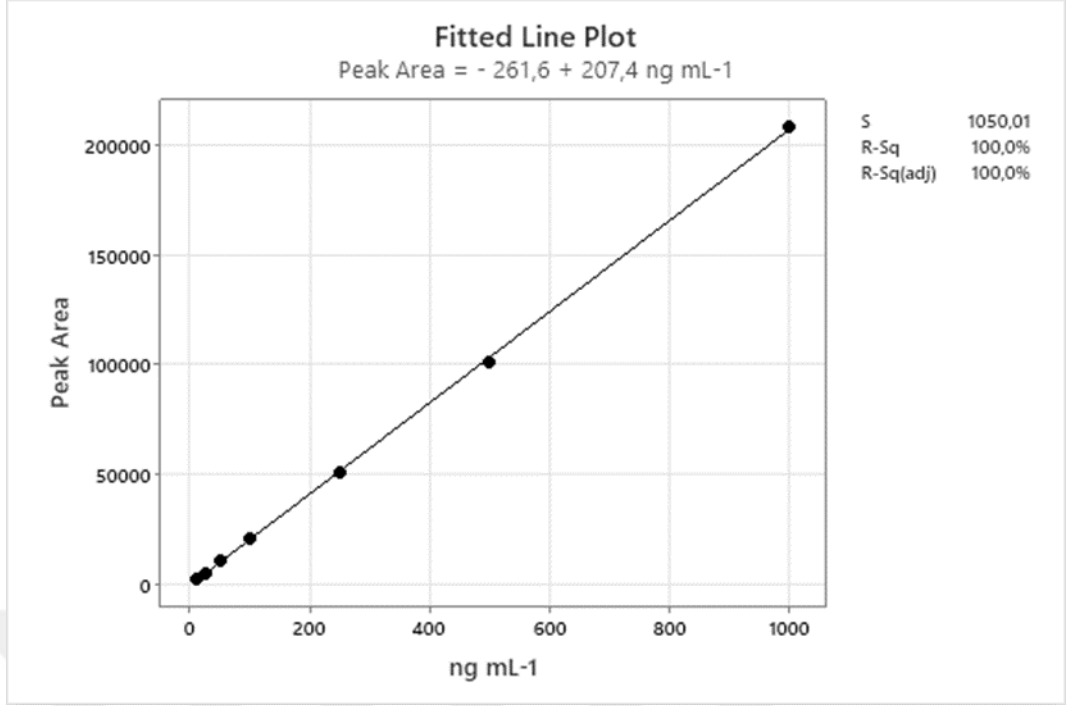




**Şekil 2.1.** Cis-permethrin kalibrasyon doğrusu



**Şekil 2.2.** Trans-permethrin kalibrasyon doğrusu



Şekil 2.3. Permethrin kalibrasyon doğrusu

## 2.4. Yumurta Permethrinin Klasik Sıvı- Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi ile Geri Alma Çalışmaları

Çalışmada kullanılan yumurtalar yerel marketlerden satın alındı. Bir yumurta kırılarak sarısı ile birlikte 10 dk 800 rpm’de homojenize edilerek ekstraksiyon için hazır hale getirildi. Homojenize edilen yumurtadan 1.0 g numune alınarak geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

### I. Yöntem

Homojenize edilen yumurtadan alınan 1.0 g numune viallere alındı. Viallerin üzerine standart permethrin çözeltisinden belirli miktarlarda (100-1500 ng g<sup>-1</sup>) eklendi ve 1 dk 800 rpm’de karıştırıldı. 5 mL %1 asetik asit içeren ACN eklenerek 15 dk 800 rpm’ de ekstraksiyon gerçekleştirildi. Üstte kalan ACN fazı epindorf tüpüne alındı. Yumurta örneği üzerine tekrar 5 mL %1.0 asetik asit içeren ACN eklenerek 15 dk 800 rpm’de ekstrakte edildi. Üstte kalan ACN fazı aynı epindorf tüpü alındı. Ekstraksiyon işlemi

tamamlanan epindorf tüp içerisindeki numune üzerine 1 g susuz sodyum sülfat eklenerek 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Ekstrakt filtreden geçirildikten sonra kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Üzerine 1 mL ACN eklendi ve 10 µL HPLC'ye enjekte edildi.

## II. Yöntem

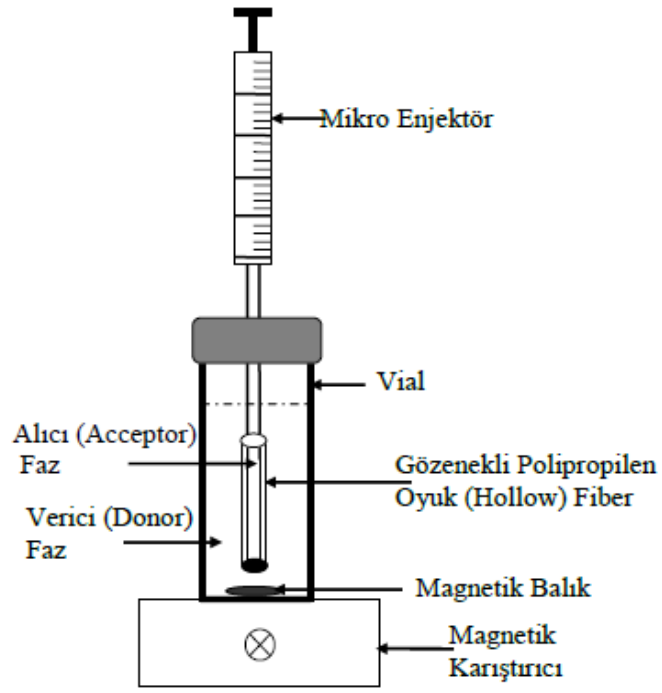
Homojenize edilen yumurtadan alınan 1.0 g numune viallere alındı. Viallerin üzerine standart permethrin çözeltisinden belirli miktarlarda (100-1000 ng g<sup>-1</sup>) eklenerek ekstraksiyon işlemine başlandı. Daha sonra 5 mL %1.0 asetik asit içeren ACN eklendi ve 1 dk 800 rpm'de karıştırıldı. ACN fazı üzerine 5 mL n-hekzan eklenerek 800 rpm'de 15 dk karıştırılarak birinci ekstraksiyon tamamlandı. Burada ekstrakte edilen örnekten hekzan fazı ayrılarak epindorf tüpe alındı. Viale tekrar 5 mL n-hekzan eklenerek 800 rpm'de 15 dk karıştırılarak ikinci ekstraksiyon tamamlandı. Bu aşamada yine n-hekzan fazı ayrılarak aynı epindorf tüp üzerine eklendi. Epindorf tüpün üzerine 1 g sodyum sülfat eklenerek 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alınan hekzan fazları PTFE filtresinden geçirilerek 0.5 mL'ye konsantre edildi. Konsantre edilen numunelerin ön temizleme işlemlerini gerçekleştirmek için şartlandırılmış florisil kolon hazırlandı. 0.5 g florisil cam pamuk konulmuş pastör pipete boşluk olmayacak şekilde konuldu ve üzerine tekrar cam pamuk yerleştirildi. Florisil kolondan önce 5 mL n-hekzan geçirildi. Kolon yaklaşık 1 dk kurutuldu. Kurutulan kolondan 0.5 mL'ye kadar konsantre edilen hekzan fazı geçirilerek cam tüpe alındı. Kolon tekrar yaklaşık 1 dk kurutuldu ve 5 mL n-hekzan daha geçirildi ve aynı cam tüpe alındı. Cam tüpler kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra üzerlerine 1 mL ACN eklenerek HPLC sistemine 10 µL enjekte edildi.

## 2.5. HF-LPME Yöntemi

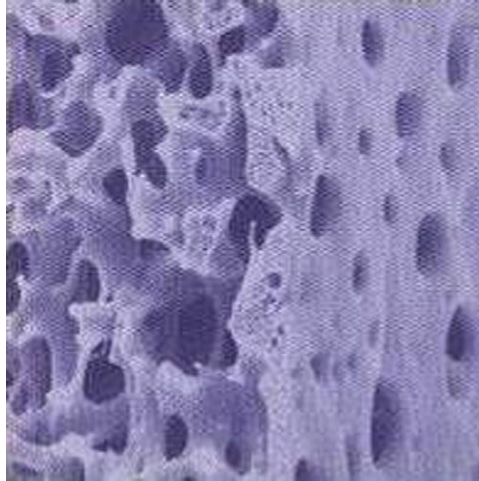
0.5 gram yumurta epindorf santrifüj tüplerine aktarıldı. Tasarım deneylerinde standart permethrin karışımından  $500 \text{ ng g}^{-1}$  derişiminde eklendi. Üzerine 1 mL ACN (%1 HAc) eklendi ve ultrasonik banyoda 45 dakika homojenize edildi. Daha sonra 9 mL deiyonize su eklendi ve ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Epindorf tüpüne 0.7 gram NaCl eklendi ve 1 dakika ultrasonik banyoda tekrar bekletildi ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sulu kısım 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrandan geçirildi. Sonrasında hollow fiber ile ön temizleme çalışmaları yapıldı.

Fiber 22 mm uzunluğunda kesildi ve aseton içerisinde ultrasonik banyoda 5 dakika tutularak atık maddeler uzaklaştırıldı ve kurutuldu. Ekstraksiyon işlemi için 10 mL'lik mikro enjektöre hava kabarcığı kalmayacak şekilde alıcı faz (toluen) çekildi. Polipropilen hollow fiber enjektör ucuna takılarak, gözeneklerinin organik faz ile dolması için alıcı faz içerisinde ~60 s bekletildi. Daha sonra mikro enjektöre çekilen organik faz, fiberin içine (lümene) aktarıldı. Fiberin açık olan ucu, uçları alev ile ısıtılmış pens yardımıyla kapatıldı. Ardından fiberin yüzeyinde biriken organik fazı uzaklaştırmak için fiber deiyonize su içerisine daldırılarak birkaç saniye bekletildi. Fiber sudan çıkarılarak Şekil 2.4.'de gösterildiği gibi yumurta örneğinin bulunduğu ekstraksiyon kabına daldırıldı. Ekstraksiyon süresince örnek magnetik karıştırıcıda 400 ya da 800 rpm hızla karıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra (10 ya da 30 dakika), vakit kaybetmeden alıcı faz (toluen) enjektöre çekildi. 1.0 mL hacminde vialle alındı. Kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra üzerine 30  $\mu\text{L}$  ACN eklendi ve 10  $\mu\text{L}$  hacminde HPLC'ye enjekte edildi.

Kullanılan fiber atıldı ve sonraki ekstraksiyon için yeni bir fiber kullanıldı. Şekil 2.4.'de Oyuk (Hollow) Fiber Sıvı Faz Mikroekstraksiyon (HF-LPME) sistemi ve Şekil 2.5.'de polipropilen hollow fiberin duvar kesiti görülmektedir. Fiberin çapı 600  $\mu\text{m}$ , duvar kalınlığı 200  $\mu\text{m}$  dir. %70 oranında gözenekli olan fiberin gözenek çapı 200  $\mu\text{m}$ 'dir.



**Şekil 2.4.** Öyuk (Hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyon (HF-LPME) sistemi [49]



**Şekil 2.5.** Polipropilen hollow fiberin duvar kesiti [136]

## 2.6. Deneysel Tasarım

Yumurtada permethrinin hollow fiber mikroekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyonunda etkili parametreleri belirlemek amacıyla iki farklı deney tasarımı uygulanmıştır. Aşağıdaki bölümlerde bu tasarımlar ve faktör düzeyleri açıklanmıştır.

### 2.6.1. İki Seviyeli Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarım

Bu çalışmada,  $2^{4-1}$  fraksiyonlu faktöriyel deney tasarımı kullanılarak, ekstraksiyon zamanı, karıştırma hızı, tuz etkisi ve pH gibi parametrelerin yumurtadan permethrinin HF-LPME ile geri alınabilirliğine etkileri incelenmiştir. Screening deneylerle, bu parametrelerin negatif ya da pozitif etkileri birbirleri ile olan girişimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ön çalışmalar ile ekstraksiyon veriminde etkili sonuçlar veren toluen alıcı faz olarak seçilmiştir.

Her bir parametrenin etkisi birbirleri ile girişimleri Minitab 21 Software programı kullanılarak %95 güven sınırında değerlendirilmiştir.  $2^{4-1}$  faktöriyel deney tasarımda faktör seviyeleri ve kodları Tablo 2.1.'de, deney matrisi ise Tablo 2.2.'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.**  $2^{4-1}$  fraksiyonlu faktöriyel tasarımda faktörler ve seviyeleri

Parametre	Kod	Seviye	
		Düşük	Yüksek
Ekstraksiyon süresi (dakika)	A	10	30
Karıştırma hızı (rpm)	B	400	800
pH	C	4	8
NaCl (% w/v)	D	0	5

**Tablo 2.2.** Fraksiyonlu faktöriyel deney matrisi ( $2^{4-1}$ )

Deney no	A	B	C	D
1	10	800	4	5
2	10	400	4	0
3	30	400	4	5
4	30	800	8	5
5	30	800	4	0
6	10	800	8	0
7	10	400	8	5
8	30	400	8	0

### 2.6.2. Merkezi Kompozit Tasarım (CCD)

Bir sonraki basamakta faktöriyel tasarım sonrasında elde edilen sonuçlara göre belirlenen iki parametreyi –ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı ve NaCl (%w/v)- optimize etmek amacı ile merkezi kompozit tasarım (CCD) uygulanmıştır. CCD deney tasarımında faktör seviyeleri ve deney matrisi Tablo 2.3.'de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Merkezi kompozit tasarım matrisi

Parametre	Seviye			Star nokta ( $\alpha$ :1.41421)	
	Düşük	Merkez	Yüksek	$-\alpha$	$+\alpha$
Ekstraksiyon süresi (dakika)	10	15	20	6.59	23.41
Karıştırma hızı (rpm)	800	900	1000	732	1068
NaCl (% , w/v)	2	4	6	0.636	7.36

Deney no	eks. süresi (dakika)	karıştırma hızı (rpm)	NaCl (% ,w/v)
1	20	800	6
2	15	900	7.36
3(C)	15	900	4
4	20	1000	6
5	6.59	900	4
6(C)	15	900	4
7(C)	15	900	4
8	10	1000	2
9	20	1000	2
10	10	800	6
11	20	800	2
12	15	1068	4
13(C)	15	900	4
14(C)	15	900	4
15	23.41	900	4
16	10	800	2
17	15	732	4
18	15	900	0.636
19(C)	15	900	4
20	10	1000	6



## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1. İki Seviyeli Fraksiyonlu Faktöriyel Deney Tasarım

Çizelge 2.1.'de verilen fraksiyonlu faktöriyel tasarım (FFD) ile permethrinin HF-LPME ile geri alınabilirliklerine (pik alanı) etkili parametreler değerlendirilmiştir. Kontrol edilemeyen faktörlerin etkilerini minimize etmek amacı ile deneyler randomize edilmiştir.

Fraksiyonlu faktöriyel tasarım ile anlamlı faktörlerin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar, permethrin izomerleri ve toplam permethrin için pareto grafikleri, standardize edilmiş etkilerin normal dağılım grafikleri, temel etkiler- ikili etkileşimler grafikleri Şekil 3.1.–3.6.'da verilmiştir.

Fraksiyonlu tasarımda cis-permethrin için karıştırma hızı (rpm), pH ve ekstraksiyon süresi-NaCl ikili etkileşimin anlamlı ( $p < 0.05$ ) parametreler olduğu görülmektedir (Şekil 3.1). Trans-permethrin için ise ekstraksiyon süresi-NaCl ikili etkileşimin anlamlı olduğu Şekil 3.3.'de görülmektedir.

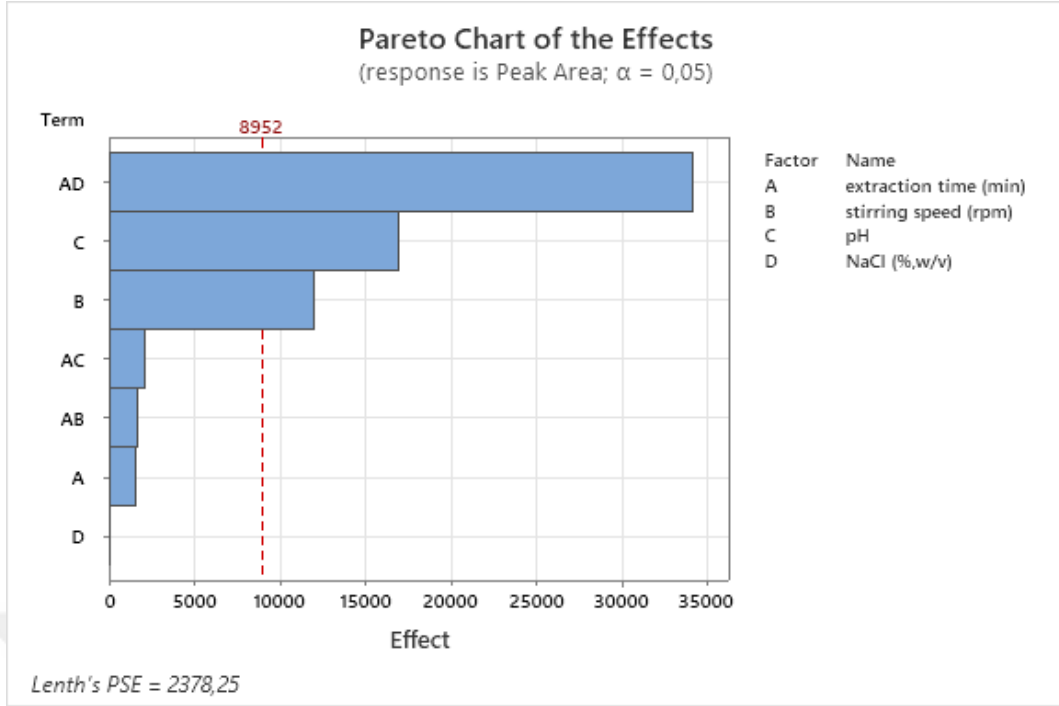
Toplam permethrin için elde edilen pareto ve normal dağılım grafiklerinde pH ve ekstraksiyon süresi-NaCl ikili etkileşimi anlamlıdır (Şekil 3.5.). Tuz derişimi permethrin için pozitif etki gösterirken ekstraksiyon süresi, verimde (pik alanı) negatif etkiye sahiptir. Ekstraksiyon süresi analitin alıcı ve verici fazdaki denge derişiminin öneminden dolayı etkilidir. Ancak uzun ekstraksiyon sürelerinde alıcı faz kaybı (toluen) nedeniyle analitin yeniden çökmesi, topaklaşması söz konusu olabilir [137]. Bu nedenle dengeye ulaşıldığı süreyi belirlemek önemlidir. Ekstraksiyon süresi-NaCl ikili etkileşimin öneminden dolayı bir sonraki CCD tasarımda ekstraksiyon süresi ve NaCl miktarının optimize edilebilmesi için bu iki parametre dikkate alınmıştır.

Karıştırma hızı, pozitif etkiye sahip ve anlamlı olduğundan CCD tasarımda dikkate alınmıştır. Yüksek karıştırma hızında trans-permethrin için negatif etki göstermektedir. Yüksek karıştırma hızında alıcı fazda vorteks oluşmakta ve fiber yüzeyinde hava kabarcıklarının oluşmasına neden olmaktadır. Böylece analitlerin alıcı faza difüzyonlarını engellemektedir. En uygun karıştırma hızını belirleyebilmek amacıyla bir sonraki deney tasarımında yine dikkate alınmıştır.

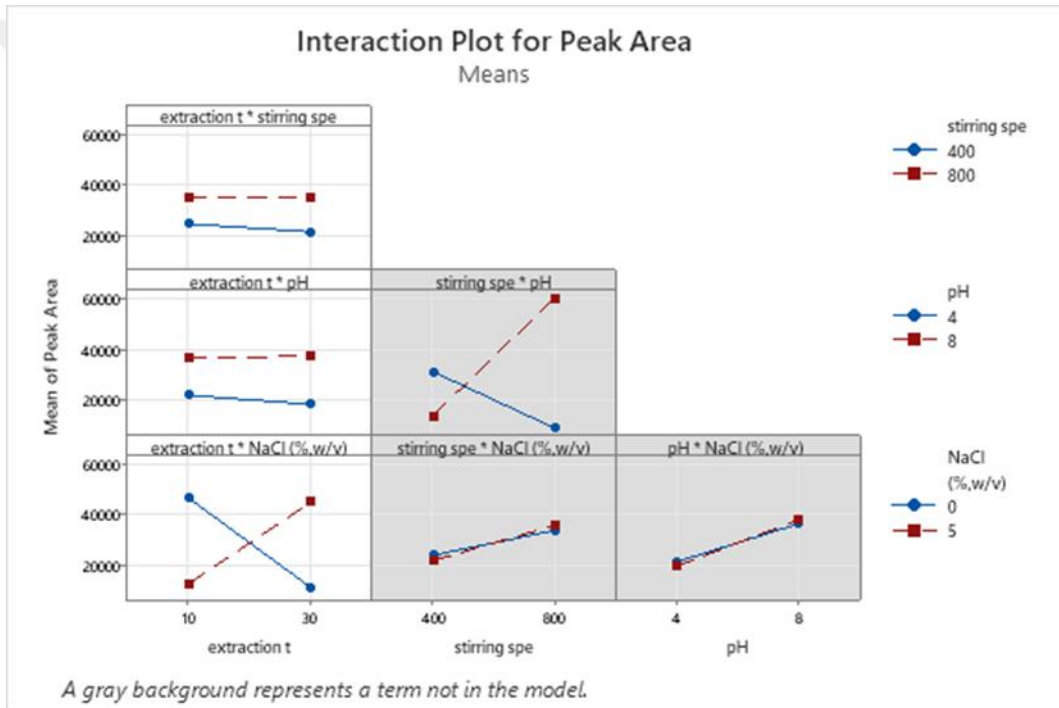
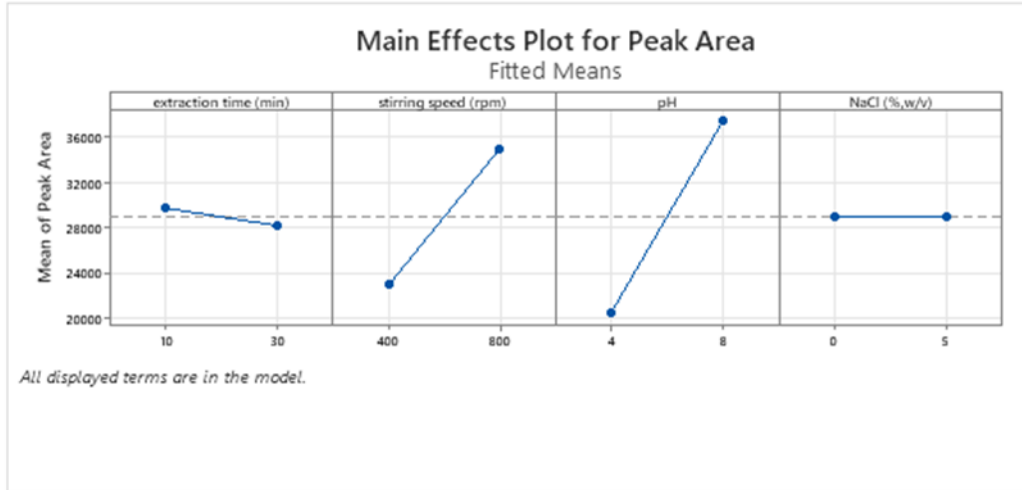
Genel olarak pestisitlerin ekstraksiyon veriminde pH'ın çok etkili olmayacağı beklenirse de pestisitlerin sudaki çözünürlükleri, kimyasal yapılarının yanı sıra pH, sıcaklık, sudaki tuz ve organik madde derişimi gibi parametrelere bağlıdır [138]. Bu parametrelerin birbirleriyle etkileşimleri de dikkate alındığında (Şekil 3.5.) pH'ın etkili olduğu gözlenmiştir. CCD tasarımıda pH değeri 8.0 olarak seçilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde, fraksiyonlu deney tasarım sonuçlarına göre anlamlı ve etkili parametrelerin, ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı ve tuz derişimi olduğu belirlenmiştir. Bir sonraki merkezi kompozit deney tasarımıda bu üç parametrenin etkileri ve birbirleri ile olan etkileşimleri incelenmiştir.

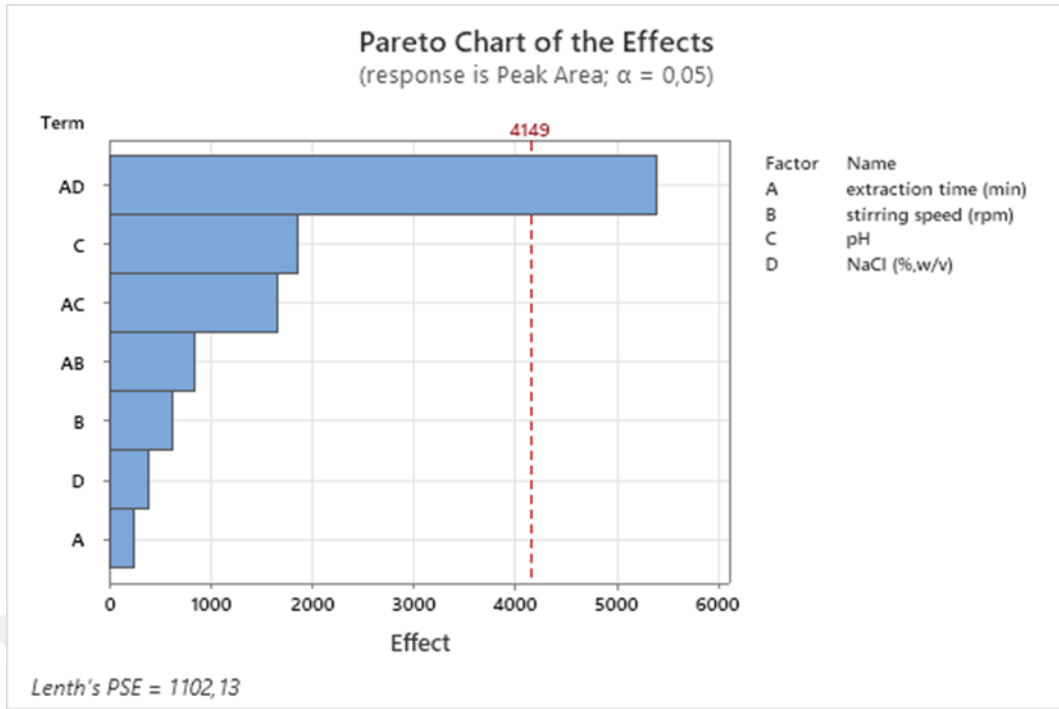




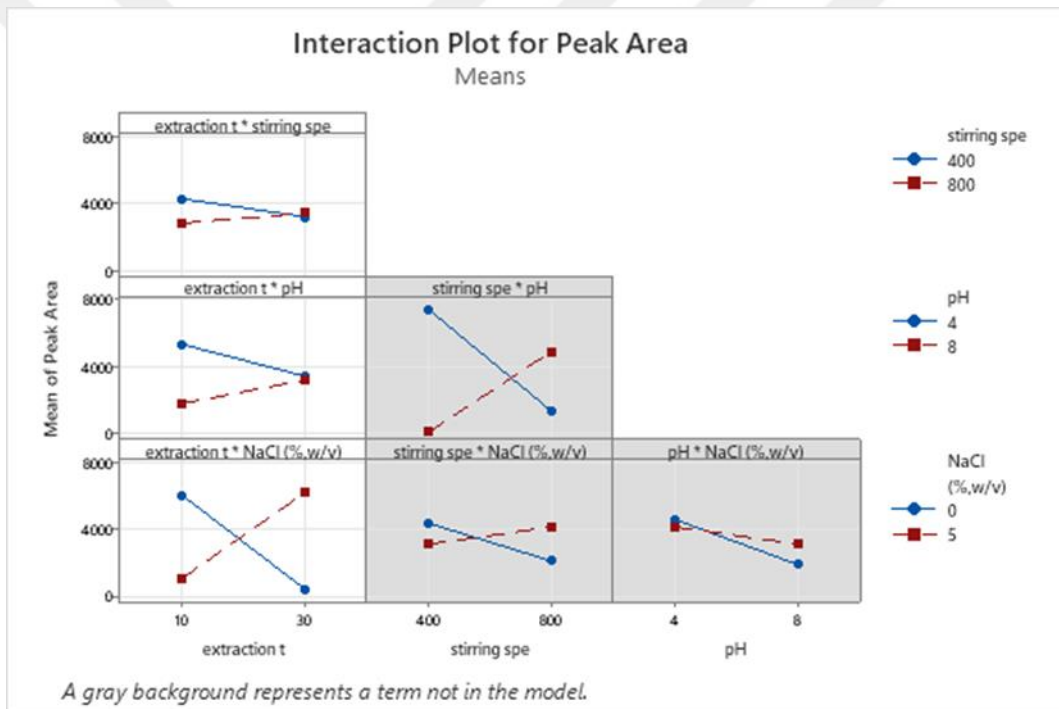
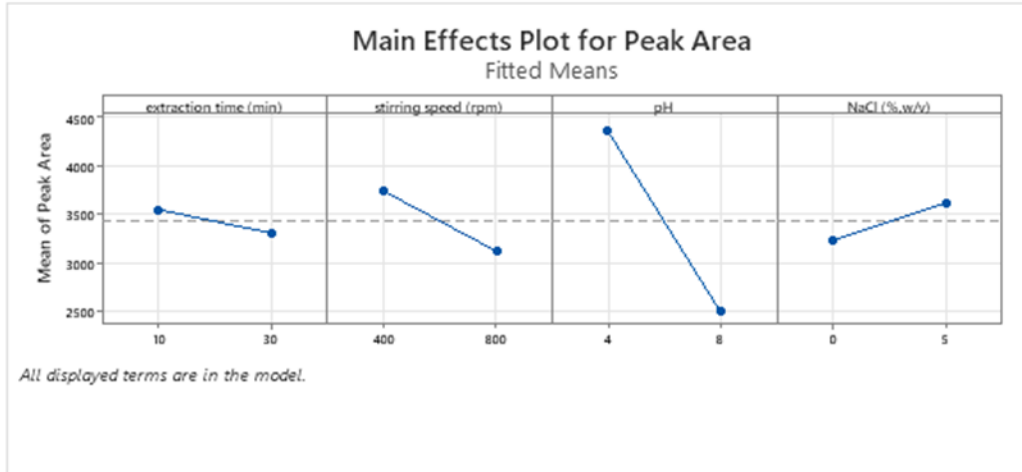
**Şekil 3.1.** FFD'de cis-permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri



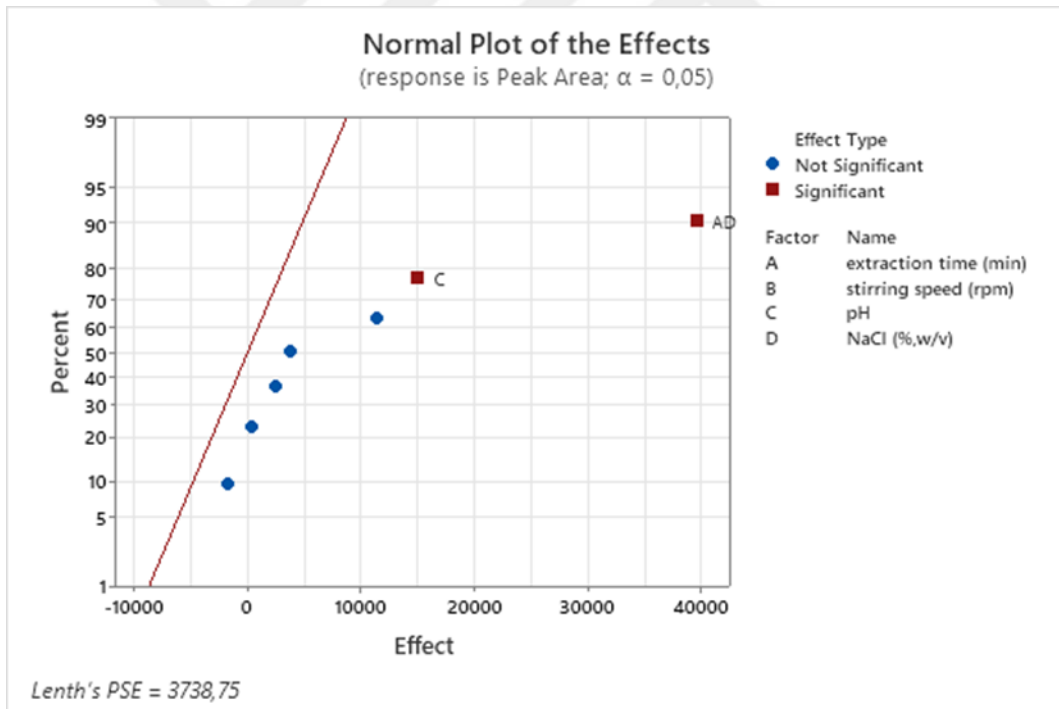
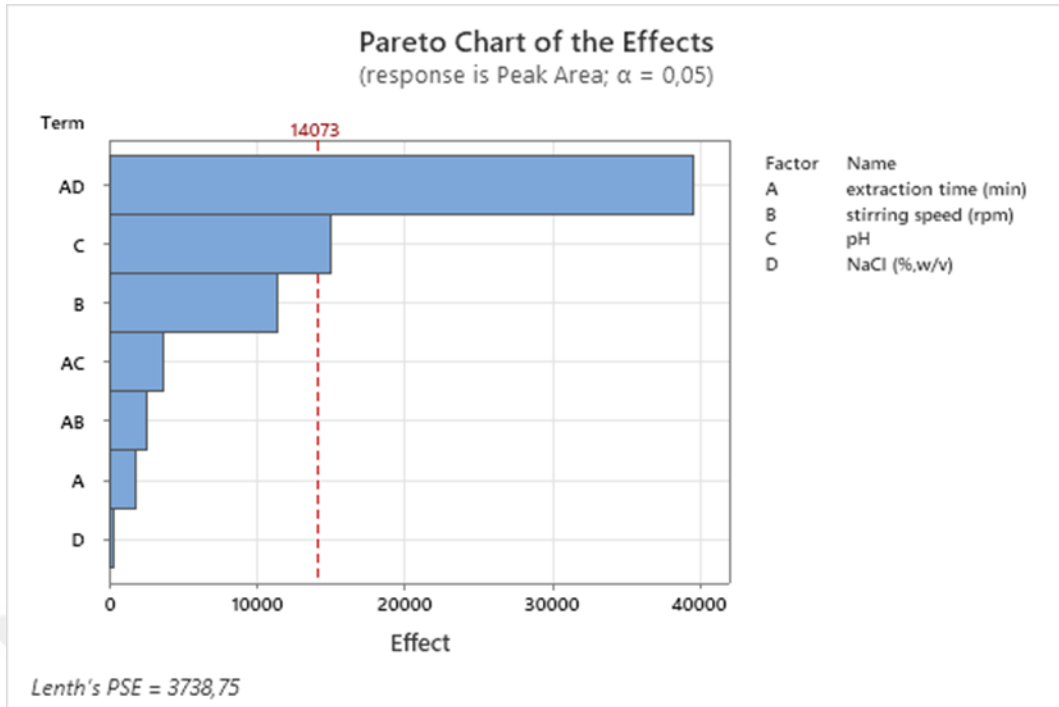
Şekil 3.2. FFD'de cis-permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri



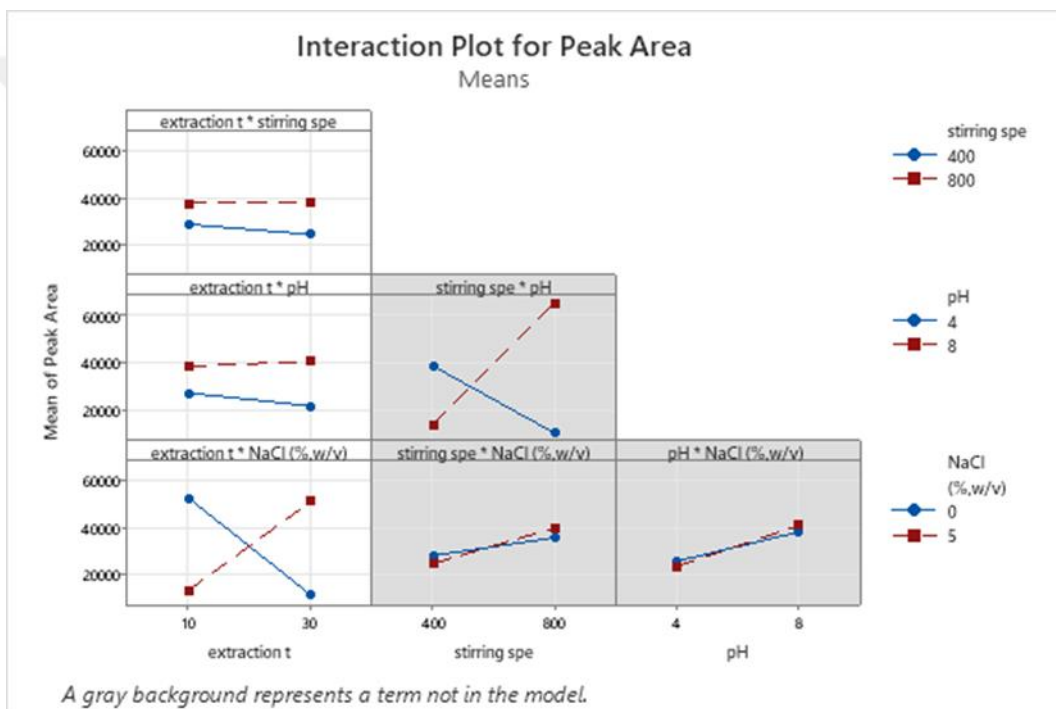
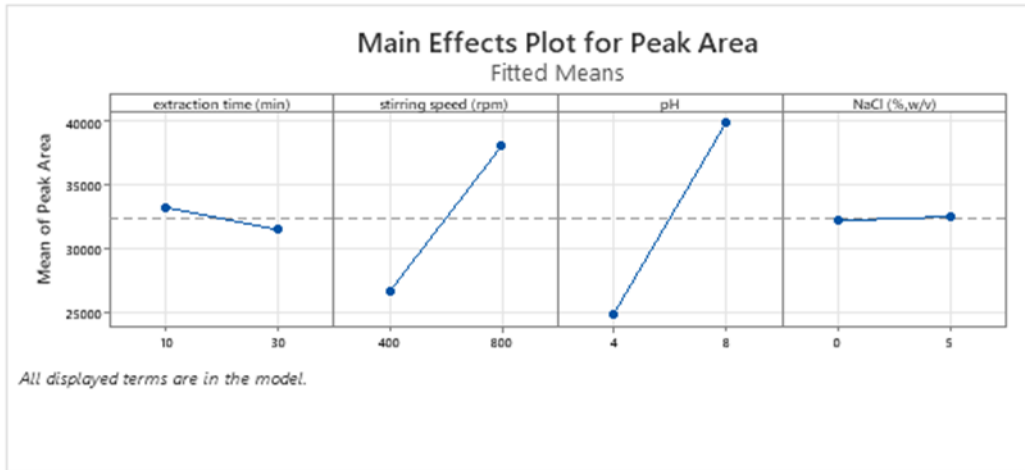
Şekil 3.3. FFD'de trans-permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri



Şekil 3.4. FFD'de trans-permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri



Şekil 3.5. FFD'de permethrin için pareto grafiği, etkilerin normal dağılım grafikleri



Şekil 3.6. FFD'de permethrin için, temel etkiler-ikili etkileşim grafikleri



### 3.2. Merkezi Kompozit Deney Tasarım

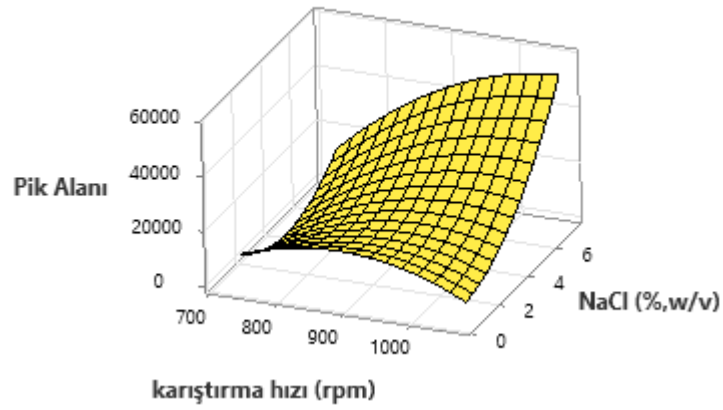
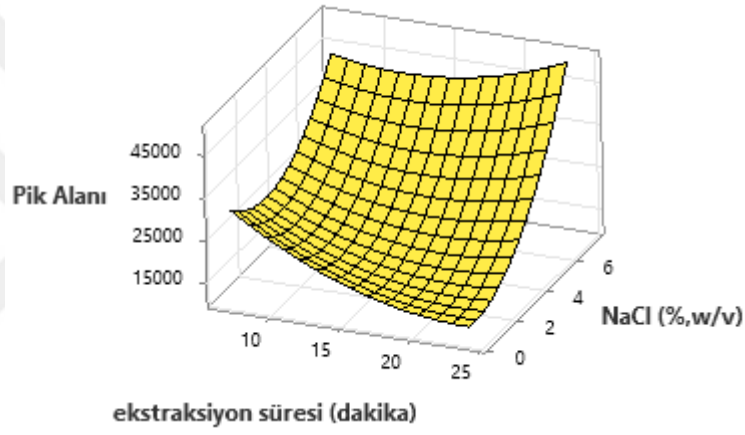
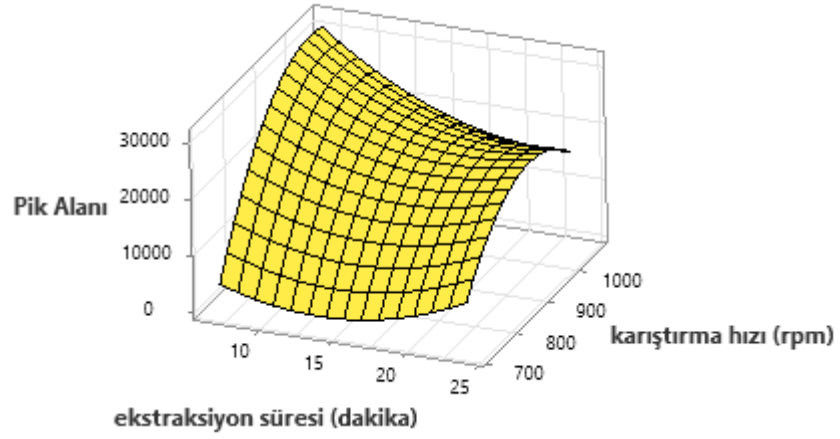
Screening testler (FFD,  $2^{4-1}$ ) sonrasında elde edilen sonuçlara göre belirlenen üç parametreyi (Ekstraksiyon süresi: 10–15–20; karıştırma hızı: 800–900–1000; NaCl(%w/v): 2–4–6) optimize etmek amacı ile merkezi kompozit tasarım uygulanmıştır. Bu üç parametre değerleri Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Deney tasarımı sonrasında elde edilen veriler dikkate alınarak yüzey yanıt grafikleri elde edilmiştir. Bu tasarımda tüm pestisitlerin ekstraksiyon veriminde ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı ve NaCl (%w/v) parametrelerinin etkileşiminden elde edilen yüzey yanıt grafikleri Şekil 3.7.–3.9.'da verilmiştir. Yüzey yanıt grafiklerinde görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimi 18 dakika civarında gözlenirken, tuz derişimi % 7'de, yüksek pik alanları elde edilmiştir. Yüksek tuz derişiminde ekstraksiyon verimi azalmaktadır. Bu etkiler Bölüm 3.1.'de açıklanmıştır. Cis-permethrin için elde edilen varyans analiz sonuçları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

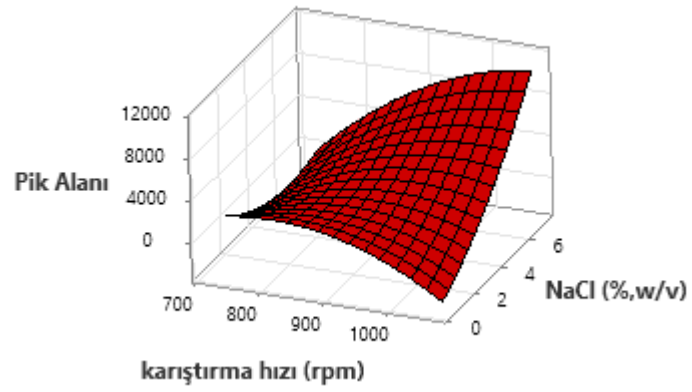
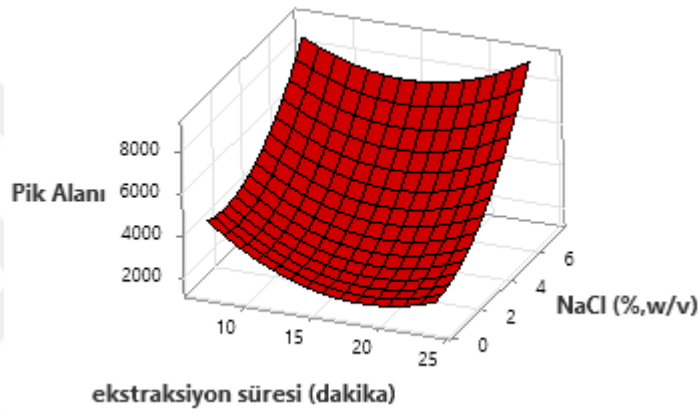
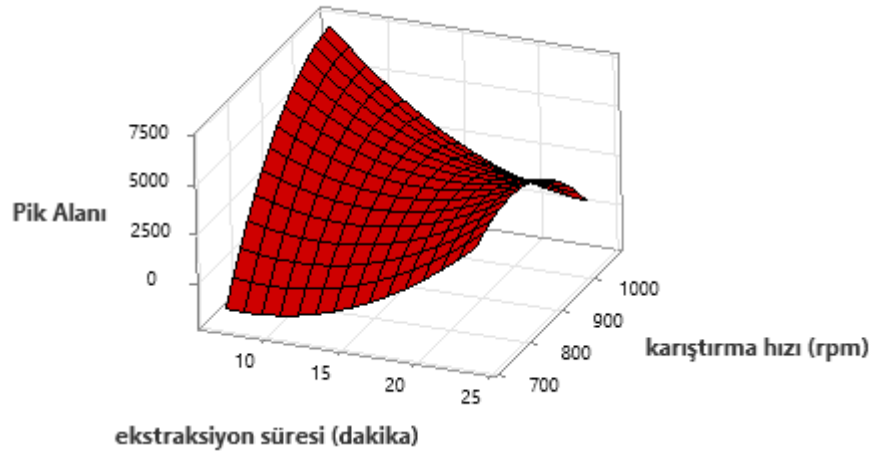
**Tablo 3.1.** CCD tasarımda cis-permethrin için elde edilen varyans analiz sonuçları

Term	Coef	T-Value	P-Value
Constant	18408	4,16	0,002
extraction time (min)	-1718	-0,59	0,571
stirring speed (rpm)	5212	1,78	0,106
NaCl (%w/v)	7699	2,62	0,025
extraction time (min)*extraction time (min)	1613	0,56	0,585
stirring speed (rpm)*stirring speed (rpm)	-3159	-1,11	0,295
NaCl (%w/v)*NaCl (%w/v)	3768	1,32	0,216
extraction time (min)*stirring speed (rpm)	-1668	-0,44	0,673
extraction time (min)*NaCl (%w/v)	2240	0,58	0,572
stirring speed (rpm)*NaCl (%w/v)	3914	1,02	0,331

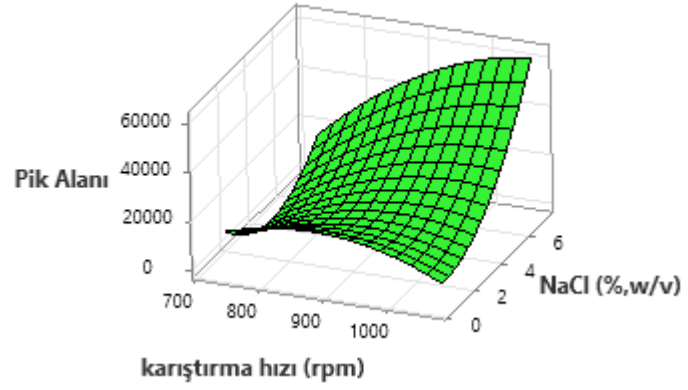
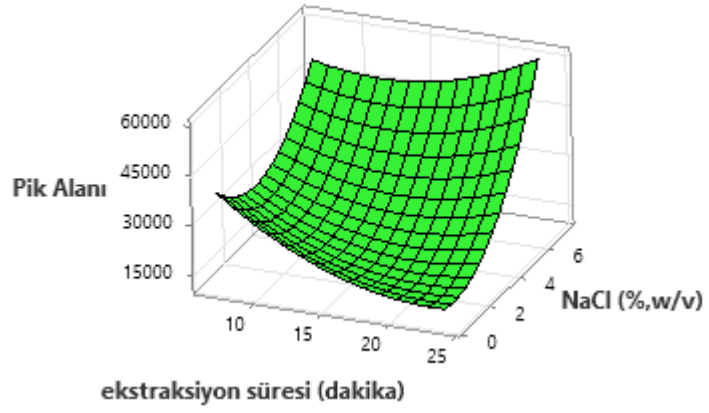
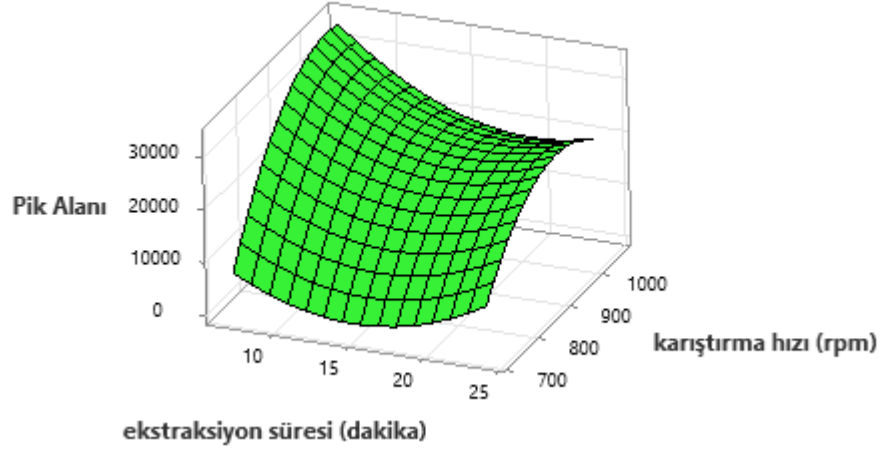
CCD tasarımla elde edilen sonuçların optimizasyonunda yüzey yanıt metodu ve quadratic modelleme için, permethrin ve izomerlerinin pik alanları, desirability değerlerinin fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.10.–3.12.).



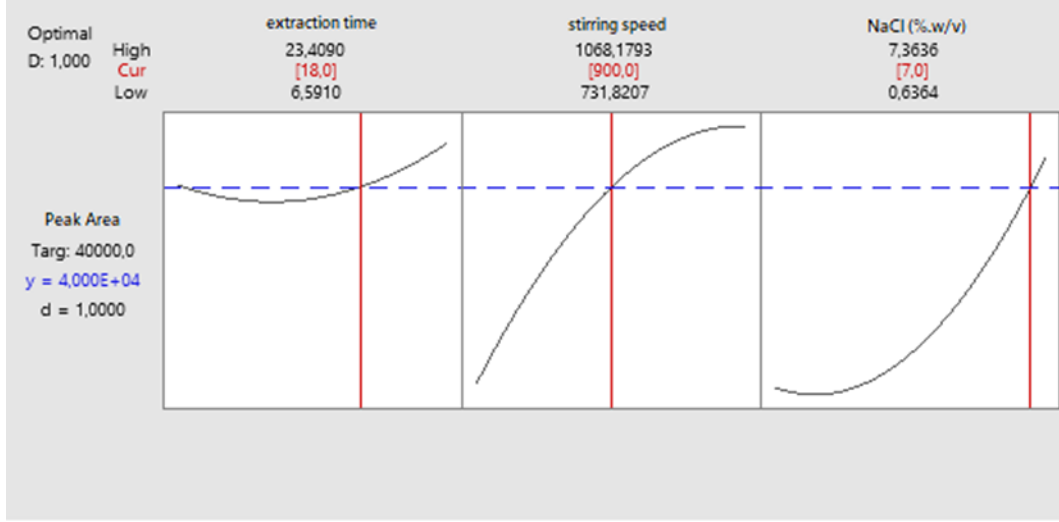
**Şekil 3.7.** Cis-permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl (%w/v) derişimine bağılı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri



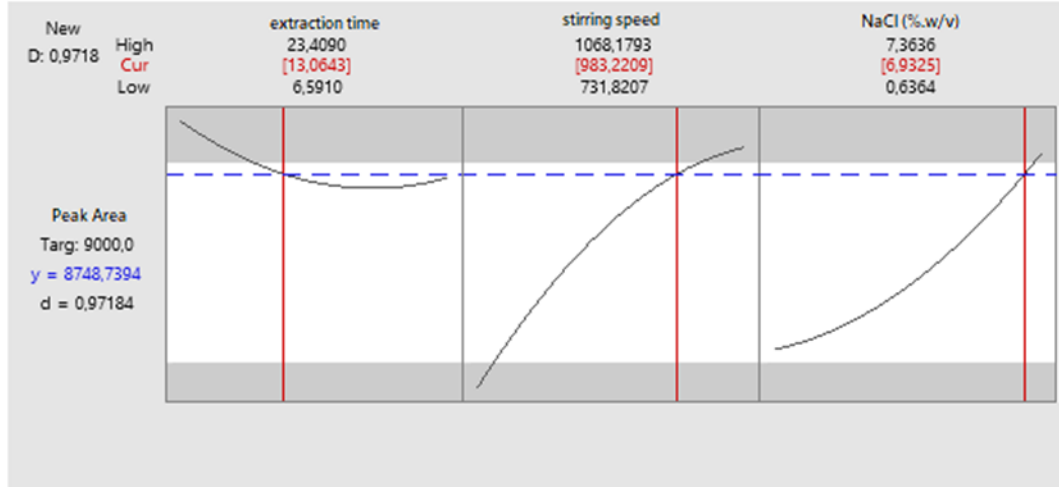
**Şekil 3.8.** Trans-permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl (%w/v) derişimine bağı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri



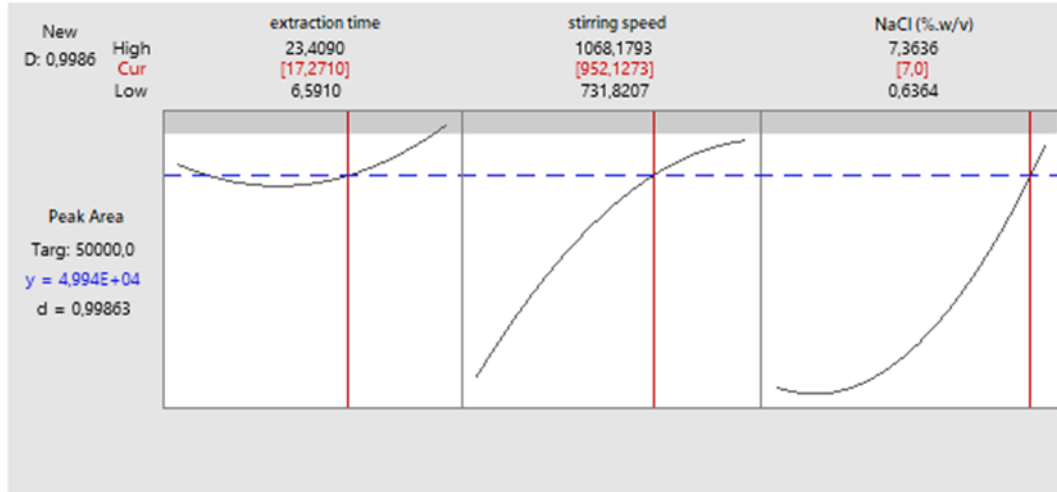
**Şekil 3.9.** Permethrinin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi, karıştırma hızı (rpm) ve NaCl (%w/v) derişimine bağı değişimini gösteren yüzey yanıt grafikleri



Şekil 3.10. Üç faktör içeren CCD tasarımında cis-permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi



Şekil 3.11. Üç faktör içeren CCD tasarımında trans-permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi



**Şekil 3.12.** Üç faktör içeren CCD tasarımında permethrin için elde edilen optimizasyon eğrisi

Permethrin HF-sıvı faz mikroekstraksiyonda etkili parametreler için, fraksiyonlu faktöriyel ve merkezi kompozit deney tasarımı sonrasında elde edilen optimum koşullar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Hollow fiber mikroekstraksiyon yönteminde optimum koşullar

Parametreler	
Ekstraksiyon zamanı (dakika)	18
Karıştırma hızı	950
pH	8.0
NaCl (% w/v)	7.0

### 3.3. Yumurtada Permethrinin Geri Alınabilirlik Çalışmaları

#### 3.3.1. HF-LPME Yöntemi

HF-sıvı faz mikroekstraksiyonda etkili parametreler optimize edildikten sonra, Bölüm 2.4.'de belirtildiği şekilde hazırlanan yumurta örneklerine 10–1000 ng g<sup>-1</sup> aralığındaki derişimlerde permethrin eklenerek geri alınabilirlik çalışmaları yapıldı. HF-mikro ekstraksiyon sonrasında cis ve trans permethrin pik alanları dikkate alınarak, yöntemin doğrusal çalışma aralığı ve tayin limitleri (LOD) bulunmuştur. Değerler Tablo 3.3.'de verilmiştir. Şekil 3.13.'de ise HF-LPME sonrası elde edilen kromatogram ve standart permethrin kromatogramı verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Yumurtada permethrinin HF-mikroekstraksiyonunda çalışma aralığı, tayin sınırları, zenginleştirme faktörleri, tekrarlanabilirlik

Permethrin	$r^2$	Lineer aralık ng g <sup>-1</sup>	LOD ng g <sup>-1</sup>	EF	Tekrarlanabilirlik (n = 5) %RSD <sup>a</sup>	Yinelenebilirlik (n = 3) %RSD <sup>a</sup>
cis-permethrin	0.9932	8–800	2.68	532	4.3	6.5
trans-permethrin	0.9904	10–200	8.35	386	7.8	11.3

LOD: En Düşük Tayin Limiti ; EF: Zenginleştirme Faktörü ; <sup>a</sup>500 ng g<sup>-1</sup>

Zenginleştirme faktörleri aşağıdaki eşitlik ile bulunmuştur.

$$E = 1/(V_o/V_a + 1/K)$$

V<sub>o</sub>: alıcı (acceptor) faz hacmi

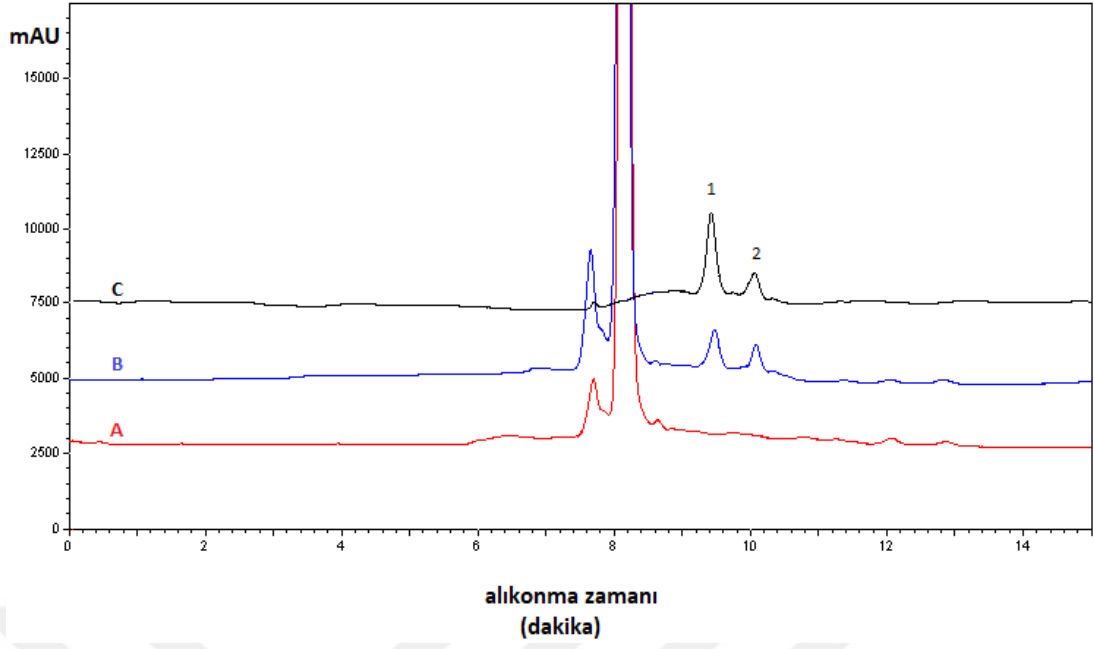
V<sub>a</sub>: örnek (donor) hacmi

K: dağılma katsayısı

Dağılma katsayısı (K) aşağıdaki eşitlik ile bulunur

$$K = C_{o,eq} / C_{a,eq}$$

C<sub>o,eq</sub> ve C<sub>a,eq</sub> sırası ile analitin alıcı ve verici fazdaki derişimidir.



**Şekil 3.13.** HF-LPME ekstraksiyonu sonrası elde edilen kromatogramlar:  
 (A) Blank yumurta örneği (B) 100 ng g<sup>-1</sup> derişiminde permethrin  
 Eklenmiş yumurta (C) 100 ng mL<sup>-1</sup> standart permethrin  
 (1) cis-permethrin (2) trans-permethrin

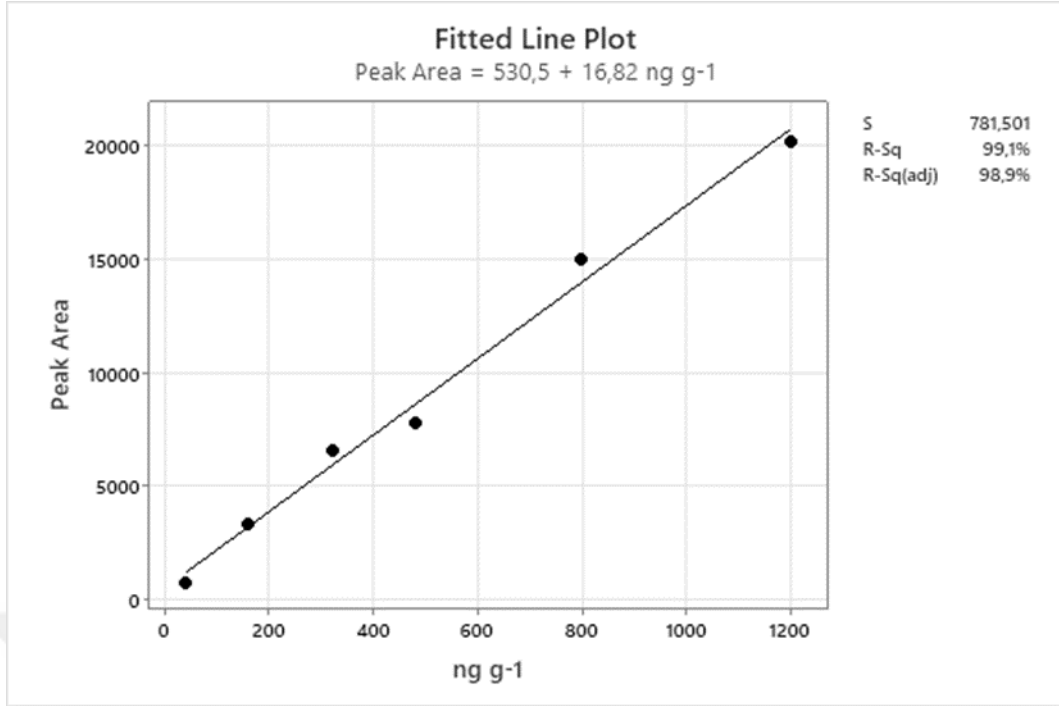
### 3.3.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (LLE)

#### I. Yöntem

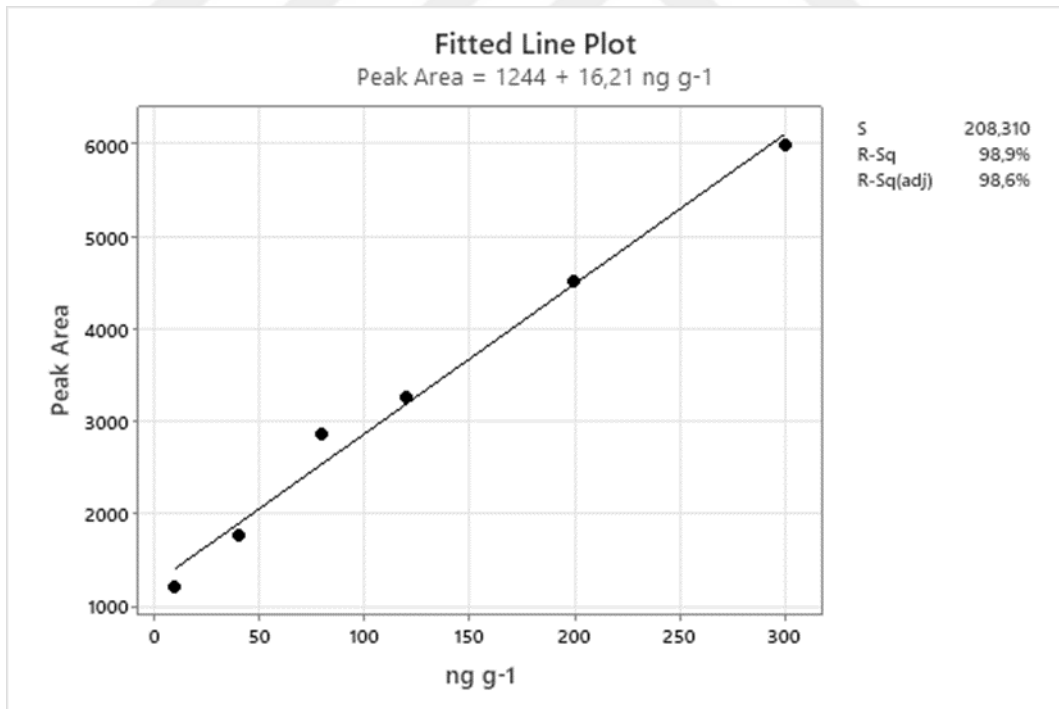
Homojenize edilen 1.0 g yumurta örneklerine standart permethrin çözeltisinden belirli miktarlarda (100-1500 ng g<sup>-1</sup>) eklendi. Bölüm 2.4.'de anlatıldığı şekilde ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyonda ön temizleme işlemi yapılmadan 1 mL hacme konsantre edilen ACN fazından 10 µL HPLC'ye enjekte edildi.

Permethrin izomerleri için elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 3.14. ve 3.15.'de verilmiştir.





Şekil 3.14. Cis-permethrin için LLE ile elde edilen kalibrasyon doğrusu

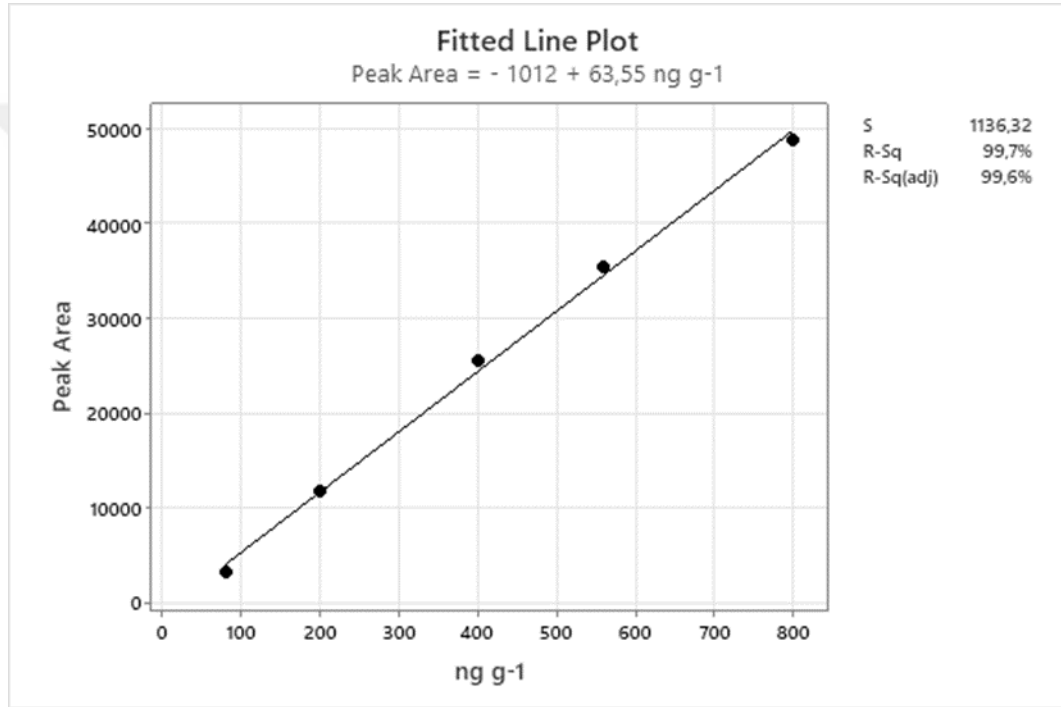


Şekil 3.15. Trans-permethrin için LLE ile elde edilen kalibrasyon doğrusu

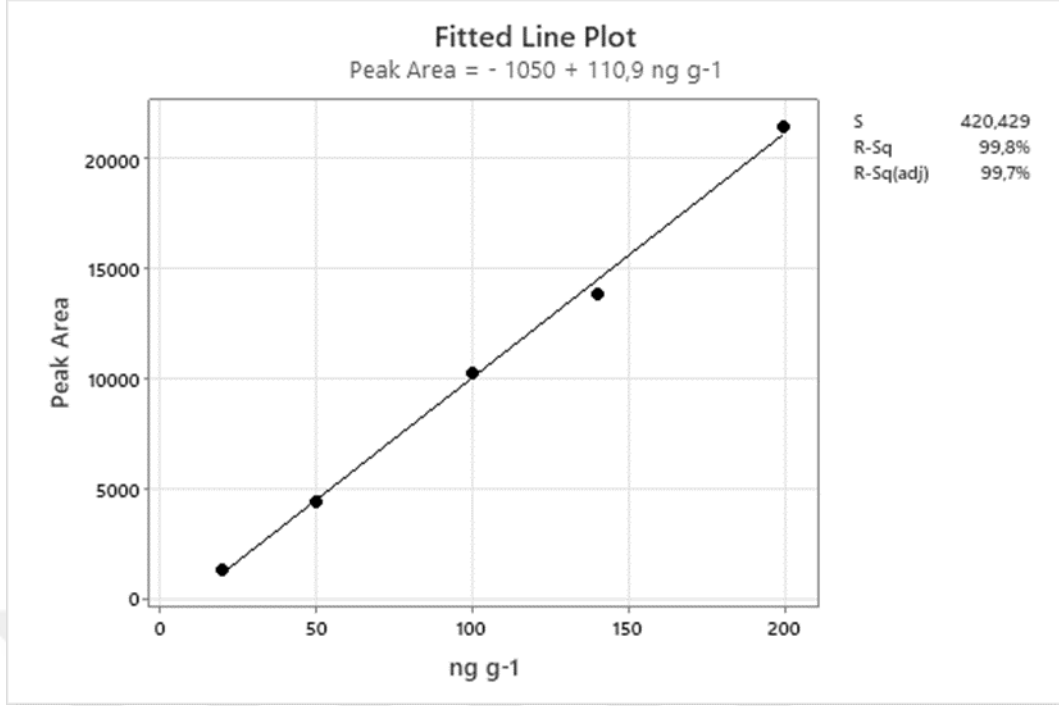
## II. Yöntem

Homojenize edilen 1.0 g yumurta örneklerine standart permethrin çözeltisinden belirli miktarlarda (100-1000 ng g<sup>-1</sup>) eklendi. Ekstraksiyonda florisil kolon ön temizleme işlemi yapıldı. Ekstraksiyon Bölüm 2.4.'de ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. 1 mL hacime konsantre edilen hekzan fazından 10 µL HPLC'ye enjekte edildi.

Permethrin izomerleri için elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 3.16. ve 3.17.'de verilmiştir.

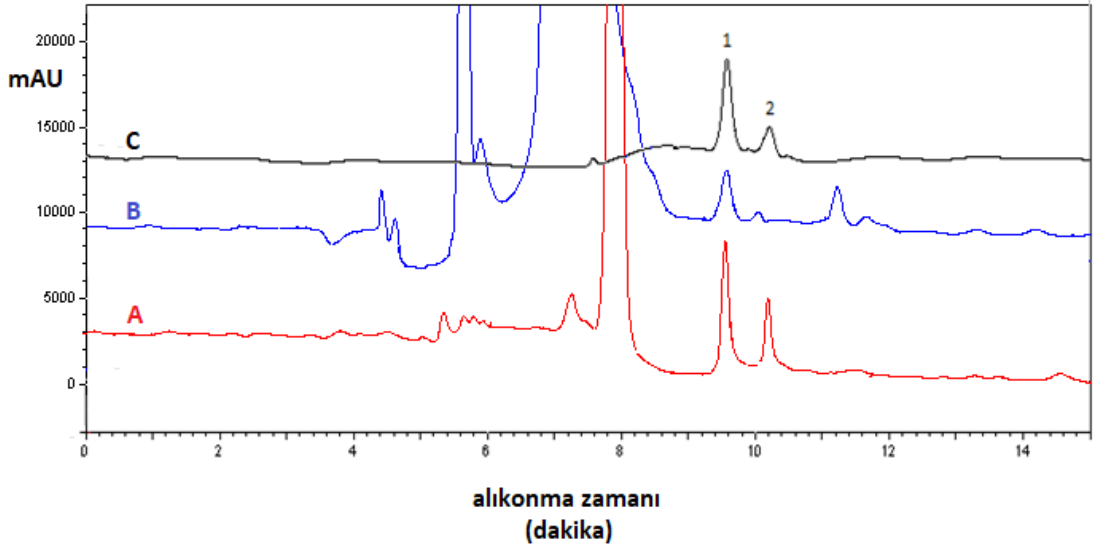


Şekil 3.16. Cis-permethrin için LLE (ön temizleme) ile elde edilen kalibrasyon doğrusu



**Şekil 3.17.** Trans-permethrin için LLE (ön temizleme) ile elde edilen kalibrasyon doğrusu

Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrasında cis ve trans permethrin pik alanları dikkate alınarak, yöntemin doğrusal çalışma aralığı ve tayin limitleri (LOD) bulunmuştur. Değerler Tablo 3.4.'de verilmiştir. Şekil 3.18.'de ise iki farklı şekilde uygulanan LLE sonrası elde edilen kromatogram ve standart permethrin kromatogramı verilmiştir.



**Şekil 3.18.** LLE sonrası elde edilen kromatogramlar: (A) 250 ng g<sup>-1</sup> derişiminde permethrin eklenmiş yumurta (florisil ön temizleme) (B) 200 ng g<sup>-1</sup> derişiminde permethrin eklenmiş yumurta (C) 100 ng mL<sup>-1</sup> standart permethrin (1) cis-permethrin (2) trans-permethrin

**Tablo 3.4.** Yumurtada permethrinin sıvı-sıvı ekstraksiyonunda çalışma aralığı, tayin sınırları, yüzde gerılınabilirlik, tekrarlanabilirlik

Permethrin	$r^2$	Lineer aralık ng g <sup>-1</sup>	LOD ng g <sup>-1</sup>	%R <sup>a</sup>	Tekrarlanabilirlik (n = 5) %RSD <sup>b,c</sup>
<b>I.Yöntem</b>					
cis-permethrin	0.9909	80–1200	139.4	11.9	7.6 <sup>b</sup>
trans-permethrin	0.9889	20–300	38.6	18.7	4.1 <sup>b</sup>
Σpermethrin	0.9921	100–1500	125.9	30.6	7.9 <sup>b</sup>
<b>II.Yöntem</b>					
cis-permethrin	0.9971	80–800	53.4	27.3	4.8 <sup>c</sup>
trans-permethrin	0.9979	20–200	11.4	43.5	2.1 <sup>c</sup>
Σpermethrin	0.9991	100–1000	40.1	70.8	3.8 <sup>c</sup>

LOD: En Düşük Tayin Limiti ; <sup>a</sup>% Gerılınabilirlik , <sup>b</sup>200 ng g<sup>-1</sup> ; <sup>c</sup>250 ng g<sup>-1</sup>

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada yumurtadan permethrinin tayininde geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyon ve sonrasında florisil kolonda ön temizleme işlemi yapılmıştır.
- I. Yöntemde ACN ile permethrinin geri alınabilirlik çalışmalarında tayin sınırları (LOD), doğrusal çalışma aralığında (cis-permethrin: 80–1200 ng g<sup>-1</sup>; trans-permethrin: 20–300 ng g<sup>-1</sup>) 139.4 ve 38.6 ng g<sup>-1</sup> bulunmuştur. Permethrin ACN ile yumurtadan % 30.6 (%RSD = 7.9) geri alınmıştır. Geri alınabilirlik oldukça düşük miktardadır. Bunda yumurtanın kompleks yapısı etkili olmuştur.
- II. Yöntemde n-hekzan ekstraksiyonu sonrası florisil kolonda ön temizleme işlemi yapılmıştır. Permethrinin geri alınabilirlik çalışmalarında tayin sınırları (LOD), doğrusal çalışma aralığında (cis-permethrin: 80–800 ng g<sup>-1</sup>; trans-permethrin: 20–200 ng g<sup>-1</sup>) 53.4 ve 11.4 ng g<sup>-1</sup> bulunmuştur. Permethrin, ön temizleme işlemi sonrası yumurtadan % 70.8 (%RSD = 3.8) geri alınmıştır.
- Yumurtadan permethrinin HF-mikroekstraksiyon yöntemi ile geri kazanılmasında optimum ekstraksiyon parametreleri belirlendi. Optimum parametreleri belirlemek için öncelikle fraksiyonlu faktöriyel (2<sup>4-1</sup>) ve merkezi kompozit deney tasarımı uygulanmıştır.
- Optimum koşullar;
  - ✓ ekstraksiyon süresi: 18 dakika
  - ✓ karıştırma hızı: 950 rpm
  - ✓ tuz derişimi (NaCl, %w/v): 7.0
  - ✓ pH: 8.0
  - ✓ alıcı faz: toluen
- Optimum ekstraksiyon koşullarında HF-LPME/HPLC yöntemi ile yumurtada permethrinin tayin sınırları (LOD), numunelerin doğrusal çalışma aralığında (cis-permethrin: 8–800 ng g<sup>-1</sup>; trans-permethrin: 10–200 ng g<sup>-1</sup>) 2.68 ve 8.35 ng g<sup>-1</sup> bulunmuştur.
- Zenginleştirme faktörleri cis-permethrin ve trans-permethrin için sırasıyla 532, 386 bulunmuştur.

- Tekrarlanabilirlik % 4.3–7.8, yinelenebilirlik ise % 6.5–11.3 aralığında bulunmuştur.
- HF-mikroekstraksiyon yöntemin doğrusal çalışma aralığı oldukça yüksek lineerlikle cis-permethrin ve trans-permethrin için sırasıyla 8–800 ng g<sup>-1</sup> ( $r^2=0.9932$ ), 10–200 ng g<sup>-1</sup> ( $r^2=0.9904$ ) olarak bulunmuştur.
- HF-sıvı faz mikroekstraksiyon yöntemi, sıvı-sıvı ekstraksiyon gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında:
  - ✓ zararlı organik kimyasalların kullanımının mikro düzeyde olması
  - ✓ ön temizleme işlemlerine gerek duyulmaması
  - ✓ zaman ve maliyet açısından uygunluğu
  - ✓ örneğin doğrudan kromatografik ortama verilmesi
  - ✓ hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesigibi birçok avantaja sahiptir
- Yöntem birçok gıda örneklerinde permethrin ve diğer pretroid pestisitlerin tayininde ön temizleme işlemlerine gerek duyulmadan, yüksek tekrarlanabilirlikle başarı ile uygulanabilmektedir.

## KAYNAKÇA

1. Bahadır, E. B., Pagano, S. M. (2014). Pestisit Analizlerinde Elektrokimyasal Biyosensörlerin Kullanımı. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 18-28
2. Kâtip, A. (2019). Bursa ili tarımsal pestisit kullanımının değerlendirilmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 197-205.
3. Pazır, F., & Turan, F. (2017). Meyve ve Sebzelerde Karşılaşılabilen bazı pestisit kalıntılarının uzaklaştırılmasında kullanılan çeşitli yöntemler. *Food and Health*, 3(3), 109-116.
4. Hayran, S., Çelik, A. D., & Aykut, G. Ü. L. Türkiye’de Sera Çiftçilerinin Pestisit Kullanımı ve Risk Algılamaları: Mersin İli Örneği. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 28(1), 31-39.
5. Aslansoy, Z. (2012). Ozonlama İşleminin Limondaki Pestisit Kalıntıları Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana
6. Elmastas, A. (2018). *Yaş meyve sebze ürünlerinin çeşitli koşullarda pestisit kalıntılarının LC-MS/MS ve GC-MS/MS ile analizlerinin kantitatif tayini*, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
7. Akdoğan, A., Divrikli, Ü., & Latif, E. L. Ç. İ. (2012). Pestisitlerin Önemi ve Ekosisteme Etkileri. *Akademik Gıda*, 10(1), 125-132.
8. Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*.
9. Tunca, S. K. Permetrin’in Tatlı Su İstakozlarında Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara

10. Garcia, E., Garcia, A., & Barbas, C. (2001). Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), 999-1004.
11. Buran, T. (2006). Organoklorlu Pestisitlerin GC-ECD ile Tayininde Clean Up Yöntemleri. Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara
12. Maule, A. L., Scarpaci, M. M., & Proctor, S. P. (2019). Urinary concentrations of permethrin metabolites in US Army personnel in comparison with the US adult population, occupationally exposed cohorts, and other general populations. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(3), 355-363.
13. Li, X., Ma, W., Li, H., Zhang, Q., & Ma, Z. (2020). Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 185-195.
14. Soysal, E. (2006). Yumurta lipidlerinden bazı klorlu insektisitlerin ayırımında a-alüminanın temizleme (clean-up) adsorbanı olarak kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırıkkale
15. Serttaş, A., Tuğba, A. Y. A. Z., Yurdakul, S., Doğan, G., Göktaş, R. K., & Civan, M. Sera Zirai Toprağında Toplam Pestisit Seviyeleri ve Sera Özellikleri ile Pestisit Seviyeleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(3), 900-910.
16. Güvendi, G. F., & Beşeren, H. Organoklorlu Pestisitlerin Yüksek Omurgalı Böbreği Üzerindeki Histopatolojik Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 26-35.
17. Dağlı, Z. (2008). Konya bölgesindeki buğdaylarda organik klorlu pestisit seviyelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya
18. Yao, J., Wang, Z., Guo, L., Xu, X., Liu, L., Xu, L., ... & Kuang, H. (2020). Advances in immunoassays for organophosphorus and pyrethroid pesticides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131, 116022.
19. Dervişoğlu, M., Osman, G. Ü. L., Yazıcı, F., & Aydemir, O. (2013). Süt ve süt



- ürünlerinde organik klorlu pestisit varlığı. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (13).
20. Çeliker, A. (1992). Ülkemizde Kullanılan Pestisitlere İlişkin Bir İnfomasyon Veri Tabanı (Pestox) Geliştirilmesi Üzerinde Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara
21. Bekbölek, M. Pestisit Kalıntı Analiz Yöntemlerinin Değerlendirilmesi. *Gıda*, 15(1).
22. LeDoux, M. (2011). Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of chromatography A*, 1218(8), 1021-1036.
23. Erdoğan, B. Y. (2010). Samsun'da Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Sağlığa ve Çevreye Etkileri/The Health and Environmental Effects Of The Pesticides Commonly Used In Samsun. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 19(2), 28-35.
24. Kurutaş, E. B., & Kılınç, M. (2003). Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(3).
25. Aslantaş, Ş. (2022). Limonlarda pestisit kalıntı miktarlarının GC-MS/MS ve LC-MS/MS ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çorum
26. Aktaş, Ş. (2021). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile biberlerde pestisit tayini. Yüksek Lisans Tezi. *Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Siirt
27. Hasan, G. A., Das, A. K., & Satter, M. A. (2022). Multi residue analysis of organochlorine pesticides in fish, milk, egg and their feed by GC-MS/MS and their impact assessment on consumers health in Bangladesh. *NFS Journal*, 27, 28-35.
28. Ahmad, R., Nida'M, S., & Estaitieh, H. (2010). Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. *Chemosphere*, 78(6), 667-671.
29. Luzardo, O. P., Rodríguez-Hernández, Á., Quesada-Tacoronte, Y., Ruiz-Suárez, N., Almeida-González, M., Henríquez-Hernández, L. A., ... & Boada,

- L. D. (2013). Influence of the method of production of eggs on the daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants: an independent study in the Canary Islands (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 60, 455-462.
30. Canbay, H. S., Öğüt Serdal., Yilmazer, M., & Küçüköner, E. (2012). Seçilen bazı pestisitlerin bal örneklerinde analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(1), 1-5.
31. Hepsağ, F. (2019). Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen domateslerde pestisit kalıntı düzeylerinin tespiti ve validasyon çalışması. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5(1), 76-89.
32. Yüccer, M., Temizkan, R., & Caner, C. (2012). Fonksiyonel gıda olarak yumurta: bileşenleri ve fonksiyonel özellikleri. *Akademik Gıda*, 10(4), 70-76.
33. Çelebi, Ş., & Karaca, H. (2006). Yumurtanın besin değeri, kolesterol içeriği ve yumurtayı n-3 yağ asitleri bakımından zenginleştirmeye yönelik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(2), 257-265.
34. Song, N. E., Lee, J. Y., Mansur, A. R., Jang, H. W., Lim, M. C., Lee, Y., ... & Nam, T. G. (2019). Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 298, 125050.
35. Monajemzadeh, F., Mohebbi, A., Farajzadeh, M. A., Nemati, M., & Mogaddam, M. R. A. (2021). Dispersive solid phase extraction combined with in syringe deep eutectic solvent based dispersive liquid-liquid microextraction for determination of some pesticides and their metabolite in egg samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103696.
36. Tan, G. H., & Chai, M. K. (2011). Sample preparation in the analysis of pesticides residue in food by chromatographic techniques. *IntechOpen*
37. Keleş, F. (1987). HPLC ve Gıdalardaki Uygulama Alanları. *Gıda*, 12(5).
38. Sezen, H. (2010). *Tiyokolşikosid Tayininde Hızlı Sıvı Kromatografisi (UPLC) Yönteminin Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa )
39. Bengü, A. Ş. HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları. *Bingöl Üniversitesi Sağlık*

*Dergisi*, 2(1), 64-69.

40. Eyüpoğlu, O. E. (2012). *HPLC analizinde çakışan pik veren bileşiklerin DAD, on-line FRAP ve peroksinitritle reaksiyon kullanılarak ayırt edilmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon).
41. Özcan, E. (2013). *Farmasötik Analiz İçin HPLC'den UPLC'ye Analitik Yöntem Transferi* (Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir)
42. Şenol, O., & KADIOĞLU, Y. (2010). *Tiyamin ve piridoksin etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda HPLC yöntemi ile analizi* (Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum).
43. Doğan, F. N., & Karpuzcu, M. E. (2019). Türkiye'de tarım kaynaklı pestisit kirliliğinin durumu ve alternatif kontrol tedbirlerinin incelenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(6), 734-747.
44. Tiryaki, O., Canhilal, R., & Horuz, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(2), 154-169.
45. Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., & Burçak, A. (2005). Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği, 6. Teknik Kongresi*
46. Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., & Megharaj, M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of The Total Environment*, 711, 134612.
47. Yiğit, N., Öktem, A., & Yentür, G. (2012). Bazı meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının analizinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çoklu kalıntı analiz metodunun geliştirilmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 52(4), 375-394.
48. Song, N. E., Lee, J. Y., Mansur, A. R., Jang, H. W., Lim, M. C., Lee, Y., ... & Nam, T. G. (2019). Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 298, 125050.
49. Alver, E., Demirci, A., & Özcimder, M. (2013). Oyuk (hollow) fiber sıvı faz mikroekstraksiyon. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,

- 17(1), 17-26.
50. Hidayah, N. N., & Abidin, S. Z. (2018). The evolution of mineral processing in extraction of rare earth elements using liquid-liquid extraction: A review. *Minerals Engineering*, 121, 146-157.
51. Hasdemir, İ. M., Bilgin, M., Aydın, A., & Dramur, U. (2011). Dolgulu Bir Ekstraksiyon Kolonunun Performansı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3), 1163-1167.
52. Dikman, E. (1985). Enstrümental analiz. Çağlayan Kitabevi.
53. Targuma, S., Njobeh, P. B., & Ndungu, P. G. (2021). Current applications of magnetic nanomaterials for extraction of mycotoxins, pesticides, and pharmaceuticals in food commodities. *Molecules*, 26(14), 4284.
54. Bagheri, A. R., & Haddad, P. R. (2021). Applications of covalent organic frameworks in the extraction of pesticides from environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 462612.
55. Mahdavi, V., Eslami, Z., Molaee-Aghaee, E., Peivasteh-Roudsari, L., Sadighara, P., Fakhri, Y., Ravanlou, A. A. (2022). Evaluation of pesticide residues and risk assessment in apple and grape from western Azerbaijan Province of Iran. *Environmental Research*, 203, 111882.
56. Timofeeva, I., Shishov, A., Kanashina, D., Dzema, D., 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.
57. Canlıdınç, R. S. Grafen/Grafen oksit temelli adsorbanların katı faz özütme tekniğinde kullanılabilirliği hakkında literatür araştırması. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 26(7), 1319-1327.
58. Turan, K., Canlıdınç, R. S., & Kalfa, O. M. (2019). Eser Element Zenginleştirilmesinde Kullanılmak Üzere Baskılama Tekniği ile Yeni Katı Fazların Hazırlanması. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 192-209
59. Sandoval Riofrio, M. A. (2017). Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid

Phase Extraction. Doktora Tezi. University of Leicester

60. Kaw, H. Y., et al. (2021). Gas-liquid microextraction coupled with magnetic-assisted dispersive solid-phase extraction clean-up for multi-residue pesticide analysis in fatty foods of animal origin. *LWT*, 137, 110448.
61. Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Cui, J. et al. (2011). Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. *Food Chemistry*, 127 (2), 855-865.
62. Hoff, R. B., & Pizzolato, T. M. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, 83-96.
63. Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 151-162.
64. Wianowska, D., Gil, M. (2019). New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 29-51.
65. Ramos, L. (2019). Use of new tailored and engineered materials for matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 751-758.
66. Kemmerich, M., Demarco, M., Bernardi, G., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R. (2020). Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. *Journal of Chromatography A*, 1612, 460640.
67. Abhilash, P. C., Singh, V., Singh, N. (2009). Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC–ECD. *Food Chemistry*, 113 (1), 267-271.
68. Ayhan, Z., & Ayşegül, D. Ö. Ş. (2004). Gıdalarda katı faz mikroekstraksiyon tekniği ile flavor analizi. *Gıda*, 29(2).
69. Alver, E., Demirci, A., & Özcimder, M. (2012). *Microextraction methods*. J

*Eng Nat Sci*, 30, 75-90.

70. Dadalı, C., & Elmacı, Y. (2017). Gıdalarda Uçucu Bileşen Analizinde Katı Faz Mikroekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonunda Yanıt Yüzey Yönteminin Kullanılması. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(10), 1173-1183.
71. Dalcı, B. K. (2014). Sulu Örneklerde Eser Düzeydeki Ağır Metal İyonlarının Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile Tayini İçin Katılaştırılmış Yüzen Organik Damla Mikroekstraksiyon Tekniği ile Önderiştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara
72. Da Silva Sousa, J., do Nascimento, H. O., de Oliveira Gomes, H., & do Nascimento, R. F. (2021). Pesticide residues in groundwater and surface water: recent advances in GC-MS-SPME/SPE methods for multiclass analysis. *Microchemical Journal*, 106359.
73. Domínguez, I., González, R. R., Liébanas, F. J. A., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2016). Automated and semi-automated extraction methods for GC-MS determination of pesticides in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 12, 1-12.
74. Li, W. K., Xue, Y. J., Fu, X. Y., Ma, Z. Q., Feng, J. T. (2021). Covalent organic framework reinforced hollow fiber for solid-phase microextraction and determination of pesticides in foods. *Food Control*, 108587.
75. Menezes Filho, A., dos Santos, F. N., de Paula Pereira, P. A. (2010). Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta*, 81 (1-2), 346-354.
76. Hasan, C. K., Ghiasvand, A., Lewis, T. W., Nesterenko, P. N., & Paull, B. (2020). Recent advances in stir-bar sorptive extraction: Coatings, technical improvements, and applications. *Analytica Chimica Acta*.
77. Kawaguchi, M., Takatsu, A., Ito, R., & Nakazawa, H. (2013). Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 280-293.
78. David, F., Ochiai, N., & Sandra, P. (2019). Two decades of stir bar sorptive

- extraction: A retrospective and future outlook. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 102-111.
79. Gilart, N., Marcé, R. M., Borrull, F., & Fontanals, N. (2014). New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54, 11-23.
80. Camino-Sánchez, F. J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., & Vilchez, J. L. (2014). Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, 130, 388-399.
81. Fenik, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (6), 814-826.
82. Sandra, P., Tienpont, B., David, F. (2003). Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000 (1-2), 299-309.
83. Blasco, C., Font, G., Picó, Y. (2002). Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 970 (1-2), 201-212.
84. Kokosa, J. M. (2019). Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 238-247.
85. Herce-Sesa, B., López-López, J. A., & Moreno, C. (2021). Advances in ionic liquids and deep eutectic solvents-based liquid phase microextraction of metals for sample preparation in Environmental Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116398.
86. Basheer, C., Kamran, M., Ashraf, M., & Lee, H. K. (2019). Enhancing liquid-phase microextraction efficiency through chemical reactions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 426-433.
87. Chormey, D. S., Zaman, B. T., Kasa, N. A., & Bakirdere, S. (2020). Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples. *TrAC Trends in Analytical*

Chemistry, 128, 115917.

88. Ming-Jie, L. I., ZHANG, H. Y., Xiao-Zhe, L. I. U., Chun-Yan, C. U. I., & Zhi-Hong, S. H. I. (2015). Progress of extraction solvent dispersion strategies for dispersive liquid-liquid microextraction. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43(8), 1231-1240.
89. Rykowska, I., Ziemblińska, J., & Nowak, I. (2018). Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review *Journal of molecular liquids*, 259, 319-339.
90. Pacheco-Fernández, I., González-Martín, R., e Silva, F. A., Freire, M. G., & Pino, V. (2021). Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media. A review. *Analytica Chimica Acta*, 1143, 225-249.
91. Ahmad, W., Al-Sibaai, A. A., Bashammakh, A. S., Alwael, H., & El-Shahawi, M. S. (2015). Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 72, 181-192.
92. Sajid, M., & Alhooshani, K. (2018). Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 108, 167-182.
93. Farajzadeh, M. A., Mohebbi, A., Fouladvand, H., & Mogaddam, M. R. A. (2020). A new and facile method for preparation of amorphous carbon nanoparticles and their application as an efficient and cheap sorbent for the extraction of some pesticides from fruit juices. *Microchemical Journal*, 155, 104795.
94. Jouyban, A., Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R. A. (2020). In matrix formation of deep eutectic solvent used in liquid phase extraction coupled with solidification of organic droplets dispersive liquid-liquid microextraction; application in determination of some pesticides in milk samples. *Talanta*, 206, 120169.
95. Mansour, F. R., & Khairy, M. A. (2017). Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography B*, 1061, 382-391.



96. Kailasa, S. K., Koduru, J. R., Park, T. J., Singhal, R. K., & Wu, H. F. (2020). Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, e00113.
97. Tegladza, I. D., Qi, T., Chen, T., Alorku, K., Tang, S., Shen, W., ... & Lee, H. K. (2020). Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review. *Journal of hazardous materials*, 393, 122403.
98. Kokosa, J. M. (2015). Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 194-204.
99. Isaac Delove Tegladzaa et.al. (2020). Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122403.
100. Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2002). Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(1), 54-64.
101. Pano-Farias, N. S., Ceballos-Magaña, S. G., Muñoz-Valencia, R., Jurado, J. M., Alcázar, Á., & Aguayo-Villarreal, I. A. (2017). Direct immersion single drop micro-extraction method for multi-class pesticides analysis in mango using GC-MS. *Food Chemistry*, 237, 30-38.
102. Zhao, E., Han, L., Jiang, S., Wang, Q., Zhou, Z. (2006). Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. *Journal of Chromatography A*, 1114 (2), 269-273.
103. Chormey, D. S., Zaman, B. T., Kasa, N. A., & Bakirdere, S. (2020). Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 128, 115917.
104. Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2007). Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 70(2), 195-228.
105. Esrafil, A., Baharfar, M., Tajik, M., Yamini, Y., & Ghambarian, M. (2018). Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in*

*Analytical Chemistry*, 108, 314-322.

106. Dadfarnia, S., & Shabani, A. M. H. (2010). Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals. A review. *Analytica Chimica Acta*, 658(2), 107-119.
107. Sun, X., Zhu, F., Xi, J., Lu, T., Liu, H., Tong, Y., Ouyang, G. (2011). Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of organophosphorus pesticides residues in fish tissue by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Marine pollution bulletin*, 63 (5-12), 102-107.
108. Wang, J., Du, Z., Yu, W., Qu, S. (2012). Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1247, 10-17.
109. Leong, M. I., Fuh, M. R., & Huang, S. D. (2014). Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1335, 2-14.
110. Hu, B., He, M., Chen, B., & Xia, L. (2013). Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 14-30.
111. Leong MI, Huang SD., "Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples", *J Chromatogr A*, 1216: 7645-7650, (2009).
112. Hou, L., & Lee, H. K. (2004). Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1038(1-2), 37-42.
113. Li, S., Yang, X., Hu, L., Cui, X., Zhang, S., Lu, R., Gao, H. et. al. (2014). Directly suspended-solidified floating organic droplets for the determination of fungicides in water and honey samples. *Analytical Methods*, 6 (18), 7510-7517.
114. Yang, M., Zhang, P., Hu, L., Lu, R., Zhou, W., Zhang, S., Gao, H. (2014). Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid

chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *Journal of Chromatography A*, 1360, 47-56.

115. Wang, H., Ding, J., & Ren, N. (2016). Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 197-208.
116. Llompart, M., Celeiro, M., & Dagnac, T. (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 136-150.
117. Ekezie, F. G. C., Sun, D. W., & Cheng, J. H. (2017). Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 160-172.
118. Kusuma, H. S., & Mahfud, M. (2016). Preliminary study: Kinetics of oil extraction from sandalwood by microwave-assisted hydrodistillation. In IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*. 128 (1), 012009.
119. Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Dagnac, T., & Llompart, M. (2015). Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 119-143.
120. Satpathy, G., Tyagi, Y. K., Gupta, R. K. (2011). A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)-retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS). *Food Chemistry*, 127 (3), 1300-1308.
121. Fang, G., Lau, H. F., Law, W. S., Li, S. F. Y. (2012). Systematic optimisation of coupled microwave-assisted extraction-solid phase extraction for the determination of pesticides in infant milk formula via LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 134 (4), 2473-2480.
122. Gros, Q., Duval, J., West, C., & Lesellier, E. (2021). On-line supercritical fluid

extraction-supercritical fluid chromatography (SFE-SFC) at a glance: a coupling story. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116433.

123. Hercegová, A., Dömötöröová, M., & Matisova, E. (2007). Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *Journal of Chromatography A*, 1153(1-2), 54-73.
124. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. *A review of the past two decades*
125. Moore, O. A., Gao, Y., Chen, A. Y., Brittain, R., Chen, Y. C. (2016). The extraction, anticancer effect, bioavailability, and nanotechnology of baicalin. *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 2 (1), 1-5.
126. Çolak, N., & Tülek, Y. (2003). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu. *Gıda*, 28(3).
127. Wigfield, Y. Y., Selwyn, J., Khan, S., & McDowell, R. (1996). Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of twenty-two organochlorine pesticides from eggs. *Chemosphere*, 32 (5), 841-847.
128. Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Knoll, F. R., Apon, B. M. (2004). Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1048 (2), 153-159.
129. Hoff, R. B., & Pizzolato, T. M. (2018). Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, 83-96.
130. Chung, S. W., & Chen, B. L. (2011). Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5555-5567.
131. Mendiola, J. A., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 234-246.
132. Andreu, V., & Picó, Y. (2019). Pressurized liquid extraction of organic

contaminants in environmental and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 709-721.

133. Antunes, P., Viana, P., Vinhas, T., Capelo, J. L., Rivera, J., & Gaspar, E. M. (2008). Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) of dioxin-furans and dioxin-like PCBs from environmental samples. *Talanta*, 75(4), 916-925.
134. Choi, M., Lee, I. S., Jung, R. H. (2016). Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 205, 1-8.
135. Khan, Z., Kamble, N., Bhongale, A., Girme, M., Chauhan, V. B., Banerjee, K. (2018). Analysis of pesticide residues in tuber crops using pressurised liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 241, 250-257.
136. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 132.
137. D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. *J. Chromatogr. A*, 1072 (2005) 55.
138. S.A.Y. Chau, B.K. Afghan, *Analysis of Pesticides in Water*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 1982.