

**Bu kitaba sığmayan  
daha neler var!**



Karekodu okutun, bu kitapla ilgili EBA içeriklerine ulaşın!

**ÖDS**

**ÖĞRENCİ/ÖĞRETMEN  
DESTEK SİSTEMİ**

<https://ods.eba.gov.tr>

- Konu Anlatımlı Ders Videoları
- Soru Çözüm Videoları
- Ders Anlatım Videoları
- Çoktan Seçmeli Sorular



Kişiselleştirilmiş Öğrenme ve Raporlama

Animasyonlar, 3B Modeller, Simülasyon ve Oyunlar

Paylaşım ve İş birliği

Ortak / Özel Takvim

**eBa**  
[www.eba.gov.tr](http://www.eba.gov.tr)



40181 700982

**BU DERS KİTABI MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞINCA  
ÜCRETSİZ OLARAK VERİLMİŞTİR.  
PARA İLE SATILAMAZ.**

ISBN: 978-975-11-6934-1

Bandrol Uygulamasına İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelik'in 5'inci Maddesinin İkinci Fıkrası Çerçevesinde Bandrol Taşınması Zorunlu Değildir.

LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

KALINTI ANALİZLERİ

11-12 DERS MATERYALI

MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ  
LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

# KALINTI ANALİZLERİ

11-12  
DERS MATERYALI





**MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ**

**LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI**  
**KALINTI ANALİZLERİ**

**Ders Materyali**

**YAZARLAR**

**Ali SÖNMEZ**  
**Ahmet YÜKSEL**  
**Tuğba GÜL**



MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI YAYINLARI .....: 8410  
YARDIMCI VE KAYNAK KİTAPLAR DİZİSİ .....: 2302

Her hakkı saklıdır ve Millî Eğitim Bakanlığına aittir. Ders materyalinin metin, soru şekilleri kısmen de olsa hiçbir surette alınıp yayımlanamaz.

#### HAZIRLAYANLAR

<b>Dil Uzmanı</b>	Hülya BAŞTÜRK
<b>Program Geliştirme Uzmanı</b>	Ali DOĞAN
<b>Rehberlik ve Psikolojik Danışma Uzmanı</b>	Fatih DÜĞENCİ
<b>Ölçme ve Değerlendirme Uzmanı</b>	Arzu DURSUN URGUN
<b>Görsel Tasarım Uzmanı</b>	Hüsniye Cevahir ÖZDOĞAN KURŞUN

ISBN: 978-975-11-6934-1

Millî Eğitim Bakanlığının 24.12.2020 gün ve 18433886 sayılı oluru ile  
Meslekî ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğüne ders materyali olarak hazırlanmıştır.



## İSTİKLÂL MARŞI

Korkma, sönmez bu şafaklarda yüzen al sancak;  
Sönmeden yurdumun üstünde tüten en son ocak.  
O benim milletimin yıldızıdır, parlayacak;  
O benimdir, o benim milletimindir ancak.

Çatma, kurban olayım, çehreni ey nazlı hilâl!  
Kahraman ırkıma bir gül! Ne bu şiddet, bu celâl?  
Sana olmaz dökülen kanlarımız sonra helâl.  
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl.

Ben ezelden beridir hür yaşadım, hür yaşarım.  
Hangi çılgın bana zincir vuracakmış? Şaşarım!  
Kükremiş sel gibiyim, bendimi çiğner, aşarım.  
Yırtarım dağları, enginlere sığmam, taşarım.

Garbın âfâkını sarmışsa çelik zırhlı duvar,  
Benim iman dolu göğsüm gibi serhaddim var.  
Ulusun, korkma! Nasıl böyle bir imanı boğar,  
Medeniyet dediğin tek dişi kalmış canavar?

Arkadaş, yurduma alçakları uğratma sakın;  
Siper et gövdeni, dursun bu hayâsızca akın.  
Doğacaktır sana va'dettiği günler Hakk'ın;  
Kim bilir, belki yarın, belki yarından da yakın.

Bastığın yerleri toprak diyerek geçme, tanı:  
Düşün altındaki binlerce kefensiz yatanı.  
Sen şehit oğlusun, incitme, yazıktır, atanı:  
Verme, dünyaları alsan da bu cennet vatanı.

Kim bu cennet vatanın uğruna olmaz ki feda?  
Şüheda fışkıracak toprağı sıksan, şüheda!  
Cânı, cânânı, bütün varımı alsın da Huda,  
Etmesin tek vatanımdan beni dünyada cüda.

Ruhumun senden İlâhî, şudur ancak emeli:  
Değmesin mabedimin göğsüne nâmahrem eli.  
Bu ezanlar -ki şehadetleri dinin temeli-  
Ebedî yurdumun üstünde benim inlemeli.

O zaman vecd ile bin secde eder -varsa- taşım,  
Her cerâhamdan İlâhî, boşanıp kanlı yaşım,  
Fışkırır ruh-ı mücerret gibi yerden na'sım;  
O zaman yükselerek arşa değer belki başım.

Dalgalan sen de şafaklar gibi ey şanlı hilâl!  
Olsun artık dökülen kanlarımın hepsi helâl.  
Ebediyyen sana yok, ırkıma yok izmihlâl;  
Hakkıdır hür yaşamış bayrağımın hürriyyet;  
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl!

**Mehmet Âkif Ersoy**

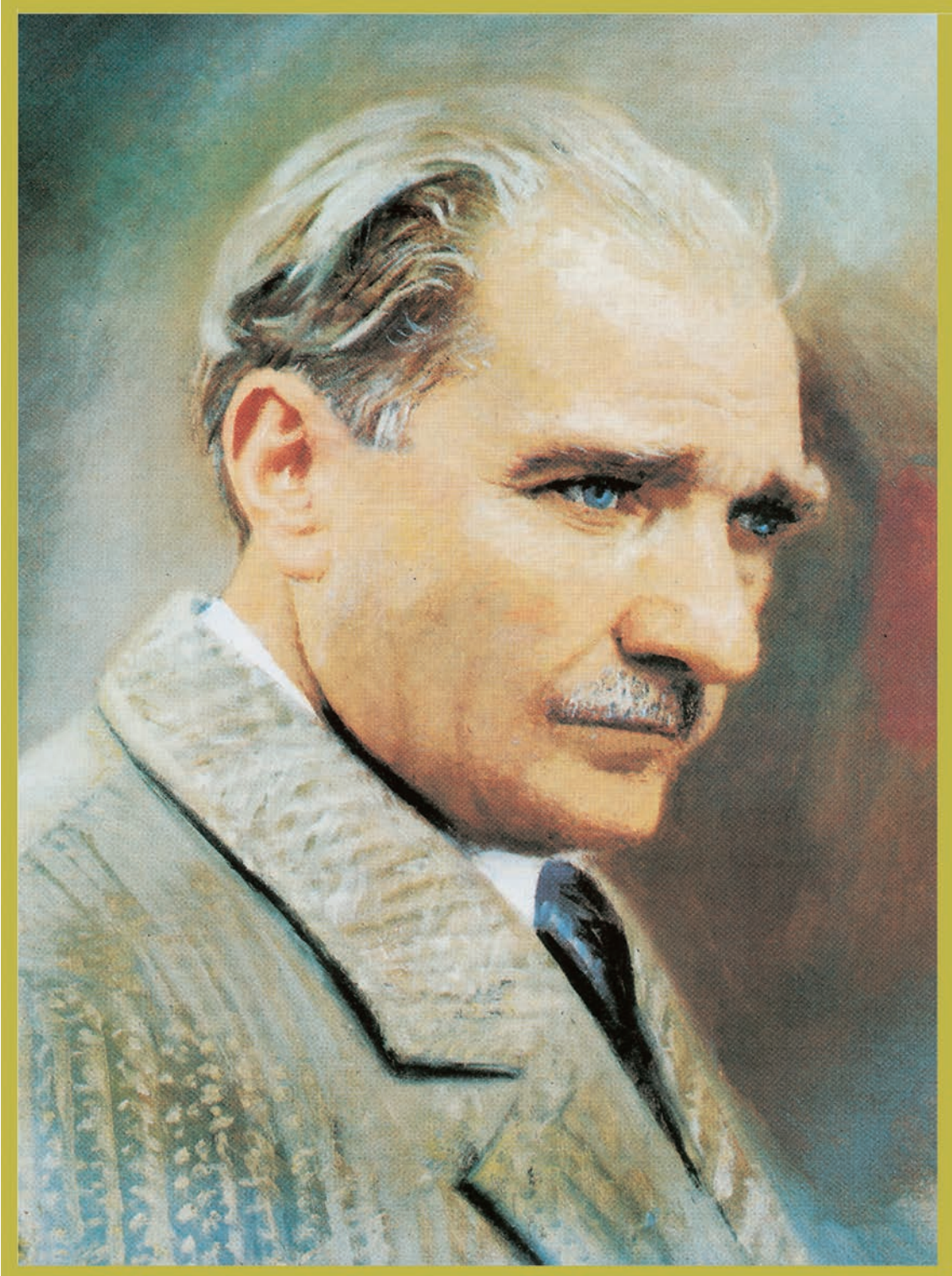
## GENÇLİĞE HİTABE

Ey Türk gençliği! Birinci vazifen, Türk istiklâlini, Türk Cumhuriyetini, ilelebet muhafaza ve müdafaa etmektir.

Mevcudiyetinin ve istikbalinin yegâne temeli budur. Bu temel, senin en kıymetli hazinendir. İstikbalde dahi, seni bu hazineden mahrum etmek isteyecek dâhilî ve hâricî bedhahların olacaktır. Bir gün, istiklâl ve cumhuriyeti müdafaa mecburiyetine düşersen, vazifeye atılmak için, içinde bulunacağın vaziyetin imkân ve şeraitini düşünmeyeceksin! Bu imkân ve şerait, çok namüsaît bir mahiyette tezahür edebilir. İstiklâl ve cumhuriyetine kastedecek düşmanlar, bütün dünyada emsali görülmemiş bir galibiyetin mümessili olabilirler. Cebren ve hile ile aziz vatanın bütün kaleleri zapt edilmiş, bütün tersanelerine girilmiş, bütün orduları dağıtılmış ve memleketin her köşesi bilfiil işgal edilmiş olabilir. Bütün bu şeraitten daha elîm ve daha vahim olmak üzere, memleketin dâhilinde iktidara sahip olanlar gaflet ve dalâlet ve hattâ hıyanet içinde bulunabilirler. Hattâ bu iktidar sahipleri şahsî menfaatlerini, müstevlîlerin siyasî emelleriyle tevhit edebilirler. Millet, fakr u zaruret içinde harap ve bîtap düşmüş olabilir.

Ey Türk istikbalinin evlâdı! İşte, bu ahval ve şerait içinde dahi vazifen, Türk istiklâl ve cumhuriyetini kurtarmaktır. Muhtaç olduğun kudret, damarlarındaki asil kanda mevcuttur.

Mustafa Kemal Atatürk



MUSTAFA KEMAL ATATÜRK





# İÇİNDEKİLER

<b>DERS MATERYALİNİN TANITIMI</b>	12
<b>LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA ALINACAK İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ ÖNLEMLERİ</b>	14
<b>1. ÖĞRENME BİRİMİ: PESTİSİT ANALİZLERİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA</b>	15
<b>1.1. PESTİSİTLER</b>	16
1.1.1. Pestisitlerin Özellikleri	16
1.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması	16
1.1.3. Pestisitlerin Kullanım Alanları	18
1.1.4. Pestisit Kullanımının Yararları ve Zararları	18
1. UYGULAMA	20
<b>1.2. HOMOJENİZASYON (ÖRNEK HAZIRLAMA)</b>	21
1.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Araç Gereç	21
1.2.2. İşlem Basamakları	21
2. UYGULAMA	22
<b>1.3. EKSTRAKSİYON</b>	23
1.3.1. Orta veya Yüksek Su İçeriğine Sahip Numunelerde (Taze Sebze ve Meyveler) Ekstraksiyon İşlemi	23
1.3.2. Kuru Numunelerde (Su İçeriği %10'dan Az) Ekstraksiyon İşlemi	24
1.3.3. Yağlı Numunelerde (Yağ İçeriği %2'den Fazla) Ekstraksiyon İşlemi	24
3. UYGULAMA	26
4. UYGULAMA	27
5. UYGULAMA	28
<b>1.4. TEMİZLEME (CLEAN - UP)</b>	29
1.4.1. Temizleme (Clean-Up) (Klin ap) İşlemleri	29
1.4.2. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar	30
1.4.3. İşlemin Yapılışı	30
6. UYGULAMA	31
<b>ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME</b>	32
<b>2. ÖĞRENME BİRİMİ: İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ</b>	33
<b>2.1. İMMÜNOLOJİK TESTLER</b>	34
2.1.1. İmmünojenik Yöntemlerin Temel Prensipleri	35
1. UYGULAMA	37
<b>2.2. İMMÜNSENSÖRLER (BİYOSENSÖRLER)</b>	40
2.2.1. Pestisit Ölçümünde Kullanılan Biyosensör Tipleri	42
2.2.2. Biyoalgılama Materyallerine Göre Biyosensörler	42
2.2.3. Dönüştürme Araçlarına Göre Biyosensörler	44
2. UYGULAMA	47

# İÇİNDEKİLER

<b>2.3. İMMUNOKROMATOĞRAFI</b>	<b>48</b>
2.3.1. İmmünokromatografik Yöntemlerin Prensi ve Kullanım Alanları	48
2.3.2. İmmünokromatografik Kart Testlerin Yapısı	48
2.3.3. İmmünokromatografik Kart Testlerin Çalışma Prensi	50
2.3.4. İmmünokromatografik Kart Testlerin Kullanımı	51
3. UYGULAMA	52
<b>2.4. İMMÜN - İŞARETLEME</b>	<b>54</b>
2.4.1. İşaretlenmiş Antikor veya Antijenle Yapılan Testler	54
<b>ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME</b>	<b>56</b>
<b>3. ÖĞRENME BİRİMİ: SPEKTRİYOMETRİK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ</b>	<b>57</b>
<b>3.1. SPEKTRİYOMETRİK YÖNTEMLER</b>	<b>58</b>
3.1.1. Spektrofotometrenin Kullanılması	58
3.1.2. Kalibrasyon Eğrisi Hazırlama	59
3.1.3. Kalibrasyon Eğrisini Okuma	59
1. UYGULAMA	60
<b>3.2. SU, TOPRAK GİBİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE KARBAMAT PESTİSİTLERİN TAYİNİ</b>	<b>61</b>
3.2.1. Su, Toprak Gibi Çevresel Örneklerde Karbamat Pestisitlerin Tayini	61
3.2.2. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar	62
3.2.3. Numune Hazırlama ve Analizin Yapılışı	62
2. UYGULAMA	63
3. UYGULAMA	65
<b>3.3. SPEKTRİYOMETRİK YÖNTEMLERİN TARAMA TESTİ OLARAK KULLANIMI</b>	<b>67</b>
3.3.1. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar	67
3.3.2. Analizin Yapılışı	67
4. UYGULAMA	68
<b>ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME</b>	<b>70</b>
<b>4. ÖĞRENME BİRİMİ: KROMATOĞRAFIK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ</b>	<b>71</b>
<b>4.1. KROMATOĞRAFIK YÖNTEMLER</b>	<b>72</b>
4.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Çalışma Prensi	72
4.1.2. Kromatografik Yöntem Çeşitleri ve Kullanılan Cihazlar	73
1. UYGULAMA	74
<b>4.2. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (TLC)</b>	<b>75</b>
4.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine Hazırlık	75
4.2.2. İnce Tabaka Kromatografisinde Analiz	76

# İÇİNDEKİLER

4.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi ile İndikatörlerin Analizi	76
4.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi Hesaplamaları	78
2. UYGULAMA	79
<b>4.3. GAZ KROMATOĞRAFİSİ (GC)</b>	<b>80</b>
4.3.1. Gaz kromatografisi (GC) Yönteminin Çalışma Prensibi, Kullanım Alanları ve Gaz kromatografisini Oluşturan Bölümler	80
4.3.2. Gaz Kromatografisi (GC) Uygulamaları İçin Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) İşlemleri	81
4.3.3. Gaz Kromatografisi (GC) Analiz Yöntemi	81
4.3.4. Gaz Kromatografisi (GC) Cihazının Kullanımı ve Temizliği	82
3. UYGULAMA	84
<b>4.4. SIVI KROMATOĞRAFİSİ (SC)</b>	<b>85</b>
4.4.1. Sıvı Kromatografisinin Çalışma Prensibi ve Uygulama Alanları	85
4.4.2. Numune Hazırlığı, Temizliği (Clean-Up) İşlemleri	86
4. UYGULAMA	87
<b>4.5. KÜTLE SPEKTROMETRE (MS)</b>	<b>88</b>
4.5.1. Kütle Spektrometri Yönteminin Çalışma Prensibi, Kullanım Alanları ve Kütle Spektrometresini Oluşturan Bölümler	88
4.5.2. MS Uygulamaları İçin Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) İşlemleri	89
4.5.3. MS Analiz Yöntemi	89
4.5.4. MS Cihazının Kullanımı ve Temizliği	89
5. UYGULAMA	93
<b>4.6. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)</b>	<b>94</b>
4.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Yöntemin Çalışma Prensibini, Uygulama Alanlarını ve HPLC Sistemini Oluşturan Aygıtlar	95
4.6.2. Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) işlemleri	96
4.6.3. HPLC Analiz Yöntemi	97
4.6.4. HPLC Cihazının Kullanımı ve Temizliği	97
6. UYGULAMA	98
<b>ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME</b>	<b>99</b>
<b>EK - 1 PESTİSİTLERLE İLGİLİ YASAL MEVZUAT</b>	<b>101</b>
<b>TÜRK GIDA KODEKSİ PESTİSİTLERİN MAKSİMUM KALINTI LİMİTLERİ YÖNETMELİĞİ</b>	<b>106</b>
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>111</b>
<b>CEVAP ANAHTARI</b>	<b>112</b>

# DERS MATERYALİNİN TANITIMI

Öğrenme biriminin adını gösterir.

## PESTİSİT ANALİZLERİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA

### 1. Öğrenme Birimi



**Hazırlık Çalışmaları**

1. Pestisitlerin çevreye ve insan yaşamına olan etkileri hakkında araştırma yaparak sonuçlarınızı sınıf arkadaşlarınızla paylaşınız.
2. Böcek ve haşerelerle mücadele etme yöntemlerini araştırınız.

**KONULAR**

- 1.1. PESTİSİTLER
- 1.2. HOMOJENİZASYON (ÖRNEK HAZIRLAMA)
- 1.3. EKSTRASYON
- 1.4. TEMİHLEME (CLEAN-UP)

**TEMEL KAVRAMLAR**  
pestisit, sonikasyon, su baryosu, vial, evaporatör, Soxhlet cihazı, SPE cihazı

**NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?**

- Pestisitlerin sınıflandırılması
- Pestisitlerin kullanım alanları
- Pestisitlerin yararlarını ve zararlarını
- Pestisitlerin homojenizasyonunu
- Pestisitlerin ekstraksiyonunu
- Pestisitlerde clean-up işlemi

**QR KODU**

Öğrenme biriminin numarasını gösterir.

Öğrenme birimi hazırlık sorularını gösterir.

Öğrenme biriminde öğrenilecek konuları gösterir.

Öğrenme biriminde öğrenilecek temel kavramları gösterir.

Öğrenme biriminde öğrenilecek temaları gösterir.

Okutulduğunda öğrenme birimi ile ilgili içeriklere ulaşılabilir karekodu gösterir.

Alt konu başlığını gösterir.

Konu anlatımını gösterir.

**1. Öğrenme Birimi**

**PESTİSİT ANALİZLERİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA**

**1.1. PESTİSİTLER**

Bitkisel ürünlerin üretiminde bitkilerin gelişimlerini, ürün miktarını ve kalitesini olumsuz etkileyen mikroorganizma ve zararlıları uzaklaştırmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal veya biyolojik etkenlere **pestisit** adı verilir. Ayrıca pestisitler, gıda maddelerinin depolanmasında insan ve hayvanlara hastalık etmeni taşıyan halk sağlığı zararlılarını kontrol etmek amacıyla da kullanılmaktadır.

Pestisitlerin kullanımı miltattan önceki dönemlere dayanmakta birlikte özellikle 2. Dünya Savaşı yıllarında artan gıda ihtiyacını karşılamak amacıyla daha çok yaygınlaşmıştır.

**1.1.1. Pestisitlerin Özellikleri**

Pestisitler saf fülde kullanılmazlar. Pestisitler üç temel kısımdan oluşurlar. Bu kısımlar şunlardır:

- Etkin madde (Öldürücü etki gösteren maddedir.)
- Dolgu maddesi (İlaçın taşımasını ve kullanımını kolaylaştıran maddedir.)
- Diğer maddeler (İlaçın etkinliğini artıran ve çevreye olan zararlarını azaltan maddelerdir.)

Bir formülasyonun Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarında imal edilmesi gerekmektedir. Bunun için WHO yöntemlerine göre kimyasal analizleri ve fiziksel analizleri yapılır. Pestisit formülasyonları; emülsiyon konsantre (EC), islanabilir toz (WP), su-yağ emülsiyonu (EW), aerosoller (AE), toz ilaçlar (DP), suda çözünen toz ilaçlar (SP), tabletler (TB), kuru tohum ilaçları (DS) vb. çeşitli fiziksel formülasyonlarda hazırlanabilir.

Halk sağlığını tehlikeye atmadan kullanılacak pestisitlerin ideal nitelikleri şöyle sıralanabilir:

- Hedef canlıya spesifik olarak toksik olmalıdır.
- İnsanlara zarar vermemelidir.
- Ucuz olmalıdır.
- Kolay uygulanabilir.
- Kollayca toksik olmayan maddelere dönüşebilir.
- Yanıcı olmamalıdır.
- Korozif olmamalıdır.
- Patlayıcı olmamalıdır.
- Boyayıcı etkisi olmamalıdır.

**1.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması**

Pestisitler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir ancak genellikle etki mekanizmalarına (etkiledikleri canlı türüne) göre veya kimyasal yapılarına (formülasyona) göre sınıflandırılırlar.

16

Konu başlığını gösterir.

# DERS MATERYALİNİN TANITIMI

Konuyla ilgili uygulamanın görevini gösterir.

Konuyla ilgili uygulamada kullanılacak araç gereci gösterir.

Konuyla ilgili işlem basamaklarını gösterir.

**Öğrenme Birimi**

**PESTİSİT ANALİZLERİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA**

**1. UYGULAMA**

**Görev** : Pestisitlerin faydaları ve zararları ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlama

Aşağıda verilen işlem basamaklarını dikkate alarak pestisitlerin yararları ve zararları konulu sunum hazırlama çalışmasını yapınız.

**Araç Gereç İşlem Basamakları** : Bilgisayar, genel ağ bağlantısı

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız.
3. Çalışacağınız araç gereci (bilgisayar, genel ağ vb.) kullanıma hazır hale getiriniz.
4. Sunum hazırlama kurallarına uyunuz.
5. Sunumunuzda kullanacağınız cümlelerin net ve anlaşılır olmasına dikkat ediniz.
6. Sunumunuzu hazırlarken canlı renkler ve sunuma uygun yazı puntosunu kullanınız.
7. Sunum sonunda dinleyicilere soruları olup olmadığını sorunuz.
8. Dinleyicilere teşekkür ederek sunumunuzu bitiriniz.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

1. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanız planlarıken ölçütleri dikkate alınız.

**ÖLÇÜTLER**

**DERECELER**

(4) Çok iyi (3) İyi (2) Orta (1) Geliştirilebilir

1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.

2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları yaptı.

3. Sunum hazırlama kurallarına uyd.

4. Sunumu dinleyicilere sundu.

5. Sunumda zamanı doğru kullandı.

**TOPLAM PUAN**

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.  
Deney raporu EK 2 olarak kitabın sonunda verilmiştir.

20

Etkileşimli kitap, video, ses, animasyon, uygulama, oyun, soru vb. ilave kaynaklara ulaşabilecek karekodu gösterir.

Uygulamanın değerlendirme ölçütlerini ve puanlamayı gösterir.

Öğrenme birimi konularını kapsayan ölçme ve değerlendirme sorularını gösterir.

**ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME**

**A) Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.**

1. Mikroorganizma ve zararlıları uzaklaştırmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal veya biyolojik etmenlere ..... adı verilir.
2. Pestisitler ..... madde, dolgu maddesi ve diğer maddeler olmak üzere üç kısımdan oluşur.
3. Pestisitlerin aşırı ve gereksiz kullanımı çevresinde bulunan canlılarda akut ve kronik ..... yol açar.
4. Organik çözücüler kullanılarak bir doğrayıcı, parçalayıcı veya homojenizatör yardımıyla pestisitlerin polar olmayan örneklerden ayrılması işlemine ..... işlemi denir.
5. Süi içeriği %10'dan az olan örnekler ..... örnekler denir.
6. Kullanılacak temizleme yöntemi matrise, aranan ..... çeşidine, kullanılacak analitik cihaza ve detektör hassasiyetine göre değişiklik gösterir.

**B) Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.**

7. I. Insektisitler Böcekleri öldürenler  
II. Fungusitler Mantarları öldürenler  
III. Herbisitler Örümcekleri öldürenler  
IV. Akarisitler Yabancı otları öldürenler  
V. Bakterisitler Bakterileri öldürenler

**Yukarıda belirtilen pestisitler ile etki ettiği canlı türleri eşleştirilmiştir. Bu eşleştirmede hangisi veya hangileri yanlış eşleştirilmiştir?**

A) Yalnız III D) III ve IV B) II ve IV E) I ve V C) I - III - V

**8. Aşağıdakilerden hangisi kullanılacak pestisit için ideal niteliklerinden biri değildir?**

A) İnsanlara zarar vermemelidir. B) Ucuz olmalıdır. C) Korozif olmalıdır.  
D) Kolay uygulanabilmelidir. E) Yanıcı olmamalıdır.

**C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.**

**9. Pestisitleri kimyasal yapılarına göre kaçça ayırılır? Adlarını yazarak kısaca açıklayınız.**

.....

.....

.....

**10. Pestisitlerde yapılan ekstraksiyon işlemi kısaca anlatınız.**

.....

.....

.....

32

## LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA ALINACAK İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ ÖNLEMLERİ

1. Laboratuvar çalışmalarında mutlaka önlük giyilmelidir. Laboratuvarda yapılan çalışmaya göre eldiven, gözlük, maske vb. koruyucu malzemeler kullanılmalıdır.
2. Laboratuvarda hiçbir şey yenilip içilmemelidir.
3. Laboratuvar çalışmalarında uzun saçlar toplanmalı; saat, yüzük, küpe vb. takılar çıkarılmalıdır.
4. Asitlerle yapılan çalışmalarda önlüğün üzerine, asitlere dayanıklı PVC'den yapılmış koruyucu giyilmelidir.
5. Kimyasal maddelerden çıkan buharın solunmaması için çalışır durumdaki çeker ocak içinde çalışılmalıdır.
6. Asitlerle çözelti hazırlanırken çözelti hazırlanacak kaba bir miktar saf su koyulduktan sonra asit yavaşça suyun üzerine ilave edilmelidir. Asit ilavesinden sonra sıcaklık yükselmesi olduğundan hacim tamamlama işlemi balon joje soğuduktan sonra yapılmalıdır.
7. Kimyasal madde dökülmelerine ve cam kırıklarına tedbir amacıyla laboratuvarda daima kapalı ayakkabı ile çalışılmalıdır.
8. Sıcak malzemeler, ateşe dayanıklı eldiven veya maşa ile tutulmalıdır.
9. Cihaz kullanma talimatlarına mutlaka uyulmalıdır.
10. Laboratuvar atıkları uygun atık kutularına atılmalıdır.
11. Laboratuvar çalışanları ilk yardım konusunda bilgi sahibi olmalıdır.
12. Laboratuvar malzemelerinin temizliği uygun temizlik malzemeleri ile yapılmalıdır.
13. Laboratuvar çalışmaları sonucunda prizde kalması gereken cihazlar haricindeki cihazların fişleri prizlerden çekilmeli ve laboratuvar ışıkları kapatılmalıdır.



# PESTİSİT ANALİZLERİNDE ÖRNEK HAZIRLAMA

## 1. Öğrenme Birimi



Hazırlık



Çalışmaları

1. Pestisitlerin çevreye ve insan yaşamına olan etkileri hakkında araştırma yaparak sonuçlarınızı sınıf arkadaşlarınızla paylaşınız.
2. Çevrenizde gördüğünüz böcek ve haşerelerle mücadele yöntemleri ile ilgili gözlemlerinizi sınıfta paylaşınız.

### KONULAR

- 1.1. PESTİSİTLER
- 1.2. HOMOJENİZASYON (ÖRNEK HAZIRLAMA)
- 1.3. EKSTRAKSİYON
- 1.4. TEMİZLEME (CLEAN-UP)

### TEMEL KAVRAMLAR

evaporatör, pestisit, sonikatör, soxhlet cihazı, SPE cihazı, su banyosu, vial

### NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?

- Pestisitlerin özelliklerini açıklamayı
- Homojenizasyon işlemlerini yapmayı
- Ekstraksiyon işlemlerini yapmayı
- Temizleme (clean-up) işlemlerini yapmayı



## 1.1. PESTİSİTLER

Bitkisel ürünlerin üretiminde bitkilerin gelişimlerini, ürün miktarını ve kalitesini olumsuz etkileyen mikroorganizma ve zararlıları uzaklaştırmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal veya biyolojik etmenlere **pestisit** adı verilir. Ayrıca pestisitler, gıda maddelerinin depolanmasında insan ve hayvanlara hastalık etmeni taşıyan halk sağlığı zararlılarını kontrol etmek amacıyla da kullanılır.

Pestisitlerin kullanımı milattan önceki dönemlere dayanmakla birlikte özellikle 2. Dünya Savaşı yıllarında artan gıda ihtiyacını karşılamak amacıyla daha çok yaygınlaşmıştır.

### 1.1.1. Pestisitlerin Özellikleri

Pestisitler saf hâlde kullanılmaz. Pestisitler üç temel kısımdan oluşur. Bu kısımlar şunlardır:

- Etkin madde (Öldürücü etki gösteren maddedir.)
- Dolgu maddesi (İlacın taşınmasını ve kullanımını kolaylaştıran maddedir.)
- Diğer maddeler (İlacın etkinliğini artıran ve çevreye olan zararlarını azaltan maddelerdir.)

Bir formülasyonun Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarında imal edilmesi gerekir. Bunun için WHO yöntemlerine göre kimyasal analizleri ve fiziksel analizleri yapılır. Pestisit formülasyonları; emülsiyon konsantre (EC), ıslanabilir toz (WP), su-yağ emülsiyonu (EW), aerosoller (AE), toz ilaçlar (DP), suda çözünen toz ilaçlar (SP), tabletler (TB), kuru tohum ilaçları (DS) vb. çeşitli fiziksel formlarda hazırlanabilir.

Halk sağlığını tehlikeye atmadan kullanılacak pestisitlerin ideal nitelikleri şöyle sıralanabilir:

- Hedef canlıya spesifik olarak toksik olmalıdır.
- İnsanlara zarar vermemelidir.
- Ucuz olmalıdır.
- Kolay uygulanabilmelidir.
- Kolayca toksik olmayan maddelere dönüşebilmelidir.
- Yanıcı olmamalıdır.
- Korozif olmamalıdır.
- Patlayıcı olmamalıdır.
- Boyayıcı etkisi olmamalıdır.

### 1.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir ancak genellikle etki mekanizmalarına (etkiledikleri canlı türüne) göre veya kimyasal yapılarına (formülasyona) göre sınıflandırılır.





Etki mekanizmalarına göre sınıflandırılan pestisitler Tablo 1.1'de verilmiştir.

**Tablo 1.1:** Pestisitlerin Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması

PESTİSİTİN ADI	ETKİ MEKANİZMASI
İnsektisitler	Böcekleri öldürenler
Akarisitler	Örümcekleri öldürenler
Fungusitler	Fungusları (mantarları) öldürenler
Rodentisitler	Kemirgenleri öldürenler
Bakterisitler	Bakterileri öldürenler
Mitisitler	Keneleri öldürenler
Larvasitler	Larvaları öldürenler
Nematositler	Solucanları öldürenler
Mollositler	Salyangozları öldürenler
Herbisitler	Yabancı otları öldürenler

Pestisitler, kimyasal yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılır. Bununla birlikte, yaygın olarak bilinen dört temel pestisit grubu vardır. Bu gruplar şunlardır:

**Organik Klorlu Pestisitler (Organik Klorlular):** Yapılarında karbon, hidrojen ve klor atomları ihtiva eden bir gruptur. DDT, aldrin, dieldrin, heptachlor, endosulfan, lindane, endrin bu gruba örnek verilebilir. Genel olarak gaz kromatografisi ile analiz edilir. Çevreye verdikleri zararlar nedeniyle bu grubun üyelerinin kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır. Temas ve solunum yolu ile etkiler.

**Organik Fosforlu Pestisitler (Organik Fosforlular):** Genel olarak triester yapısında olup fosforik asit türevleridir ve etken maddelerinin yapısında fosfor atomu bulunur. Chlorpyrifos, coumaphos, diazinon, dichlorvos, malathion, trichlorfon, parathion, mevinphos bu gruba örnek verilebilir. Bu grup içinde yüzden fazla etken madde vardır. Triester yapıda olduklarından ester gruplarının özelliklerine göre bu gruba giren pestisitlerin kimyasal yapıları oldukça farklılık etkiler. Yapılarına bağlı olarak gaz kromatografisi ya da sıvı kromatografisi ile analiz edilebilir. Temas, sindirim ve solunum yolu ile etki eder. Bu grup insektisitler; ergin, larva ve nimf dönemlerini kontrol eder. Asetilkolinesteraz inhibitörüdür.

**Karbamatlı Pestisitler (Karbamatlılar):** Karbamik asit esterleridir. Aldicarb, carbaryl, carbofuran, methiocarb, methomyl, oxamyl, pirimicarb bu gruba örnek verilebilir. Yapısal özelliklerinden dolayı gaz kromatografisi ile analizleri zordur, genel olarak sıvı kromatografisi ile analiz edilir. Asetilkolinesteraz inhibitörüdür.

**Piretroit Grubu Pestisitler (Piretroitler):** Chrysanthemum (krizantem) çiçeklerinden elde edilen doğal bileşikler olan piretrinlerin sentetik analoglarıdır. Piretrinlere oranla ışığa karşı duyarlılıkları oldukça azaltılmış; dayanıklılıkları artırılmış bileşiklerdir. Piretrinler ve piretroitler genellikle sinerjist etki yaratmak üzere birlikte kullanılır. Alpha-cypermethrin, cyfluthrin, bifenthrin, lamda-cyhalothrin, deltamethrin, permethrin, fenvalerate piretroitler örnek olarak verilebilir. Hem sıvı hem gaz kromatografisi ile analiz edilebilmekle birlikte analizlerinde yaygın olarak gaz kromatografisi kullanılır. Sinir hücrelerini bloke ederek zehirler. Temas yoluyla ve mide zehiri olarak etki eder. Sıcakkanlılara karşı toksik etkisi çok düşüktür. Memeli vücudunda birikmeden dışarı atılırlar. Doğada kolayca parçalanabilir.



Pestisitlerin çeşitleri ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlayınız.

### 1.1.3. Pestisitlerin Kullanım Alanları

Pestisitlerin kullanım alanı oldukça geniştir. Pestisitler özellikle zirai üretim alanları başta olmak üzere gıda depolarında, ev ve iş yerlerindeki haşerelerle mücadele etmede kullanılır (Görsel 1.1). Bunun yanında evcil hayvanların üzerinde bulunan ve bazı hastalıkların (Kırım Kongo kanamalı ateşi vb.) vektörü olan zararlılarla mücadele için de kullanılır.



Görsel 1.1: Pestisitlerin tarlaya uygulanması



Pestisitlerin kullanım amaçları ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlayınız.

### 1.1.4. Pestisit Kullanımının Yararları ve Zararları

Yerküre üzerinde tarım yapılabilecek alanların kısıtlı olması ve hızlı nüfus artışı, birim alandan en fazla verimi alma gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre dünya nüfusunun %40'ı yeterli seviyede beslenememekte, bunun sonucunda da açlık ve sefaletten dolayı her yıl binlerce kişi ölmektedir. Günümüzde, pestisitlerin kullanılmaması durumunda bazı ürünlerde kayıpların %65'e kadar çıkabileceği tahmin edilmektedir. Bu durum dünya üzerinde bulunan nüfusun gıdaya ulaşımını daha da zorlaştıracaktır. Ayrıca bu kayıpların maddi değeri trilyonlarla ifade edilmektedir. Yine FAO verilerine göre dünyada üretimi yapılan ürünlerin %20-40 kadarının böceklerin neden olduğu zararlar nedeniyle yitirildiği ve bu oranın,



gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Ürün kayıpları; hasattan, pişirmeye kadar geçen her evrede olmaktadır.

Pestisit kullanımı tarımsal üretimi artırırken bilinçsiz ve hatalı kullanım doğrudan veya dolaylı olarak insan ve çevre sağlığını tehdit kullanılır. Özellikle pestisitler; önerilen dozların üzerinde kullanılırsa önerilenden fazla sayıda ilaçlama yapılırsa, gerekmediği hâlde birden fazla ilaçla karıştırılırsa veya hasat dönemi ile son ilaçlama arasında bırakılması gereken süre bırakılmazsa gıda maddelerinde fazla miktarda kalıntı bırakabilir. Yüksek dozda pestisit kalıntısı içeren gıdalarla beslenen insanlarda ve pestisit kullanılan yerin çevresindeki diğer canlılarda akut veya kronik zehirlenmeler olabildiği gibi bazı ürünlerin tat ve kalitesi de düşebilir.

Bilinçsiz ve gereksiz pestisit tüketiminin neden olduğu sorunlardan biri de zararlı organizmaların, kullanılan pestisite karşı direnç kazanmasıdır. Bu durum pestisitlerin etkinliğini azaltmakta, dolayısıyla üreticiler tarafından aynı başarıyı elde etmek için daha yüksek dozlarda kullanılmasına neden olmaktadır. Bu durum maliyeti yükseltmekte, çevre kirliliğini artırmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir.



Pestisitlerin yararları ve zararları ile ilgili sunum hazırlayınız.

### BİLGİ KÖŞESİ

Pestisitlerle ilgili ilk ciddi eleştiri biyolog Rachel Carson'un (Rakel Karson) 1962 yılında yayımladığı "Silent Spring (Silent Sprink) (Sessiz İlkbahar)" kitabıyla ortaya çıkmış ve DDT ve klorlu hidrokarbonların çevredeki dayanıklılığı, insan ve hayvanların yağ dokularında birikimi, hedef olmayan veya olmaması gereken türler üzerindeki toksik etkisi ile ekolojik ve insan sağlığıyla ilgili yıkıcı etkileri dile getirilmiştir. Carson tarafından yazılan bu kitap sınırsız pestisit kullanımına ilk kez tüm boyutlarıyla dikkatleri çekerken özellikle DDT, dieldrin ve aldrinin etkilerini vurgulamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yürüttüğü ve DDT'nin kullanıldığı sıtma eradikasyon programı 1965 tarihinden başlayarak 15 milyon yaşamı kurtarmıştır. Ancak DDT'ye karşı olan gruplar zaman içinde sıtma eradikasyon programının uygulandığı bölgelerde DDT'nin etkili olmadığını ve buna karşı hızla direnç geliştiğini belirlemişlerdir. Üstelik DDT'nin, sivrisineklerle beslenen birçok hayvan türünün de ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Sözelimi ölü veya ölmekte olan sivrisinekleri yiyen kertenkeleler zehirlenmekte, daha önce kertenkeleleri yakalamaları çok güç olan kedilerin bunları yemeleri sonucu ise kediler de zehirlenmektedir. Kedilerin azalmasına bağlı olarak sıçan sayısında artış meydana gelmiştir ve bu kez rodentisitlerin yaygın kullanımı gerekli olmuştur. Zehirlenen fareleri yiyen baykuşların etkilenmesiyle birlikte sorunun boyutu giderek büyümüştür. 1960'lı yıllarda başlayan diğer bilimsel araştırmalarda DDT'nin farelerde kanserojen olduğu belirlenmiş ve 1971 yılında ABD'de yasaklanmıştır. 1974-1984 yılları arasında İngiltere'de gönüllü olarak terk edilmesi yoluna gidilmiş ve günümüzde tümüyle yasaklanmıştır. Bütün bunlar pestisitlerle ilgili ikilemleri ortaya koymaktadır. Bir yandan pestisitlerin sağladığı yararları savunanlar, diğer yandan pestisitlerin zararlarını savunanlar kuşkusuz haklı birçok gerekçeye sahiptirler. Pestisitlerin faydaları ve zararları arasında dengenin sağlanabilmesi için bu ürünlerin izin verilen limitler dâhilinde, bilinçli ve doğru kullanımı son derece önemlidir.

## 1. UYGULAMA

**Görev** : Pestisitlerin faydaları ve zararları ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlama

**Aşağıda verilen işlem basamaklarını dikkate alarak pestislerin yararları ve zararları konulu sunum hazırlama çalışmasını yapınız.**

**Araç Gereç** : Bilgisayar, genel ağ bağlantısı  
**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız.
3. Çalışacağınız araç gereci (bilgisayar, genel ağ vb.) kullanıma hazır hâle getiriniz.
4. Sunum hazırlama kurallarına uyunuz.
5. Sunumunuzda kullanacağınız cümlelerin net ve anlaşılır olmasına dikkat ediniz.
6. Sunumunuzu hazırlarken canlı renkler ve sunuma uygun yazı puntosunu kullanınız.
7. Sunum sonunda dinleyicilere soruları olup olmadığını sorunuz.
8. Dinleyicilere teşekkür ederek sunumu bitiriniz.

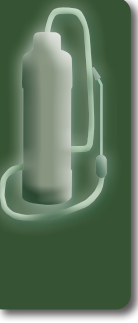
## DERECELEME ÖLÇEĞİ

1. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Sunum hazırlama kurallarına uydu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Sunumu dinleyicilere sundu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Sunumda zamanı doğru kullandı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

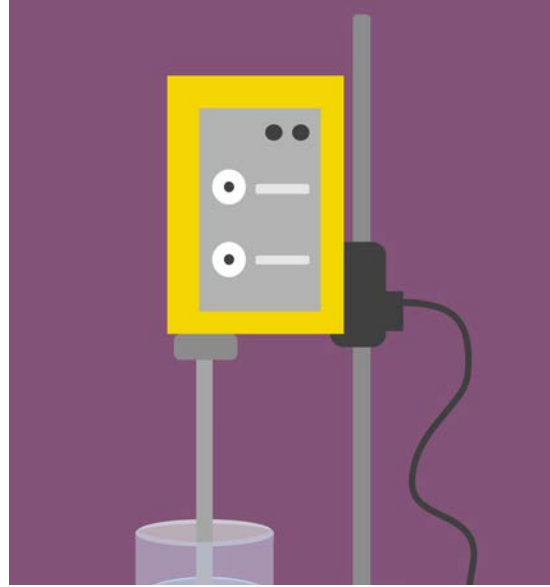
Deney raporu EK 2 olarak kitabın sonunda verilmiştir.



## 1.2. HOMOJENİZASYON (ÖRNEK HAZIRLAMA)

Pestisit analizlerinde, diğer analizlerde olduğu gibi alınan örneğin, bütünü temsil etmesi gerekir. Alınan katı örnekler mikser, parçalayıcı veya sonikatör ile homojen hâle getirilerek analize hazırlanır (Görsel 1.2). Pestisit analizlerinde katı örneklerin büyüklüğünün aynı olması önemlidir. Analiz örneklerinin homojenesyonu, analiz sonucunu doğrudan etkiler. Isıya duyarlı pestisitlerin, ısı etkisiyle bozulmasını önlemek için homojenizasyon (parçalama, doğrama vb.) işlemi yapılırken örneğe kuru buz veya sıvı azot eklenir. Sıvı örneklerin homojenizasyonu çalkalayıcı, karıştırıcı veya sonikatör ile yapılır. Katı örneklerin homojenizasyonu, sıvı numunelerin homojenizasyonuna göre daha zordur.

Pestisit analizleri için numune alma işlemleri “Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı” tarafından yayınlanan Ek - 1 de verilen “Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Pestisit Kalıntılarının Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Tebliği (TEBLİĞ NO: 2011/34) ve Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliğine göre yapılır.



Görsel 1.2: Sonikatör

### 1.2.1. Homojenizasyonda Kullanılan Araç Gereç

Homojenizasyon işlemlerinde kullanılan araç gereç şunlardır:

- Mikser
- Parçalayıcı
- Karıştırıcı
- Çalkalayıcı
- Sonikatör

### 1.2.2. İşlem Basamakları

- Usulüne uygun olarak alınan örnekler en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılır.
- Laboratuvara gelen numuneler, numune kabul defterine işlenerek analize hazırlanmak üzere analiz bölümüne alınır.
- Analizi yapılacak numune katı ise mikser, parçalayıcı veya sonikatör yardımıyla homojen hâle getirilir.
- Analizi yapılacak numune sıvı ise çalkalayıcı veya karıştırıcıda homojen hâle getirildikten sonra analize alınır.

## 2. UYGULAMA

**Görev** : Katı ve sıvı numunelerde homojenizasyon işlemi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak homojenizasyon işlemi yapınız.**

**Araç Gereç** : Karıştırıcı, çalkalayıcı, parçalayıcı ve sonikatör

**İşlem Basamakları**

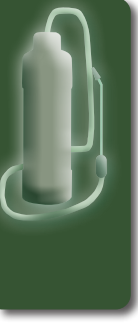
1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Laboratuvara gelen numunenin ambalajını ve miktarını kontrol ediniz.
3. Laboratuvara gelen numuneyi laboratuvar kayıt defterine kaydediniz.
4. Numune katı ise mikser, parçalayıcı veya sonikatör ile homojen hâle getiriniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
5. Numune sıvı ise çalkalayıcı veya karıştırıcı ile homojen hâle getiriniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
6. Homojen hâle getirdiğiniz numuneyi analize kadar uygun şekilde muhafaza ediniz (Muhafaza kurallarına dikkat ediniz.).

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

2. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Laboratuvara gelen numuneyi kontrol ederek laboratuvar kayıt defterine kaydetti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Numuneyi uygun araçla homojenize etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Cihaz kullanma talimatlarına uydu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Numuneyi analize kadar uygun şartlarda muhafaza etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



### 1.3. EKSTRAKSİYON

**Ekstraksiyon işlemi** organik çözücüler kullanılarak bir doğrayıcı, parçalayıcı veya homojenizatör yardımıyla pestisitlerin polar olmayan örneklerden ayrılmasıdır. En çok kullanılan organik çözücüler, asetonitril, aseton, etil asetat ve metanoldür. Hayvansal kaynaklı gıda örnekleri için diklorometan ve hekzan gibi organik çözücüler tercih edilir.

Pestisit analizlerinde, çok çeşitli olmasından dolayı pestisitlerin tamamını tek bir yöntemle belirlemek çok zordur. Bu nedenle aranacak pestisite göre çeşitli ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler şunlardır:

- Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi (Liquid-liquid dispersion extraction, LLE)
- Sıvı-sıvı dağılım mikro-ekstraksiyon (Dispersive liquidliquid microextraction, DLLME)
- Katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction, SPE)
- Matris katı faz dağılım (Matrix solid-Phase dispersion, MSPD)
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction, SFE)
- Hızlandırılmış (basınçlandırılmış) çözücü ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE)
- Soxhlet ekstraksiyonu (SOX)
- Mikrodalga ekstraksiyonu (Microwave - assisted extracion MAE)
- Ultrasonik ekstraksiyon (Ultrasonication extraction, USE)
- Katı faz mikro-ekstraksiyon (SolidPhase Microextraction, SPME)

Ekstraksiyon işlemine tabi tutulacak örnekler su ve yağ içeriklerine göre üç gruba ayrılır ve buna uygun ekstraksiyon yöntemi belirlenir. Bu gruplar şunlardır:

- Orta veya yüksek su içeriğine sahip örnekler (taze sebze ve meyveler)
- Kuru örnekler (su içeriği %10'dan az)
- Yağlı örnekler (yağ içeriği %2'den fazla)

#### 1.3.1. Orta veya Yüksek Su İçeriğine Sahip Numunelerde (Taze Sebze ve Meyveler) Ekstraksiyon İşlemi

15 g taze sebze veya meyve tartılarak karıştırıcı (blender) ile ezilir. Üzerine 30 ml diklorometan çözücüsü eklenir. Karıştırıldıktan sonra üzerine 30 g sodyum sülfat eklenip tekrar karıştırılır. İki dakika 40 °C'deki ultrasonik banyoda (Görsel 1.3) özütlenir ve sodyum sülfat kolonundan süzülür. Çözücü rotary evaporator (rotovap) ile tamamen uçurulur ve üzerine 2 ml sikloheksan eklenir. GC-MS cihazı ile analiz edilir.



**Görsel 1.3:** Ultrasonik banyo

### 1.3.2. Kuru Numunelerde (Su İçeriği %10'dan Az) Ekstraksiyon İşlemi

Kuru sebze ve meyvelerden partiyi temsil edecek miktarda alınan örnekler parçalayıcı veya doğrayıcı ile ufalanır. Ufalanmış örnekler, analiz yapıncaya kadar cam kavonozlarda ve  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir. Örneklerin ekstraksiyon işlemleri için önce ufalanmış homojen ve donmuş örnekten 10 g alınır ve 10 ml asetonitril eklenir, tüp kapatılıp 1 dakika elde çalkalanır. Bu karışımın içine 4 g magnezyum sülfat ( $\text{MgSO}_4$ ), 1 g sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ), 0,5 g trisodyum sitrat dihidrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 0,5 g disodyum hidrojen sitrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_2\text{O}_8$ ) eklenir. Bu işlemden sonra karışım elle çalkalandıktan sonra 5 dakika santrifüjlenir. Üstteki faz alınarak her 1 ml ekstrakt için 25 mg PSA (primary secondary amin) ve 150 mg magnezyum sülfat eklenir ve tekrar santrifüj edilir.

Santrifüjden sonraki temizlenmiş ekstrakt, kapaklı bir viale (Görsel 1.4) aktarılır ve pH hemen asetonitril içinde %5 formik asit çözeltisi [vol/vol (her 1 ml ekstrakt için yaklaşık 10  $\mu\text{l}$ )] ilave edilerek yaklaşık pH değeri 5'e ayarlanır. pH'ı ayarlanmış ekstrakt viallere doldurularak analize hazırlanır.



Görsel 1.4: Laboratuvar vialleri

### 1.3.3. Yağlı Numunelerde (Yağ İçeriği %2'den Fazla) Ekstraksiyon İşlemi

Yağlı gıdalarda, gıdalardaki yağın n-hekzan veya petrol eteri ile ekstrakte edilmesi ve florosil kolon temizlemesi uygulanarak pestisit kalıntılarının petrol eteri- etil eter karışımlarıyla kolondan alınması ve konsantre edildikten sonra gaz kromatografisi ile saptanmasıdır.

**Kuru ve Düşük Yağlı Gıdalar:** %10'dan daha az su içeren kurutulmuş ürünler, kurutulmuş sebzeler, baharatlar ve bakliyatlar bu yöntemle yapılabilir.





15 g örneğe aseton + su karışımı (65+35 ml) ilave edilir ve blenderden geçirilerek süzülür. 80 ml süzüntü 1 lt'lik ayırma hunisine alınır. 100 ml petrol eteri ve 100 ml diklormetan konulup çalkalanarak faz ayrılır. Üstteki faz alınır. Alttaki faz iki defa daha 100 ml diklormetanla çalkalanır. Toplanan ekstrakt sodyum sülfattan süzülür ve 45 °C'yi geçmeyecek şekilde evaporatörde (Görsel 1.5) uçurulur.



Görsel 1.5: Evaporatör

**Yağlı Tohumlar:** Tohumlar değirmende veya havanda öğütülür. 20-25 g örnek alınır. Soxhlet (soksalet) cihazının (Görsel 1.6) kartuşuna aktarılıp petrol eteriyle 8 saat ekstraksiyon yapılır. Ekstrakt evaporatörde birkaç ml kalana kadar yoğunlaştırılır. Petrol eteri kalıntısı 65-70 °C ultrasonik banyoda uzaklaştırılır. Kalıntı, mililitrede 40-50 mg yağ olacak şekilde petrol eterinde çözülür.



Görsel 1.6: Soxhlet (soksalet) cihazı

## 3. UYGULAMA

**Görev** : Orta veya yüksek su içeriğine sahip numunelerde (taze sebze ve meyveler) ekstraksiyon işlemi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ekstraksiyon işlemi yapınız.**

**Araç Gereç** : Blender, rotavap, ultrasonik banyo, sodyum sülfat, diklorometan ve siklohegzan

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Numuneden 15 g tartarak blender ile eziniz (Tartımı ve ezme işlemi dikkatli yapınız.).
3. Ezdiğiniz numunenin üzerine çözücü olarak 30 ml diklorometan ilave ederek karıştırınız (Kimyasal maddelerin kullanma talimatlarına uyunuz.).
4. Karıştırdığınız numunenin üzerine 30 g sodyum sülfat ekleyerek karıştırınız.
5. Numuneyi 40 °C'lik ultrasonik banyoda tutarak ekstraktı sodyum sülfat kolunundan süzünüz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
6. Rotovapta çözücüyü tamamen uçurduktan sonra 2 ml siklohegzan ilave ediniz (GC-MS cihazı ile cihaz kullanma talimatlarına uyarak analiz edilir.).

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

3. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

**ÖLÇÜTLER****DERECELER**

	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneden 15 g tartarak blender ile ezdi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Numunenin üzerine 30 ml diklorometan ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Numuneyi 40 °C'lik ultrasonik banyoda tutarak ekstraktı sodyum sülfat kolunundan süzdü.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Rotovapta çözücüyü tamamen uçurduktan sonra 2 ml siklohegzan ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



## 4. UYGULAMA

**Görev** : Kuru numunelerde (su içeriği %10'dan az) ekstraksiyon işlemi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ekstraksiyon işlemi yapınız.**

**Araç Gereç** : Doğrayıcı, cam kavanoz, vidalı vial, santrifüj, buzdolabı, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum klorür ( $NaCl$ ), trisodyum sitrat dihidrat ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ), disodyum hidrojen sitrat ( $C_6H_8Na_2O_8$ ), PSA (primary secondary amin), asetonitril ve %5'lik formik asit

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Analize alınacak numuneleri doğrayıcıda ufalayarak, kapaklı cam kavanozlarda -18 OC' de dondurunuz.
3. Donmuş numuneden tüp içine 10 g tartınız, üzerine 10 ml asetonitril ilave ediniz.
4. Tüpü 1 dakika süreyle elde çalkalayınız.
5. Bu karışıma 4 g ( $MgSO_4$ ), 1 g ( $NaCl$ ), 0,5 g ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) ve 0,5 g ( $C_6H_8Na_2O_8$ ) ilave ediniz.
6. Karışımı elle çalkalayınız.
7. Karışımı 5 dakika santrifüjleyiniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
8. Üstteki fazı alarak her ml ekstrakt için 25 mg PSA ve 150 mg  $MgSO_4$  ekleyiniz.
9. Karışımı tekrar santrifüjleyiniz.
10. Temizlenmiş ekstraktı asetonitril içinde %5 formik asit çözeltisi ile hemen pH değerini 5'e ayarlayınız.
11. Ekstraktı vidalı viallere alarak analize hazır hâle getiriniz.
12. Sabırlı olunuz.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

4. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneyi doğrayıcıda ufalayarak - 18 °C'de dondurdu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Donmuş numuneden 10 g tartarak gerekli kimyasalları ilave edip santrifüjledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Üstteki fazı alarak ekstrakta 25 mg PSA ve 150 mg $MgSO_4$ ekleyip tekrar santrifüjledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Temizlenmiş ekstraktın pH değerini 5'e düşürerek viallere koydu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## 5. UYGULAMA

**Görev** : Yağlı (yağ içeriği %2'den fazla) numunelerde ekstraksiyon işlemi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ekstraksiyon işlemi yapınız.**

**Araç Gereç** : Havan, değirmen, evaporatör, ayırma hunisi, sokslet cihazı, ultrasonik banyo, aseton, petrol eteri, diklormetan, sodyum sülfat ve saf su

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Numuneden 20-25 g tartarak değirmen veya havanda öğütünüz (Öğütme işlemi dikkatli yapınız.).
3. Öğüttüğünüz numuneyi sokslet cihazının kartuşuna yerleştirerek 8 saat petrol eteriyle ekstrakte ediniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
4. Ekstraktı, evaporatörde bir kaç ml kalana kadar konsantre ediniz (Evaporatör kullanma talimatlarına uyunuz.).
5. Petrol eteri kalıntısını 65-70 °C ultrasonik banyoda uzaklaştırınız (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
6. Kalıntı mililitrede 40-50 mg yağ olacak şekilde petrol eterinde çözündürünüz.
7. Kimyasal maddeleri solumayınız.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

5. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneden 20-25 g tartarak havanda öğüttü.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Öğütülmüş numuneyi sokslet cihazı kartuşlarına yerleştirerek petrol eteri ile 8 saat ekstrakte etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Ekstraktı evaporatörde birkaç ml kalana kadar konsantre etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Kalan petrol eterini 65-70 °C'lik ultrasonik banyoda uzaklaştırdı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



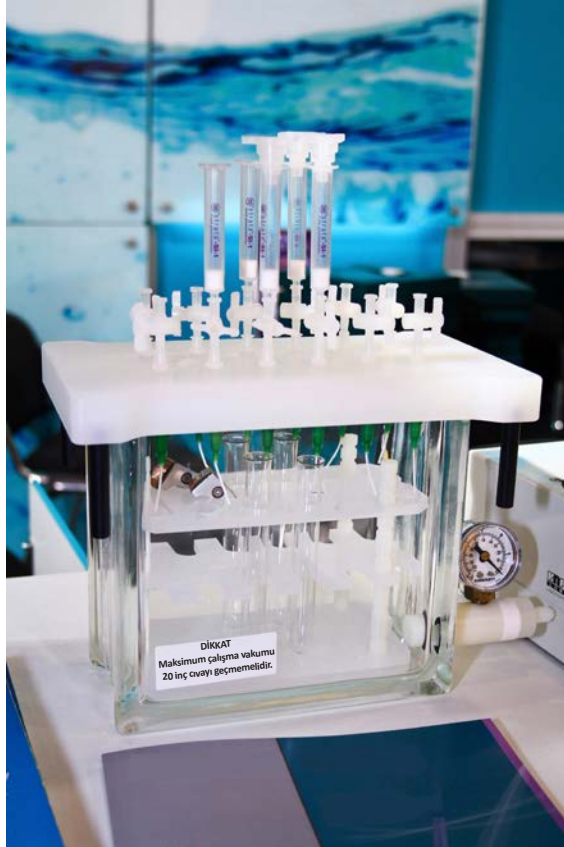
## 1.4. TEMİZLEME (CLEAN - UP)

Pestisitlerin ekstraksiyonu sonucunda aranan pestisitlerin tesbitini engelleyecek veya cihaza zarar verebilecek birçok materyal (karbonhidratlar, proteinler, lipitler vb.) bulunmaktadır. Bu amaçla ilave bir temizlemeye (clean-up) ihtiyaç duyulur. Kullanılacak temizleme adımı sayısı matrikse, aranan pestisit çeşidine, kullanılacak analitik cihaza ve detektör hassasiyetine göre değişkenlik gösterir. Eski cihazlarda birçok temizleme adımına ihtiyaç duyulurken teknolojinin gelişmesi ve daha hassas cihazların üretilmesi ile temizleme işlemi birkaç adımda bitirilebilir.

En çok kullanılan temizleme yöntemleri; sabunlaştırma, jel kromatografi (gel-permeatin chromatography, GPC), adsorbsiyon kromatografisi (alüminyum, silikjel veya florisil), sıvı-sıvı ayırması (liquid-liquid partitioning, LLE) asit uygulaması, buhar destilasyonu veya düşük sıcaklıkta çöktürmedir. Bu yöntemler tek tek kullanılabilirdiği gibi bir arada da kullanılabilir.

### 1.4.1. Temizleme (Clean-Up) İşlemleri

Pestisit analizi amacıyla temizleme aşamasında en fazla kullanılan yöntem katı faz ekstraksiyonu SPE'dir (Görsel 1.7). SPE yönteminin esası, ekstraksiyon kolon ve disklerine küçük boyutlu adsorban maddeler koyarak örnekle temas etmesi ve oluşan kimyasal reaksiyonlarla örneklerin temizlenmesi veya yapılarının değiştirilmesidir. SPE uygulamaları genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri öncesinde kullanılır. SPE adsorbanları (tutucu maddeleri); C18, stiren-divinil benzen (SDVB), aminopropil (NH<sub>2</sub>), primer sekonder amin (PSA), trimetil amonyum güçlü anyon değişim (SAX), grafit karbon siyahı (GCB), florisil, silika ve alumina'dır.



Görsel 1.7: SPE cihazı

SPE, analitin izolasyonu ve matriksin izolasyonu olmak üzere iki şekilde uygulanır.

**Analitin İzolasyonu Yöntemi:** Aranılan pestisit, adsorban madde tarafından tutulur, yıkama işlemi ile istenmeyen maddeler uzaklaştırılır ve son olarak tutulan pestisit molekülleri uygun çözücülerle elüe edilir.

**Matriksin İzolasyonu Yöntemi:** İstenmeyen maddeler adsorban tarafından tutulur, aranılan pestisit ilk aşamada elüe edilir. Bir çeşit kimyasal filtrasyon olan bu yöntemde, polar olmayan ters faz SPE adsorbanları (C18, SDVB gibi), polar olmayan organik klorlu veya sentetik piretroid pestisitlerin örnek matriksinden temizlenmesinde son derece etkilidir.

Pestisitlerin gıda, çevre, su, toprak vb. örneklerden izolasyonu ve temizlenmesinde birçok yöntem kullanılır. Bu yöntemlerin pahalı ve zahmetli olması, uzun zaman alması, etkinliğinin tam bilinmemesi gibi dezavantajları vardır.

Özellikle meyve ve sebzelerde, Anastasiades ve arkadaşlarının 2003 yılında geliştirdiği Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe, (QuEChERS) yöntemi birçok farklı yapıdaki pestisit analizinde hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam, güvenli, tesadüfi veya sistematik hataları en aza indirmesinden dolayı son yıllarda en çok kullanılan yöntemdir. Orijinal QuEChERS yöntemi; çözücü (asetonitril) yardımıyla ekstraksiyon, bunu takiben sodyum klorür ve magnezyum sülfat gibi tuzlarla suyun uzaklaştırılması ve çeşitli adsorbanlar (primer/sekonder aminler, C18 vb.) ile temizleme aşamalarından oluşmaktadır. Kullanılan tuzlar yardımıyla oluşan organik çözücü-su faz ayrımı ile suda çözünenler (metamidofos gibi) dâhil olmak üzere birçok pestisit ekstraksiyonu başarıyla sağlanmaktadır. İlk geliştirilen metodun alkali ortama duyarlı pestisitlerde (kaptan, klorotalonil, folpet vb. fungusitler) stabilite problemine yol açması gibi sakıncaları formik asit eklenmesi, asetat ve sitrat tamponların kullanılması ile giderilmiş ve örnek hazırlama yönteminin standardize edildiği iki önemli versiyonundan ilki 2007 yılında Lehotay ve arkadaşları tarafından ortaya konan asit tamponlama versiyonu "AOAC Resmi Metot 2007.01", ikincisi de 2008 yılında Anastasiades ve arkadaşlarının ortaya koyduğu sitrat tamponlama versiyonu "European Committee for Standardization (CEN)" Standart Metot EN 15662 olarak kabul edilmiştir.

QuEChERS yöntemi esnek bir yaklaşıma sahiptir. Sebze ve meyvelerdeki pestisit analizlerinde ve araştırma laboratuvarlarında en çok kullanılan örnek hazırlama yöntemidir.

### 1.4.2. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar

Temizleme (clean-up) işlemlerinde; santrifüj, santrifüj tüpü, vorteks, pipet, hassas terazi, tartım kabı, spatül, filtre kağıdı, kromatografi cihazı, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum klorür (NaCl), asetonitril ve primer sekonder amin (PSA) kullanılır.

### 1.4.3. İşlemin Yapılışı

Usulüne uygun alınmış ve ekstrakte edilmiş numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 10 g numune alınır. Üzerine 15 ml asetonitril ilave edilerek elle çalkalanır. Çalkalama işleminden sonra 6 g  $MgSO_4$  ve 1,5 g NaCl ilave edilerek tekrar çalkalanır. Hazırlanan çözelti santrifüjde 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir. Üstteki kısımdan pipet yardımıyla 2 ml alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve üzerine 0,3 g  $MgSO_4$  + 0,1 g PSA eklenerek vorteks cihazında 30 saniye çalkalandıktan sonra 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüjden alınan çözelti 0,45  $\mu m$ 'lik filtreden süzülerek gaz kromatografisi (GC) cihazında okunur.



## 6. UYGULAMA

**Görev** : Temizleme (clean-up) işlemi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak temizleme işlemi yapınız.**

**Araç Gereç** : Blender, evaporatör, ayırma hunisi, aseton, petrol eteri, diklormetan, sodyum sülfat ve saf su

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Ekstrakte edilmiş numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 10 g tartınız ve üzerine 15 ml asetonitril ilave ederek elle çalkalayınız (Hassas çalışınız.).
3. Çalkaladığınız karışımın üzerine 6 g  $MgSO_4$  ve 1,5 g NaCl ilave ederek çalkalayınız (Çalkalama işlemi dikkatli yapınız.).
4. Karışımı santrifüje yerleştirerek 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjleyiniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
5. Üstteki kısımdan pipet yardımıyla 2 ml alarak üzerine 0,3 g  $MgSO_4$  ve 0,1 g PSA ilave ediniz.
6. Vorteks cihazında 30 saniye çalkalandıktan sonra 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüjleyiniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
7. Santrifüjden alınan çözeltiyi 0,45  $\mu m$ 'lik filtreden süzerek gaz kromatografisi (GC) cihazına yerleştiriniz.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

6. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

#### ÖLÇÜTLER

#### DERECELER

	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneden 10 g tartarak gerekli kimyasalları ekledi ve santrifüjledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Üstteki kısımdan pipet yardımıyla 2 ml alarak üzerine 0,3 g $MgSO_4$ ve 0,1 g PSA ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Vorteks cihazında 30 saniye çalkaladıktan sonra 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüjledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Santrifüjden alınan çözeltiyi 0,45 $\mu m$ 'lik filtreden süzerek gaz kromatografisi (GC) cihazına yerleştirdi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.





# İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ

## 2. Öğrenme Birimi



### Hazırlık



### Çalışmaları

1. İmmünoloji sözcüğünün anlamını araştırınız.
2. Çevrenizde herhangi bir hastalık, miktar tayini vb. ölçüm yapılması gereken durumlarda, ölçüm sonucunu anında belirten cihazlar ya da araçlar gördüyseniz bunlarla ilgili edindiğiniz bilgileri sınıf arkadaşlarınızla paylaşınız.

### KONULAR

- 2.1. İMMÜNOLOJİK TESTLER
- 2.2. İMMUNSENSÖRLER (BİYOSENSÖRLER)
- 2.3. İMMUNOKROMATOĞRAFI
- 2.4. İMMUN-İŞARETLEME

### TEMEL KAVRAMLAR

elisa testi, FIA testi, RIA testi, biyosensör, enzim bazlı biyosensörler, hücre temelli biyosensörler, antijen/antikor temelli biyosensörler, immüno-kromatografik kart testleri

### NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?

- İmmünolojik testleri uygulamayı
- İmmunsensörler (biyosensörler) yardımıyla pestisit analizlerini yapmayı
- İmmunokromatografi yöntemiyle pestisit analizlerini yapmayı
- İmmun-ışaretleme yöntemiyle pestisit analizlerini yapmayı



## 2.1. İMMÜNOLOJİK TESTLER

Kalıntı analizleri; kromatografik ve spektroskopik yöntemleri kapsayan enstrümental analizleri içermektedir. Bu yöntemler, güvenilir ve oldukça hassas olmalarına rağmen yüksek yatırım ve işletme maliyetine sahiptir. Ayrıca belirli bir uzmanlık gerektiren zaman alıcı yöntemlerdir. Bununla birlikte bazı durumlarda analizin süresini uzatan ön işlemler ya da ekstraksiyon gerektirir.

Gelişmiş araştırma ve kalite kontrol laboratuvarları, yüksek maliyetli cihazlara ve uzman iş gücüne ulaşmada sıkıntı yaşamamaktadır. Fakat küçük ve orta ölçekli işletmelerde cihaz ve uzman için yatırım yapılması her zaman mümkün olmaz. Bundan dolayı sahada kullanılacak analiz yöntemlerinin hızlı, güvenilir, erişilebilir, düşük maliyetli, uzmanlık gerektirmeyen cihazlarla yapılması gereklidir. Bu nedenle, konvansiyonel analiz yöntemlerinin tamamlayıcısı ve bazen de alternatifi olacak hızlı ve yenilikçi analiz yöntemlerinin iyileştirilmesi, geliştirilmesi bir zorunluluk hâline gelmiştir.

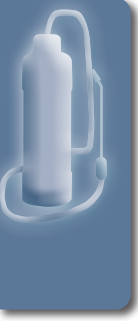
İmmünokimyasal yöntemler; belirtilen avantajlarına rağmen tespit limitlerinin yüksekliği, yalancı pozitiflik, doğrulamaya ihtiyaç duyulması, küçük moleküllü maddelerin tespitinin zorluğu, metot geliştirmenin zor ve pahalı olması gibi olumsuz yönleri nedeniyle pestisit analizinde kullanılan kromatografik yöntemler kadar sık kullanılmamaktadır. Bunun yanı sıra, kullanılan antikörlerin pestisitler gibi küçük moleküllere karşı immün reaksiyon vermemesi immünojenik testlerin pestisit analizinde kullanımını sınırlandırır. Yine de sonuçların yorumlanması, kalite kontrolü ve kalite güvenilirliğine dair yeterli bilginin olması ve küçük moleküllerin tespitine olanak sağlayan antikörlerin geliştirilmesine yönelik haptent teknolojilerinin ilerlemesi pestisit analizinde immünojenik yöntemlerin kullanımını olanaklı kılar. Hatta ABD Çevre Koruma Ajansı [US Environmental Protection Agency (EPA)] gibi uluslararası kuruluşlar tarafından, sınırlı sayıda pestisit için olsa bile, bazı immünojenik yöntemlerin resmi kontrol yöntemi olarak kullanılmasına izin verilir.

İmmünojenik yöntemlerin rutin pestisit analizlerinde kullanımı için yeni immünojenik test formatlarının geliştirilmesi, çoklu-kalıntı analizleri, immünojenik akış-enjeksiyon teknikleri ve bunların potansiyeli konusunda araştırmalar devam etmektedir.

Seksenli yılların ortalarından bu yana tıp alanında gebelik testinde, yara ve tümör belirlenmesinde, bakteri ve virüs antijenlerinin kontrolünde, biotıp araştırmalarda, klinik testlerde vb. kullanılan immünojenik hızlı testler son yıllarda gıda hijyeninde de kullanılır. Tüketicinin gıda hijyeni konusunda bilinçlenmesi, özellikle son yıllarda gıdalardaki kimyasal kalıntı ve katkıların oluşturduğu problemler, geniş bir ürün yelpazesinde kullanılan çeşitli etkin maddelerin kritik olmayan miktarlarının belirlenmesini zorunlu kılmıştır. Bir taraftan artan çevre bilincinin zorlaması, diğer taraftan modern analiz yöntemlerinin gelişmesi bu tür maddelerin çok cüzi konsantrasyonunun bile saptanmasına olanak sağlamıştır (MARTLBAUER).

Uzun zamandır gıdalarda hijyenik olarak yüksek moleküllü antijenlerin tespitinde uygulanan immün kimyasal yöntemlerin aksine ilaçlar, pestisitler, çevre kontaminantları ve toksinler gibi düşük moleküllü maddelerin belirlenmesi için kullanılan immün testin (immuno assay) gelişimi nispeten daha geç başlamıştır.

İmmünojenik yöntemlerin seçiminde göz önünde bulundurulacak kriterler şunlardır



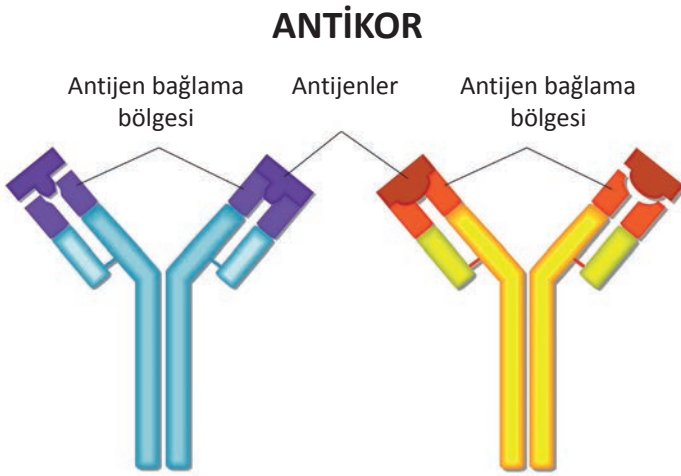
- Düşük maliyet (fiziksel ve kimyasal metotlara göre)
- Kısa test süresi
- Kolay uygulanabilirlik
- Yüksek hassasiyet
- Laboratuvar donanımlarına bağımlı olmama
- Testin güvenilirliği
- Basit değerlendirme (mümkün olduğunca çıplak gözle)

### 2.1.1. İmmünolojik Yöntemlerin Temel Prensibi

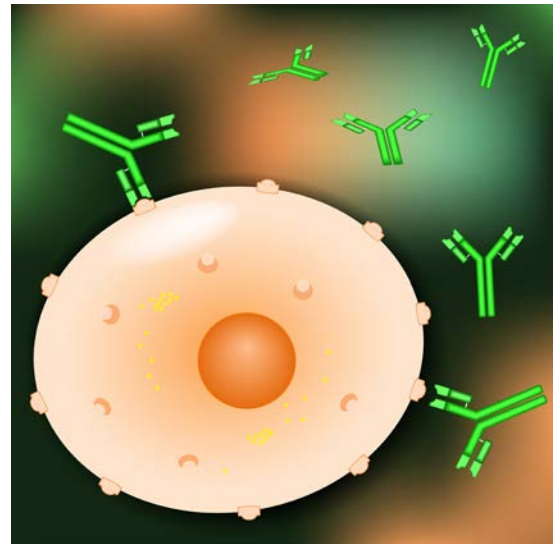
Bütün immünolojik yöntemlerin temel prensibi antikor-antijen reaksiyonuna dayanır. Antijenler kendilerine karşı hazırlanmış antikorlar ile reaksiyona girdiklerinden dolayı yöntemin duyarlılığını etkileyen en önemli faktör kuşkusuz ki antikorların seçiciliğidir.

Genellikle antijen veya antikor, katı bir ortama bağlanmış hâlde bulunur. Ortama sabitlenmiş olan antikor veya antijen, örnek içinde bulunan spesifik antijen veya antikorlarla karşılaştığında bağlanma özelliği gösterir. Antijen-antikor reaksiyonu spesifik olduğu için reaksiyonda antikorların kendi antijenlerini bulabilmesi için ideal örneklerin reaksiyonu gereklidir (Görsel 2.1 ve 2.2).

Ortamda bağlanan veya bağlanmayan maddelerin tespiti; floresan renk değişimi, kimyasal ışımaya neden olan enzimler veya radyoizotopların ölçümüne dayalı olarak yapılır.



Görsel 2.1: Uygun antikor-antijen bağlanması



Görsel 2.2: Uygun antikor-antijen bağlanması

Pestisit analiz yöntemleri içinde immünojenik yöntemler, uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç alınması ile ön plana çıkmaktadır. Bunun yanında immünojenik yöntemler; diğer yöntemlere göre düşük maliyetli olması, düşük örnek miktarları ile çalışabilme imkânı sunması, birçok analizde uygulanabilir olması, örnek hazırlama aşamalarının basit olması, çoklu örnek analizine imkân vermesi, sahada rahat çalışılabilmesi ve kolayca otomatize edilebilmesi gibi avantajlara sahiptir.

Pestisit analizi amacıyla kullanılan başlıca immünojenik yöntemler; immünojenik testler, immüno-sensörler (biyosensörler), immünojenikromatografi ve immüno işaretleme olarak gruplandırılabilir.

Bunlar içinde pestisitlerin analizinde en çok kullanılan immünojenik yöntem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) başta olmak üzere FIA (Flow Injection Analysis) , EIA (Enzyme Immuno Assay) ve RIA (Radio Immuno Assay) gibi immünojenik testlerdir.

### EIA (Enzim İmmuno Assay)

Bu yöntemde antijen-antikor reaksiyonu; antikorun bir enzim ile işaretlenmesi ve enzim aktivitesinin renk reaksiyonuna göre ölçülmesi sonucu saptanır.

EIA'ların en yaygın kullanılan şekli ELISA'dır (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

### ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay )

ELISA yöntemi bu alanda en yaygın kullanılan uygulamadır (Görsel 2.3). Bu teknikte işaretli antijen veya antikor tayini yapılır. İşaretli konjugatın hazırlanmasında işaretleyici olarak enzim kullanılır. Antijen antikor birleşmesi esasına dayanan bu yöntemde genel olarak 12x8 = 96 adet kuyucuklu plaka kullanılır. Özellikle tarama testi olarak pestisit analizlerinde kullanılmak üzere 96 kuyucuklu plakanın yanında spesifik antikor kaplı test tüpü ve manyetik partikül içeren birçok ticari immünojenik ürün kullanılmaktadır.

**Yöntemin Avantajları** (Hedef moleküle özgü geliştirilmiş antikorlar kullanıldığı için oluşan avantajlar.)

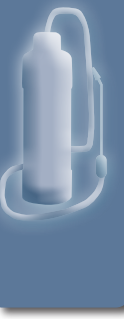
- Yüksek hassasiyet
- Yüksek güvenilirlik
- Kolay işlem
- Kısa zamanda çok sayıda numunenin farklı kalıntılarının analiz edilmesi

**Yöntemin Dezavantajları**

- Test kitinin kısa ömürlü olması
- Antikorların diğer maddelerle çapraz reaksiyona girmesi
- Maliyet fazlalığı



Görsel 2.3: Elisa testi



# 1. UYGULAMA

**Görev** : ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle pestisit analizi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak analizi yapınız.**

**Araç Gereç** : ELISA cihazı, plate

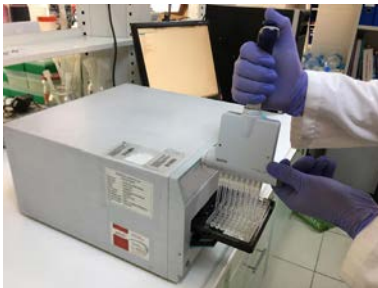
## İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız (Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz).
3. Analizi yapacağınız testin (Her test için kit içinde bulunan talimata uygun olarak yapılması gereken bir takım ön hazırlık işlemleri mevcuttur.) manuel ön hazırlık işlemlerini yapınız.
4. Cihazın programını açarak analizini yapacağınız test için gerekli ayarlamaları yapınız (Görsel 2.4).



**Görsel 2.4:** ELISA cihazı ve bağlı olduğu bilgisayar

5. Aranılan maddeye uygun olarak standart çözeltileri, kontrol çözeltilerini ve numuneleri pipetleyiniz (Görsel 2.5 ve 2.6).



**Görsel 2.5:** ELISA cihazı numune pipetleme



**Görsel 2.6:** ELISA cihazı numune pipetleme

6. Aranılan madde için gerekli olan kimyasalları pipetleyiniz.
7. Kullanacağınız yöntemeye uygun olan yıkama ve inkübasyon işlemlerini yapınız. Plateyi düzgün bir şekilde yerleştiriniz (Görsel 2.7 ve 2.8).



Görsel 2.7: ELISA cihazı plate



Görsel 2.8: UPlate yerleştirme

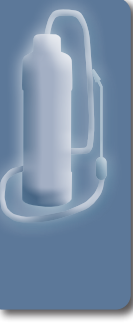
8. Aranılan maddeye uygun olarak cihazın dalga boyunu ayarlayınız (Her maddenin okuma dalga boyu farklı değerlerde olabilir.).
9. Okuduğunuz absorbans değerlerine göre, belirlenmiş standart değerleri baz alarak kalibrasyon eğrisi çizip sonuçları değerlendiriniz.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

1. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneyi ekstraksiyon işlemlerinden geçirek kuyucuklara yerleştirip üzerine işaretli antikor ekledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. İnkübasyon ve yıkama yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Ortama enzimin substratını ilave ederek okuma yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Hesaplama yaparak sonuca ulaştı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



### FIA (Flow Injektion Analysis)

Akış Enjeksiyon Analizi (FIA), Danimarka ve Amerika Birleşik Devletleri'nde akışkan bir taşıyıcı sıvı akışındaki numune malzemelerin kimyasal analizini gerçekleştirmek için geliştirilen bir mikro kimyasal tekniktir. FIA'nın tarımda kullanılış amacı şunlardır:

- Kirlenmeye karşı suyun test edilmesi gibi çevresel izlemede kullanılır.
- Yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisindeki endüstriyel proseslerin izlenmesinde kullanılır.

Bu sistemde reaktifler (Reaktif; kimyasal reaksiyonlarda diğer maddeleri tespit etmek, ölçmek veya üretmek için kullanılan bir maddedir.), taşıyıcı çözeltiyle birlikte sürekli bir şekilde tüplerin içine karıştırılarak bobinleri ve detektördeki akış merkezini pompalar.

Akış Enjeksiyon Analizi, geleneksel yöntemle yapılan tüp ve beher analizine göre pek çok avantaj sağlar. Yöntem ucuz ve hızlı olup çoğu zaman bir dakika içinde sonuç verir. Otomatik sıvı akışı, eşit bir test ortamı sağlamakla birlikte zehirli maddeleri kullanırken veya test ederken teknisyenleri de korumaktadır. Ekipman, bilgisayarla uyumlu olması sebebiyle manuel testlerde meydana gelebilecek veri girişi hatalarını sınırlandırır.

### Cihaz

Akış-enjeksiyonda kullanılan sistemler temel olarak üç önemli kısımdan meydana gelir. Bu kısımlar şunlardır:

- Örneklemenin yapıldığı enjeksiyon musluğu
- İtme kuvvetinin oluşturulduğu peristaltik pompa
- Bağlantı tüpleri

**İşlemin Yapılışı:** Test edilecek maddenin küçük bir numunesi alınır. Numune alma musluğu yardımıyla bir veya birden fazla reaktifin bulunduğu numuneye enjekte edilir. Enjeksiyon sonrasında oluşan kimyasal reaksiyon gözlemlenir. Yaklaşık bir dakika sonra oluşacak renk değişikliği dedektör yardımıyla ölçülür ve sonuç ekrandan okunur.

### RIA (Radyo Immuno Assay)

Bu yöntemde, immüno-kimyasal reaksiyonlarda radyoaktif atomlar yardımıyla maddelerin miktarı tayin edilir. Bu metodun ana bileşenleri; analiz edilecek ilaç ya da kalıntısı aranan maddenin uygun bir radyoizotopla işaretlenmiş standartları ve bu ilaç ya da maddeye karşı önceden hazırlanmış antikör içeren anti serumdur. Bu teknikte kalıntısı aranan pestisit konsantrasyonu, antikora bağlı kalıntının ya da serbest haldeki kalıntının radyoaktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır.

**İşlemin Yapılışı:** Tüp içine kalıntı aranacak serum (numune) konur. Üzerine antikör ve radyoaktif ile işaretlenmiş standart çözelti eklenir. İnkübasyon süresince, varsa serumdaki antijenler ve eklenen radyoizotop işaretli antijenler antikörlere bağlanmak için yarışır. Bağlandıktan sonra antikör-antijen ve antikör-antijen kompleksleri oluştururlar. İnkübasyondan sonra yapılan yıkama işlemi ile çözeltide oluşan antikör-antijen ve antikör-antijen kompleksleri dışındaki maddelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Ölçüm tüpündeki antikör-antijen kompleksinin radyoaktivitesi bir gamma sayacı kullanılarak belirlenir ve standart inhibisyon eğrisi ile miktar hesaplaması yapılır. Sonuç kaydedilerek raporlanır.

## 2.2. İMMÜNSENSÖRLER (BİYOSENSÖRLER)

Pestisit analizinde kullanılan diğer bir immünojenik yöntem ise immünsensörlerdir (biyosensör).

**Biyosensörler**, bünyesinde biyolojik bir algılayıcısı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş olan analitik cihazlar olarak tanımlanır. Minyatürize edilmiş gerçek sensörlerin yüksek seçicilik, ölçümlere uygunluk gibi bütün özelliklerini taşımasalar da analizleri spesifik şekilde tespit eden ve konsantrasyona bağlı olarak geri dönüşümlü sinyal gönderebilen tüm ekipmanlar biyosensör olarak değerlendirilir.

Biyosensörlerin önemli uygulamaları, öncelikle klinik teşhisler üzerine gerçekleşmiştir. Glikoz sensörler [kan şekeri ölçüm cihazı (Görsel 2.9)], günümüzde bile en başarılı ve en geniş kapsamlı olanıdır. Bu teknoloji daha sonra kan örneklerinin analizinde, bulgucu hastalıkların teşhisinde ve ilaç taramasında kullanılmıştır. Bunların yanı sıra biyosensörler; tarımsal üretim, gıda analizi, eczacılık, çevresel izleme faaliyetleri, madencilik, biyoişlem, biyosavaş ve ülke güvenliği alanlarında (askeri savunma sanayi), biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespiti gibi birçok alanda kullanılır [Görsel 2.10 (Tablo 2.1)].

Ortamda bağlanan veya bağlanmayan maddelerin tespiti; floresan renk değişimi, kimyasal ışımaya neden olan enzimler veya radyoizotopların ölçümüne dayalı olarak yapılır.



Görsel 2.9: Tipik bir glikoz sensör cihazı

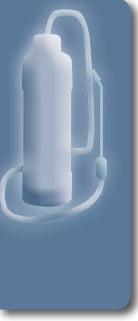


Görsel 2.10: Farklı amaçlarla kullanılan biyosensör örnekleri

Tablo 2.1: Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Proses kontrolü
Endüstriyel atık su kontrolü
Bakteriyal ve viral diagnostik
Biyoreaktör kontrol ve analitiği
Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
Gıda üretim ve analizi
Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
İlaç analizi
Tarım sektörü ve veterinerlik
Askeri uygulamalar





Biyosensörler; insanlarda, bitkilerde, hayvanlarda, gıdalarda, toprak, hava ve suda kullanılır. Pestisit, antibiyotik, patojen mikroorganizma, hastalık, toksin, protein, hormon ve daha fazlasının tespitini düşük konsantrasyonlarda bile hassas ve hızlı ölçebilirler. Böylece erken teşhis ve müdahale ile hastalıkların ileri safhalara geçmeden tedaviye başlanması mümkün kılmaktadır.

Biyosensörlerin klasik analiz yöntemlerine göre sunduğu avantajlar şunlardır:

- Basitlik
- Yüksek hassasiyet
- Düşük maliyet
- Hızlı sonuç
- Sahada analiz olanağı sağladığından özellikle çevre analizlerinde ve proses kontrollerinde önemli kazanımlar sağlamaktadır.

Biyosensörler, spesifik ve hassas sonuçları kısa sürede elde eder, kullanımı kolaydır ve uzun süreli bir eğitim gerekmez. Bundan dolayı gelecekte daha sık bir şekilde kullanılacaktır.

Bir biyosensör temel olarak biyoreseptör, dönüştürücü (transduser) ve elektronik kısımlarından oluşmaktadır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2:** Biyosensörlerin Kısımları

BİYOSENSÖR				
Analit	Biyoreseptör	Transduser (Dönüştürücü)	Elektronik	Veri İşleme
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzimler</li> <li>• Nükleik asitler</li> <li>• Dokular</li> <li>• Hücreler</li> <li>• Antikorlar</li> <li>• Mikroorganizmalar</li> <li>• Yapay biyolojik reseptörler</li> <li>• Aptamerler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transistörler</li> <li>• Termistörler</li> <li>• Elektrodlar</li> <li>• Optik fiberler</li> <li>• Pizelektrik kristaller</li> </ul>	<p><b>GÜÇLENDİRİCİ</b></p>	<p>Elektroanalitik sinyal</p>

Biyoreseptör olarak en çok enzimler olmak üzere, nükleik asitler, mikroorganizmalar, organeller ve antikorlar vb. değişik biyomoleküller kullanılmaktadır. Biyoreseptör, bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır.

Dönüştürücü ise hedef analit (kan, su, gıda vb.) ile biyoreseptör arasında oluşan kimyasal reaksiyonu renk değişimi, ışımaya, ısı oluşumu veya iletkenlik özelliğindeki değişim gibi farklı şekillerde belli ederek bir sinyale dönüştürmektedir. Bunun için en çok elektrokimyasal elektrotlar, optik fiberler, transistörler, termistörler ve pizelektrik kristaller kullanılmaktadır.

Tipik bir biyosensörün içermesi gereken kısım / bölümler şunlardır:

**Analit:** Tespit edilmesi gereken maddedir (örneğin pestisit için gıda maddesi ekstraksiyonu veya diyabet için glikoz).

**Biyoreseptör:** Analiti tanıyan moleküldür (örneğin enzimler).

**Dönüştürücü:** Herhangi bir biyotanıma olayını, bilinen ölçülebilir bir sinyale dönüştüren kısımdır.

**Elektronik Kısım:** Dönüştürülen sinyali görüntülemeye yardımcı kısımdır.

**Görüntüleme:** Biyosensör üretimi için gerekli olan donanım ve yazılımla birlikte sıvı kristal ekrana sahip olan bölümdür.

Pestisitlerin tayininde ise genellikle tanıyıcı tabakada kullanılan enzimlerin veya mikroorganizmaların inhibisyonundan yararlanılarak dolaylı ölçümler gerçekleştirilmektedir. Örneğin pestisitler asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu için kullanılan kimyasallar olduklarından (Asetilkolin esteraz enzimi, pestisit varlığında inhibe olacağından enzim aktivitesindeki azalma pestisit konsantrasyonunun sayısal olarak belirlenmesine olanak tanımaktadır.) pestisit analizi için tasarlanan biyosensörlerin ölçüm yöntemi yine aynı mekanizma kullanılarak tasarlanmaktadır.

Yaklaşık yarım asırlık bir gelişimden sonra biyosensörler; biyospesifik etkileşimleri izleme, biyolojik / kimyasal etken maddeleri tüm alanlarda tespit etme noktasında daha güçlü cihazlar hâline gelmiştir. Bilim adamlarının ve mühendislerin farklı alanlardaki katkılarıyla kimya, biyokimya, fizik, biyoloji, bilgisayar ve mühendislik gibi yeni çoklu disiplin alanlarında büyük çaplı yaratıcı biyosensör geliştirme çabaları devam etmektedir.

### 2.2.1. Pestisit Ölçümünde Kullanılan Biyosensör Tipleri

Biyosensörler, biyoalgılama materyalleri ve uygulanan dönüştürme araçları temel alınarak Tablo 2.3'teki gibi çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

Tablo 2.3: Biyosensörlerin Sınıflandırılması

BİYOALGILAMA MATERYALLERİNE GÖRE	DÖNÜŞTÜRME ARAÇLARINA GÖRE
Enzim Sensörleri	Elektrokimyasal Biyosensörler
İmmuno Sensörler (Antikor / Antijen Temelli)	Optik Biyosensörler
Nükleik Asit Prob Sensörleri (DNA temelli)	Pizoelektrik Biyosensörler
Mikroorganizma Esaslı veya Hücre Esaslı Sensörler	Termal Biyosensörler
Doku Esaslı ve Organel Esaslı Sensörler	Manyetik Biyosensörler

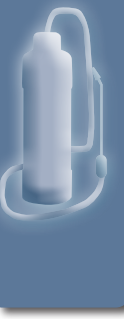
### 2.2.2. Biyoalgılama Materyallerine Göre Biyosensörler

Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyalleri mekanizmalarına göre ilk olarak üç farklı gruba ayrılabilir.

Biyokatalitik, biyoafinite ve mikroorganizma esaslı biyokatalitik esaslı gruba enzimler dâhildir. Biyoafinite esaslı grup; antikorlar, algılayıcılar ve nükleik asitlerden oluşmaktadır.



Biyosensörlerin çalışma prensibi ve kullanım alanlarını konusunda araştırma yaptırılarak sunum hazırlanır.



Mikroorganizma esaslı grup; mikroorganizmalar, hücreler, organeller ve dokulardan oluşmaktadır.

### Enzim Bazlı Biyosensörler

Enzimler kimyasal dönüşümlerin modelini belirleyen moleküllerdir. Bunlar biyolojik sistemlerin katalizörleri olduğu için biyosensörlerde sıkça yararlanılmaktadır. Örneğin glikoz ölçümü için biyosensörde kullanılan enzim, üzerinde en çok çalışma yapılan ve ticari olarak en fazla geliştirilendir.

Enzim bazlı biyosensörlerde, biyoreseptör olarak kullanılan enzimler en çok bilinenlerdir. Bu tip sensörler; temelde enzim katalizli reaksiyonların cevabını ölçerek enerjiyi farklı şekle dönüştürerek sonuca yönlendirir.

Diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerle arasındaki tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır.

Enzimler binlerce kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu kataliz eder. Diğer biyolojik reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da ortamın sıcaklığı, pH değeri, iyonik kudreti vb. çevre şartları etkin rol oynamaktadır. Olumsuz koşullar, enzimin aktivitesini yitirmesine ve bundan dolayı tayinin gerçekleşmemesine neden olmaktadır. Bundan dolayı hücre bazlı biyosensörler, enzim bazlı biyosensörlere alternatif olarak kullanılmaktadır. Hücre bazlı biyosensörlerde reaksiyonu sağlayacak olan enzim hücre içinde bulunduğu için dış ortamdaki olumsuz koşullardan etkilenmez. Ayrıca enzimin saflaştırması gibi zor ve maliyetli basamakların kullanılmasına gerek kalmaz.

Pestisitlerin tespiti için ise organofosfor hidrolaz enzimi sıklıkla kullanılmaktadır. Organofosfor hidrolaz (OPH); organofosfor hidrolizleyici enzimdir, geniş substrat spesifikliğine sahiptir ve birçok organofosfor (OP) pestisitleri hidrolizler.

### Mikroorganizma Esaslı veya Hücre Temelli Sensörler

Bir mikrobiyal biyosensör; dönüştürücü ile canlı veya canlı olmayan mikrobiyal hücrelerin sabitlenerek (immobilize edilerek) birleşmesi ile oluşmaktadır. Biyosensörlerin yapımında kullanılan mikroorganizmalar; geniş bir aralıktaki kimyasal bileşikleri metabolize edebilme, olumsuz şartlara uyma, mutasyonla veya rekombinant DNA teknolojisi ile genetik modifikasyonlar oluşturma ve yeteneklerini geliştirerek zamanla yeni moleküller oluşturabilme gibi bir takım avantajlara sahiptir.

Herhangi bir biyolojik materyalin biyoreseptör olarak kullanılabilmesi için tek şart, materyalin istenilen analiti bir şekilde özgün olarak tanıma kapasitesine sahip olmasıdır. Alg, bakteri, maya ve funguslar da bu özelliklerinden dolayı biyosensörler için tespit edici olarak kullanılabilir. Mikrobiyal biyosensörler, enzimlerin saflaştırılmasını gerektirmediğinden basit ve ucuzdur, enzim için gerekli kofaktörü sağlar.

Hücre esaslı biyosensörler, genelde gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksinlerin çevresel izleme ve tespitinde BOD (Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı) ölçümü için geliştirilmiştir.

### Antikor / Antijen Temelli Biyosensörler (İmmüno Sensörler)

Biyobileşen olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler ya da immünosensörler olarak adlandırılmaktadır. Antikorlar (Vücuda giren yabancı organizmalara karşı bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen protein yapılı maddelerdir.) ve antijenler arasında özgül etkileşim olduğundan immünosensörler ile son derece özgül ve duyarlı analizler yapılabilmektedir. Antikorlar, önemli bir protein sınıfını temsil eder ve kan-

daki toplam plazma proteininin %20'sini oluşturur. Memelilerin serum ve dokularında görülen glikoprotein grubu olanlar imünoglobülinler (Ig) olarak adlandırılmaktadır.

Antikorların hareket prensibi; belirli antijenlere karşı savunma için üretildikleri için karşı toksinleri nötralize etme, bakteri veya hücrelere yapışarak çözünebilir antijenleri çökeltme esasına dayanmaktadır.

Antikorlar, kendi substratlarını yapmak için özellikle ilgili antijene enzimlerden daha güçlü şekilde bağlanmaktadır. Enzimlerin katalitik aktivitelerine sahip olmasalar da son derece hassastır.

Antikorlar, uygun dönüştürücüler ile eşleştirilerek hormon, ilaç, virüs, bakteri ve çevresel kirlenici olan diğer moleküllerin, pestisitlerin, biyomedikal maddelerin tayini için immüno-sensörler geliştirilebilmektedir.

### **Doku ve Organel Temelli Biyosensörler**

Hayvansal, bitkisel doku ve organellerin bir kısmı bazı enzimlerce zengindir. Enzimlerin doğrudan yoğun buldukları bu doku parçaları (izole edilmiş preparatları yerine) biyobileşen olarak kullanılmaktadır.

Avantajları şunlardır:

- Uzun ve masraflı enzim saflaştırma zorluğundan kurtarır.
- Hedef analitin çok basamaklı dönüşümünde farklı enzimlerin bir arada kullanılması yerine direkt enzimin bulunduğu doku kullanılır.
- İlgilenilen enzim ticari olarak bulunmuyorsa doku parçası biyobileşen olarak kullanılır.

### **Nükleik Asit Prob Sensörleri (DNA Temelli)**

DNA temelli sensör tipinde biyobileşen olarak tek zincirli DNA oligomerleri kullanılmaktadır. Bu sensörler, bireylerin genetik yapısının araştırılmasında, genlerin ve genetik hastalıklara sebep olduğu düşünülen mutant genlerin görünümünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca su, gıda, bitki veya hayvandaki patojenik bakteri veya virüslerin tespitinde kullanılabilir.

DNA sensörlerinde dönüştürücü yüzeyine sabitlenmiş tek zincirli DNA probu bulunmaktadır. Bu prop ile belli bir hastalık, kalıtsal bir karakter, bakteri veya virüsün patojenitesi vb. tespit edilebilmektedir. Prop sayesinde gerçekleşen hibridizasyon sonucu çift zincirli DNA oluşmaktadır. Böylece bir elektrokimyasal ya da optik sinyal dönüştürücü yardımıyla okunabilir hâle getirilmektedir. DNA problemleri genellikle 20-30 bazlık kısa tek zincirli uzunluğa sahip olmasına rağmen onlarcasından binlercesine kadar uzatılabilmektedir.

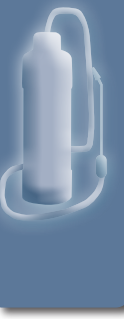
### **2.2.3. Dönüştürme Araçlarına Göre Biyosensörler**

Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyalleri mekanizmalarına göre ilk olarak üç farklı gruba ayrılabilir.

Dönüştürme araçlarına göre biyosensörler; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik biyosensörler olarak sayılabilir.

#### **Elektrokimyasal Biyosensörler**

Bir biyosensörün hazırlanması için elektrotlara, bir biyoreseptöre ve elektrokimyasal ölçüm



cihazına ihtiyaç duyulmaktadır. İşte bu nedenle elektrokimyasal sensörler çok kullanılmaktadır. Diğer tiplerle kıyaslandığında da en eski ve en gelişmiş biyosensörler elektrokimyasal biyosensörlerdir. İlk kullanılan biyosensörler, özellikle klinik glikoz analizi için geliştirilen enzim elektrotları şeklindeki biyosensörlerdir. Daha sonra enzim-bağlantılı imünoelektrokimyasal [Immuno Electrochemical (IEC)] sensörler geliştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler üzerine son araştırmalar, elektrot tasarımlarının geliştirilmesi üzerine yoğunlaştırılmıştır.

Elektrokimyasal esaslı dönüştürücüler genellikle enzim temelli biyosensörlerde kullanılmaktadır. Sensör alanında hangi iletici sistem kullanılmış olursa olsun elektrokimyasal esaslı biyosensörler tartışmasız bir üstünlüğe sahiptir.

### Optik Biyosensörler

Biyosensörlerin üretiminde çeşitli optik teknikleri kullanılmıştır. Hedef analitin doğrudan ve dolaylı tespit edildiği formatlar olmak üzere iki tip optik biyosensör formatı vardır. Bu formatlar şunlardır:

**Doğrudan Format:** Analit, dalga kılavuzunun optik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Hedef analite oranla optik sinyaller üretmek için ışımaya, metal partiküller veya nanopartiküller gibi optik etiketler kullanılmaktadır.

**Doğrusal Olmayan Format:** Bu formatta optik biyosensörler, yüzeye tutunma, ışımaya, fosforesan ışımaya, polarizasyon, rotasyon, müdahale veya harmonik üretim gibi optik olgular kullanılabilir.

### Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler diğer biyosensörlere göre hassasiyet, çok yönlü uygulama, düşük maliyet ve basitlik açısından üstünlük göstermektedir.

Piezoelektrik biyosensörler, temel olarak kristal yüzeyi üzerindeki kütle değişimi sonucu piezoelektrik kristalinin rezonant frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi esasına göre şekillenmiştir. İki ana tip piezoelektrik cihaz bulunmaktadır. Bunlar kuartz kristal mikrobalsans [quartz crystal microbalance (QCM)] ve yüzey akustik dalga (SAW) cihazıdır.

Piezoelektrik imüno sensörlerin önemli bir özelliği, antikor antijen akrabalığı reaksiyonunun avantajını kullanmalarının yanı sıra yüksek belirginlik göstermeleri ve çok amaçlı olmalarıdır. Bu özelliklere bağlı olarak en çok gelecek vadeden biyosensörler arasındadır. Ayrıca piezoelektrik imünosensörler, işaretli antikora ihtiyaç duymamaktadır.

### Termal Biyosensörler

Termal biyosensörler aynı zamanda kalorimetrik biyosensörler olarak da adlandırılmaktadır. Bunlar enzim, organel, mikroorganizma, bitki veya hayvan hücresi, doku gibi bir biyolojik materyalinin termometre, termopil veya termistör gibi bir fiziksel dönüştürücü ile birleştirilmesi ile geliştirilmiştir.

Biyosensör sinyallerinin açıklanmasında izotermal koşulların yer aldığı düşünülmektedir. Termal biyosensörler üç grupta da geliştirilmiştir ama en fazla tercih edilen termal biyosensör, termistör-tabanlı biyosensörlerdir. Bunlar, belirli enzimlerin dâhil olduğu biyokimyasal reaksiyonlar sırasında açığa çıkan ısıyı ölçme esasına dayanmaktadır. Termistör biyosensörleri daha başarılı kılan iki temel faktörün ilki son derece hassas ve küçültülmüş termistörler olması diğeri ise çok kolay

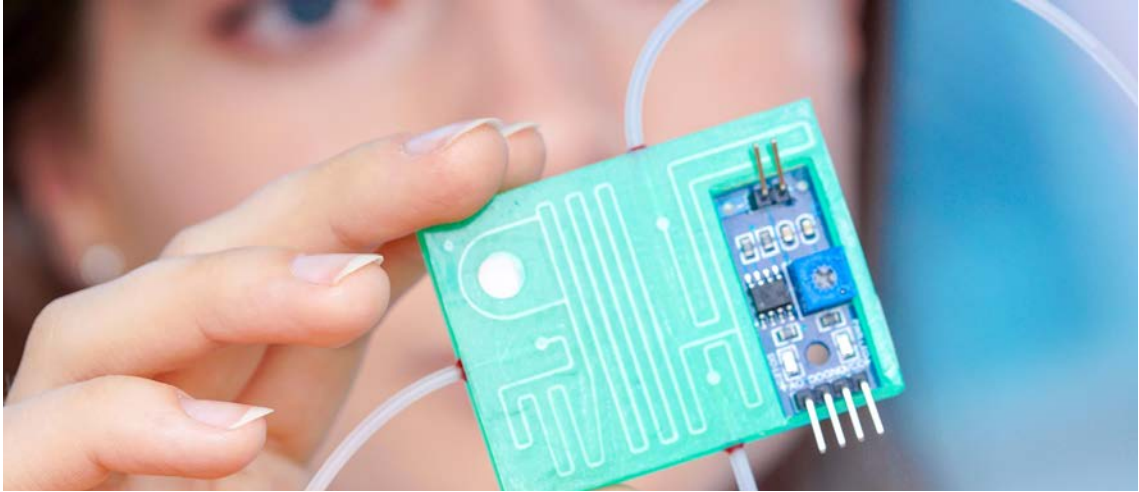
akış-enjeksiyon analizi [flow injection analysis (FIA)] sağlamasıdır.

### Manyetik Biyosensörler

Manyetik biyosensörler son yıllarda daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır. Mikroakışkan kanallar içindeki manyetik mikro ve nano partiküllerin manyetik direnç etkisi kullanılarak hassas şekilde tespit edilmesi ve boyut bağlamındaki avantajı sayesinde gelecek vadetmektedir.

Sonuç olarak pestisit miktarlarının rutin olarak belirlenmesi insan sağlığı açısından son derece önemlidir (Görsel 2.11). Pestisit tayini için kullanılan yöntemlerin bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Bunların yanı sıra biyosensörlerin basit kullanımı, yüksek duyarlılığı, kısa analiz süresi, düşük maliyet ve gerçek zamanlı ölçümlere uygulanma potansiyeli gibi özellikleri birçok alanda kullanılmasını sağlamıştır. Pestisit tayininde biyosensörlerin kullanımı önemli bir alternatif olarak görülmektedir.

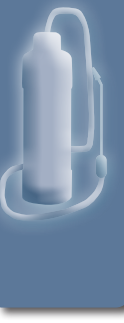
Konu ile ilgili olarak yapılacak yeni çalışmalarla hızlı, kullanım kolaylığı olan, ekonomik, kararlı ve düşük tayin sınırlarına sahip ideal pestisit biyosensörlerinin geliştirilmesi gelecek vadetmesi açısından önemli görülmektedir.



Görsel 2.11: Biyosensörler



Biyosensör çeşitleri konusunda araştırma yapınız. Araştırma sonucu elde ettiğiniz bilgileri sınıf arkadaşlarınızla tartışınız.



## 2. UYGULAMA

- Görev** : Biyosensör kullanarak ölçüm yapma  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ölçüm yapınız.**
- Araç Gereç** : Amacına uygun bir biyosensör

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız (Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz.).
3. Analizi yapılacak testin (Her test için kit içerisinde bulunan talimata uygun olarak yapılması gereken bir takım ön hazırlık işlemleri mevcuttur.) manuel ön hazırlık işlemlerini yapınız.
4. Biyosensörü açarak analizi yapılacak test için gerekli ayarlamaları yapınız.
5. Aranılan maddeye uygun olarak hazırlanmış analiti, biyoreseptör ile buluşturunuz.
6. Dönüştürücünün gerekli sinyali alıp ekrana yansıtmasını bekleyiniz. Ekrandan sonucu okuyarak değerlendirme yapınız.
7. Biyosensörü tekniğine uygun olarak temizleyip kaldırınız.
8. Kişisel ve çevresel temizliğe riayet ediniz.

**NOT:** Her bir biyosensör ve her bir analit için hazırlıklar değişebilir fakat her biyosensörün çalışma prensibi aynıdır.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

2. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Aranılan maddeye uygun olarak analiti hazırladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Tekniğine uygun olarak biyosensörü açtı ve ayarladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Biyoreseptörle analiti buluşturarak sinyali doğru şekilde bekledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Sonucu ekrandan okudu ve cihazın temizliğini tekniğine uygun olarak yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## 2.3. İMMUNOKROMATOĞRAFI

Her geçen gün teknoloji ilerlemekte, artan nüfus sebebiyle toplumun ihtiyaçları da artmaktadır. Teknolojik gelişmeler bir yandan hayatı kolaylaştırırken diğer yandan da insan hayatına daha çok kimyasal madde girmesine sebep olmuştur. Çevresel toksinler, gıdalar, gıda katkı maddeleri, kozmetikler, ilaçlar, pestisitler, sanayi atıkları gün geçtikçe insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte fakat gelişen teknolojiyle de hastalıklar daha iyi tanınmakta, tedavi olanakları artmaktadır. Tüm bu gelişmeler sonucunda daha fazla analiz yapma ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Buna bağlı olarak da uygulanışı basit olan, hızlı sonuç veren bazı analiz yöntemlerinin kullanım alanı yaygınlaşmaktadır. İmmünokromatografik testler de bu amaçla en sık kullanılan analiz araçları arasında yer almaktadır.

### 2.3.1. İmmünokromatografik Yöntemlerin Prensibi ve Kullanım Alanları

İmmünokromatografik kart testler az maliyetli, uzun raf ömürlü, yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip, düşük dedeksiyon limiti taşıyan, hızlı sonuç verebilen ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan testlerdir. Sıklıkla gebelik testi amaçlı kullanılmakla birlikte gıda güvenliği, uyuşturucu tarama testleri, mikrobiyolojik tanı testleri, veteriner tıbbi, toksin testleri, organ yetmezliği testleri, kalite kontrolü, çevre sağlığı ve güvenliği gibi oldukça geniş alanlarda da kullanımı söz konusudur. Ayrıca testte nanopartiküller kullanıldığı için analiz sonucu çıplak gözle görülebilir şekilde sonuçlanmaktadır. Bu sebeple ek bir cihaza gerek duyulmamaktadır.

İmmünokromatografik kart testlerin ortak bir ismi yoktur. İngilizce olarak "lateral flow assay, lateral flow immunoassay, lateral flow biosensor, lateral flow sensor, lateral flow immunochromatographic test, point-of-care test, dipstick test, rapid test, immunoassay rapid test, rapid diagnostic test" gibi bazı adlarla anılan bu testler, günlük hayatta kart test, immünokromatografik kart test, immünokromatografik test, kromatografik kart test, dip test, dipstik test, dipkart test, strip test, yanal akış testi gibi farklı adlarla bilinmektedir.



İmmünokromatografik yöntemlerin prensibi ve kullanım alanları konusunda araştırma yapınız. Araştırma sonucu elde ettiğiniz bilgilerle bir sunum hazırlayınız.

### 2.3.2. İmmünokromatografik Kart Testlerinin Yapısı

Bu testler numunenin (analitin) bir test aracına yerleştirildiği ve sonuçların 5-10 dakika içinde gözle görülebildiği, analitin saptanması ve ölçülmesi için geliştirilen kâğıt tabanlı bir platformdur. Genellikle eni 4-6 mm, boyu 6-7 cm, kalınlığı ise 1-2 mm'dir.

İdrar, tükürük, ter, serum, plazma, tam kan ve diğer biyolojik sıvılar immünokromatografik kart testleri kullanılarak analiz edilebilmektedir.

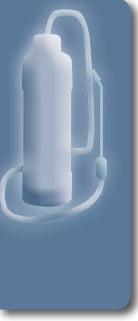
İmmünokromatografik kart testlerin yapısında dikkat çeken bölümler genel olarak şöyledir:

**Plastik Taban ve Kaset Kapak:** İmmünokromatografik kart testlerin üstü plastik kaset kapak ile kapalı olduğundan sadece numune damlatma alanı ile gözlem penceresi alanı gözle görülebilir (Görsel 2.12).



Görsel 2.12: İmmünokromatografik kart test örneği





**Numunenin Damlatıldığı Selüloz Yapılı Numune Pedi:** Numune damlatma alanının (Görsel 2.13) hemen altında numune pedi bulunmaktadır ve damlatılan numune öncelikle bu pedde birikir.



**Görsel 2.13:** Numune damlatma alanına damlalıkla numune damlatılması

**Fiber Glass Yapılı Reaksiyon Pedi:** Renkli molekül ve antikorlar burada bulunur ve reaksiyonlar burada gerçekleşir.

**Nitroselüloz Membran:** Kapiller akım gerçekleşir ve sonuç izlenir.

**Test Çizgisi ve Kontrol Çizgisi:** Test sonucunu belirten bu çizgiler saatler boyunca değişmeden kalabilir.

**Atık Pedi:** Artan numunenin biriktiği selüloz yapılı peddir.

Bazı testler daldırma tekniğiyle [dipstick (Görsel 2.14)] uygulanmaktadır. Çalışma prensipleri aynı olmakla beraber uygulamada biraz farklılık görülmektedir. Dipstick testlerde sıvı numune içine testin uç kısmının daldırılması gerekir. Damlatma metodu uygulanmaz.



**Görsel 2.14:** Bir dipstick kart kromatografi testi

### 2.3.3. İmmünokromatografik Kart Testlerin Çalışma Prensibi

Bu testler antijen-antikor kompleksinin oluşması esasına bağlıdır (Görsel 2.15). Genel olarak kart testin zemininde bulunan nitroselüloz membrana antijen veya antikordan biri sabitlenir, öbürünün ise reaksiyon pedinde hareketli kalması sağlanır. Bu hareket esnasında kompleks oluşur veya oluşmaz. Kompleksin oluşup oluşmamasına göre sonuç yorumlanır. Sonucun yorumlanması gözlem penceresindeki kontrol ve test çizgilerinde gözle görülebilen renkli çizgi bulunup bulunmamasına göre yapılır. Test yapılmadan önce bu alanda gözle görülebilen herhangi bir çizgi bulunmaz.

Bu testlerde esas olarak yüksek seçiciliğe sahip antijen-antikor reaksiyonu kullanıldığından doğruluk oranları genel olarak %98'in üzerinde olmaktadır. Sandviç model ve yarışmalı model olmak üzere iki farklı çalışma prensibi bulunmaktadır.

#### Avantajları ve Dezavantajları

İmmünokromatografik kart test kullanımının az sayıda dezavantajı olmasına karşın birçok avantajı bulunmaktadır.

#### Avantajları

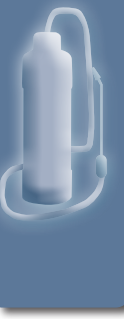
- Yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olmaları
- Üretimine kolay olması
- Düşük maliyetli olmaları
- Testlerin tek olarak uygulanabilmesi
- Cihaza gerek duyulmaması
- Sahada gerçekleştirilebilmesi
- Raf ömrünün uzun olması
- Analiz metodunun kolay uygulanması ve özel eğitim gerektirmemesi
- Sonucun gözle görülebilir olması
- Uzman kişilere gerek duyulmaksızın herkes tarafından uygulanabilecek kadar kolay olması
- Sonuçların güvenilirliğinin yüksek olması

#### Dezavantajları

- Tam kantitatif uygulamasının olmaması
- Kullanıcılar arasında sonuçların yorumlanmasında farklılıklar olabilmesi,
- Çok küçük volümlerin analizde yetersiz kalması,
- Şerit başına tek bir analitin ölçülebilmesi
- Sadece sıvı numuneler için kullanılabilmesi



Görsel 2.15: İmmünokromatografik kart testleri



### 2.3.4. İmmünokromatografik Kart Testlerin Kullanımı

Testler, uzun süre bozulmaması için genellikle silika jel gibi bir nem tutucuyla birlikte tek tek paketlenmiş hâdedir. Numunenin kullanım şekline bağlı olarak çoğunlukla paket içinde veya ayrıca bir damlalık bulunabilir. Analizi yapılacak numunenin sıvı olması gerekmektedir. Eğer numune sıvı değilse paket içinde veya dışında numuneyi sıvılaştıracak veya seyreltecek ilave solüsyon ve ekipman da bulunur (Görsel 2.16).



Görsel 2.16: Bir immünokromatografik kartın paket içeriği

#### BİLGİ KÖŞESİ

İlk kâğıt tabanlı prosedür, kromatografi kâğıdıdır. Bunu icat eden Martin ve Synge isimli bilim insanları, 1952 yılında Nobel kimya ödülü almışlardır. Halk arasında gebelik testi amacıyla kullanımının oldukça yaygınlaşması neticesinde ise immünokromatografik kart testler tüm dünyada oldukça popüler hâle gelmiştir. Günümüzde gebelik testi dışında birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

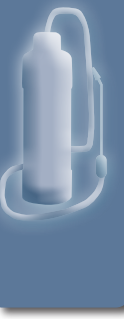
### 3. UYGULAMA

**Görev** : İmmuno kromatografi yöntemiyle test yapma  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak testi yapınız.**

**Araç Gereç** : Amacına uygun bir kart kromatografisi

#### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız (Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz).
3. Öncelikle test paketini yırtarak açınız.
4. Analizi yapılacak testin (Her test için kit içerisinde bulunan talimata uygun olarak yapılması gereken bir takım ön hazırlık işlemleri mevcuttur.) manuel ön hazırlık işlemlerini yapınız (Numune sıvı değilse uygun şekilde sıvı hâle getiriniz.).
5. Kart testin numune damlatma alanına sıvı hâldeki numuneyi damlatınız (Dipstik testlerde sıvı numune içine testin uç kısmının daldırılması yeterlidir.).
6. Teste uygulanan sıvının membranın sonuna kadar ilerlemesini bekleyiniz.
7. Bir dakika içinde kontrol çizgisi alanında beliren çizgiyi ve beş dakika içinde bu çizginin net olarak görünüşünü gözlemleyiniz.
8. Herhangi bir nedenle kontrol çizgisi oluşmamışsa test geçersizdir, başka bir paket açarak testi tekrarlayınız.
9. Testin plastik kaset kapağı üzerinde veya kullanım kılavuzunda yer alan, sonucun nasıl yorumlanacağı ile ilgili kısmı okuyunuz.



## DERECELEME ÖLÇEĞİ

2. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numuneyi ayarlayıp kartın damlatma alanına damlattı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Sıvının yeterli miktarda damlatılıp membranın sonuna kadar ilerlediğinden emin oldu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Yeterli süre bekleyerek çizgi oluşup oluşmadığını kontrol etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Kullanım kılavuzuna göre testi yorumladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

**NOT:** Sonucu yorumlarken test çizgisi alanında görülen çizginin çok silik olması durumu bile reaksiyonun var olduğunu göstermektedir. Çünkü üretim tekniği gereğince bu testlerde bir eşik değer uygulanmaktadır. Numunedeki aranılan madde miktarı eşik değere çok yakın ise test çizgisi alanında oldukça silik, belli belirsiz bir çizgi oluşur. Bu durum "numunedeki analit konsantrasyonu eşik değere çok yakındır" şeklinde yorumlanmalıdır.

## NOT ALINIZ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## 2.4. İMMÜN - İŞARETLEME

İmmünojenik yöntemle yapılan pestisit analizlerinden bir diğeri de immün işaretleme yöntemiyle yapılan analizlerdir. Bu yöntemle pestisit analizi mümkün olmasına rağmen pek kullanılmamaktadır.

### 2.4.1. İşaretlenmiş Antikor veya Antijenle Yapılan Testler

İşaretlenmiş antijen ve antikor bağlanması antijen ya da antikorların enzim, radyoaktif maddeler gibi bazı maddelerle işaretlenmesi ve bu maddelerin oluşturduğu renklerle reaksiyonun gözle görünür bir hâl alması esasına dayanır. Üç başlıkta incelenmektedir.

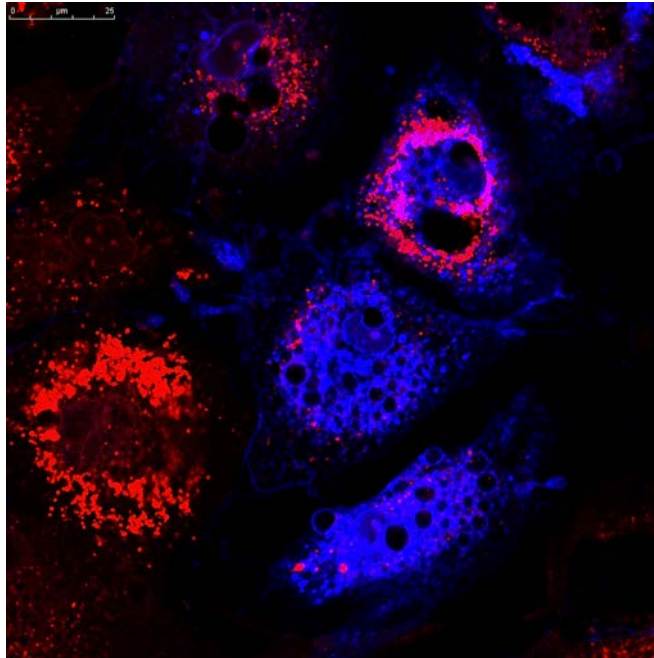
- Radio immuno assay (RIA)
- Enzyme immuno assay (EIA)
- İmmuno- fluoresans

Antikorlar floresan boya ile işaretlenirse yöntem immuno-fluoresans yöntem (Görsel 2.17), enzimlerle işaretlenirse **immuno-enzim (enzyme immuno assay)**; immüno-kimyasal reaksiyonlarda radyoaktif atomlar kullanıldıysa **radio immuno assay (RIA)** adı verilmektedir.

İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler genel olarak kompetitif veya nonkompetitive olarak sınıflandırılır.

Kompetitif reaksiyonlar, aşırı antijen varlığında antijen ölçümü için yapılır. Bu yöntemde işaretlenmiş antijenler kullanılmaktadır.

Nonkompetitif ölçümler, aşırı antikor varlığında antijen ölçümü için yapılır. Bu yöntemde, işaretlenmiş bir antikor kullanılmaktadır.



Görsel 2.17: Floresan molekül ile işaretlenmiş mezenkimal kök hücrelerin görüntüsü

# TEK NUMARADA BİRLEŞTİ!



Ülkemizde farklı acil yardım çağrıları için kullanılan 7 kuruma ait acil çağrı numaralarının (İtfaiye: 110, Jandarma: 156, Polis: 155, Sağlık: 112, Orman: 177, Sahil Güvenlik: 158, AFAD: 122) tek numara (112) altında toplanması amacıyla geliştirilmiştir.

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

### A) Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Bütün immünojenik yöntemlerin temel prensibi ..... reaksiyonuna dayanmaktadır.
2. Antijen antikor birleşmesi esasına dayanan ELISA yönteminde genel olarak ..... plaka kullanılır.
3. Danimarka ve ABD’nde geliştirilen ve akışkan bir taşıyıcı sıvı akışındaki numune malzemelerin kimyasal analizini gerçekleştirmek için geliştirilen bir mikro kimyasal tekniğe ..... denir.
4. Biyobileşen olarak antikoların kullanıldığı biyosensörler ..... olarak adlandırılır.
5. Antikorlar fluoresan boya ile işaretlenirse yöntem immuno- flüoresans yöntemi, enzimlerle işaretlenirse ....., immüno-kimyasal reaksiyonlarda radyoaktif atomlar kullanıldıysa Radioimmunoassay (RIA) adı verilmektedir.

### B) Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

#### 6. Aşağıdakilerden hangisi bir biyosensörün kısımlarından değildir?

- A) Biyoreseptör                      B) Dönüştürücü (transduser)                      C) Elektronik kısım  
D) 96 kuyucuklu plaka                      E) Veri işleme

#### 7. Antijen veya antikordan birinin kart testin zemininde bulunan nitroselüloz membrana sabitlendiği yöntem aşağıdakilerden hangisidir?

- A) İmmünobiyosensör                      B) İmmün işaretleme                      C) İmmünokromatografi  
D) ELISA                      E) FIA

#### 8. Aşağıdakilerin hangisi pestisit analizi amacıyla kullanılan başlıca immünojenik yöntemlerden değildir?

- A) İmmünojenik Testler  
B) İmmünojenikler (Biyosensörler)  
C) İmmünokromatografi  
D) İmmün işaretleme  
E) Spektrofotometre

### C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

#### 9. İmmünojenik yöntemlerle pestisit analizi yapmanın diğer pestisit yöntemlerine göre avantajları nelerdir?

.....  
.....  
.....  
.....



# SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ

## 3. Öğrenme Birimi



Hazırlık



Çalışmaları

Spektrofotometrelerin gelişimini  
ve kullanım alanlarını araştırınız.

### KONULAR

- 3.1. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER
- 3.2. SU, TOPRAK GİBİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE KARBAMAT PESTİSİTLERİN TAYİNİ
- 3.3. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİN TARAMA TESTİ OLARAK KULLANIMI

TEMEL KAVRAMLAR  
spektrofotometre, kütle  
spektrometresi, kalibrasyon  
eğrisi, GC – MS cihazı,  
ultrasonik banyo, şırınga

### NELER ÖĞRENECEKSİNİZ?

- Spektrofotometre ile pestisit analizini
- Kalibrasyon eğrisi çizmeyi
- Çevresel örneklerde DC pestisitlerin analizini
- Spektrofotometre ile tarama testlerini



### 3.1. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER

Spektrofotometrik yöntemlerin temel prensibi, çözeltilerde bulunan maddelerin belirli bir dalga boyundaki ışını geçirmesi veya bu ışının ne kadarının çözelti tarafından tutulduğunun bulunması esasına dayanmaktadır.

Çözeltinin içinde aranan maddenin konsantrasyonu ne kadar yüksekse çözelti tarafından tutulan ışın miktarı da o kadar yüksek olur. Maddelerin belirli bir dalga boyundaki ışını tutması, maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri (kaynama noktası, donma noktası, yoğunluk vb.) gibi değişmeyen bir özelliğidir. Çözelti içindeki bütün maddeler ışının bir dalga boyunu tutarken diğerlerini yansıtır veya geçirir. En yüksek hassasiyet, ışığın maksimum absorplandığı dalga boylarında gerçekleşir. Bu nedenle, yapılan ölçümlerde en büyük absorbans değerini veren dalga boyu seçilir. Pestisitlerin spektroskopik yöntemler ile tayininde ultraviyole-görünür bölge spektrofotometri [UV-Vis (Görsel 3.1)] kullanılır. UV-Vis spektrofotometrik yöntemlerde önce organik çözücülerle pestisitlerin bir kompleksi oluşturulduktan sonra tayini gerçekleştirilir.



Görsel 3.1: UV - Vis spektrofotometresi

#### 3.1.1. Spektrofotometrenin Kullanılması

Spektrofotometreler kullanılmaya başlanmadan yaklaşık 10-15 dakika önce açılarak cihazın ısınması sağlanır. Cihazın ısınmasından sonra ölçülecek maddenin ışığı absorpladığı dalga boyu ayarlanır. Spektrofotometrede ölçülecek maddenin 0, 1, 2, 3, 5 ve 10 mg/ml içeren çözelti serileri



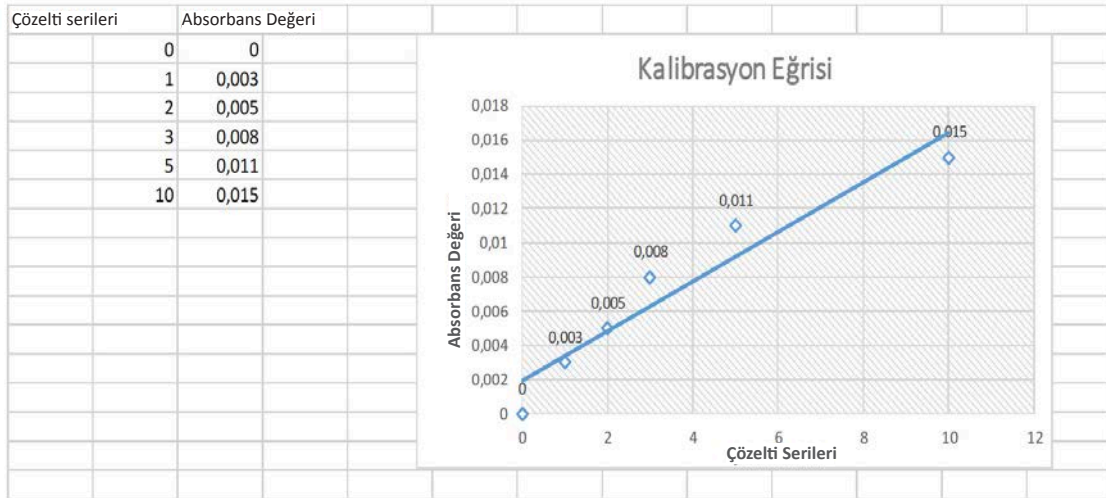
hazırlanır. Spektrofotometrenin sıfır (0) ve yüz (100) ayarı yapılır. Sıfır ayarı şahit (kör) çözelti ile ve yüz ayarı konsantrasyonu en büyük çözelti ile yapılır. Sıfır ve yüz ayarı birkaç kez tekrar edilir. Hazırlanan çözelti serileri spektrofotometrenin küvetlerine doldurularak spektrofotometrede okuması yapılır. Çözelti serilerinin spektrofotometrede okunan absorbands değerleri not edilir ve kalibrasyon eğrisi çizilir. Daha sonra numunenin okuması yapılarak kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyonu belirlenir.

**Not:** Çözelti serileri farklı hacimlerde de hazırlanabilir.

### 3.1.2. Kalibrasyon Eğrisi Hazırlama

Kalibrasyon eğrisi hazırlanırken milimetrik kâğıda, hazırlanan çözelti serilerinin konsantrasyonları yatay eksene "x" ve spektrofotometrede okunan absorbands değerleri dikey eksene "y" yazılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmaktadır. Bazı spektrofotometreler, kalibrasyon eğrilerini otomatik olarak çizer.

**Örnek:** Organik fosforlu bir pestisitinin analiz amacıyla organik fosforlu pestisitten 0, 1, 2, 3, 5 ve 10 mg/ml'lik çözelti serileri hazırlanmış ve spektrofotometrede okuması yapılarak sırasıyla 0, 0.003, 0.005, 0.008, 0.011 ve 0.015 değerleri okunmuştur. Bu çözeltinin kalibrasyon eğrisi oluşturulduğunda Görsel 3.2'deki eğri elde edilmiştir.



Görsel 3.2: Kalibrasyon eğrisi

### 3.1.3. Kalibrasyon Eğrisini Okuma

Çözelti serilerinin okumasından sonra numune çözeltisinin spektrofotometrede okuması yapılır. Spektrofotometrede okunan absorbands değeri, çözelti serileri için hazırlanan kalibrasyon eğrisinde dikey eksene yerleştirilerek kalibrasyon eğrisi yardımı ile numunenin konsantrasyonu belirlenir. Konsantrasyonu belirlenen numunenin kalıntı miktarının kabul edilebilir sınırlar içinde olup olmadığı standartlarla karşılaştırılarak kontrol edilir.

## 1. UYGULAMA

- Görev** : Çözelti serileri hazırlayarak spektrofotometrede okumaları yaptıktan sonra kalibrasyon eğrisi oluşturma  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak kalibrasyon eğrisini oluşturunuz.**
- Araç Gereç** : Balon joje (50 ml'lik 6 adet), pipet, milimetrik kâğıt, spektrofotometre, spektrofotometre küveti, stok standart çözelti

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz (Malzemelerin temiz ve kuru olmasına dikkat ediniz.).
3. Stok standart çözülden sırasıyla balon jodelere 0, 1, 2, 3, 5 ve 10 ml çözelti aktararak hacimlerini saf su ile tamamlayıp standart çözelti serileri hazırlayınız (Aktarma ve hacim tamamlama işlemlerini dikkatli yapınız.).
4. Spektrofotometrenin ölçüm yapılacak dalga boyunu ayarlayınız (Spektrofotometreyi, analize başlamadan 10-15 dakika önce çalıştırınız.).
5. Spektrofotometrenin sıfır (0) ve yüz (100) ayarını yapınız (Sıfır ayarını kör (şahit) çözelti ile yüz ayarını konsantrasyonu en yüksek olan çözelti ile yapınız.).
6. Spektrofotometrenin küvetlerini standart çözelti ile doldurarak okumalarını yapınız (Küvetleri spektrofotometreye düzgün yerleştirdiğinizden emin olunuz.).
7. Spektrofotometrede okuduğunuz absorbans değerleri yardımıyla kalibrasyon eğrisini oluşturunuz.
8. Spektrofotometrede numune çözeltisinin absorbansını okuyunuz ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla numunenin konsantrasyonunu belirleyiniz.
9. Sonuçlarınızı raporlayınız.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

1. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

**ÖLÇÜTLER****DERECELER**

	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Standart çözelti serilerini hazırladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Spektrofotometrenin dalga boyunu ayarladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Standart çözelti serilerinden yararlanarak kalibrasyon eğrisini çizdi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Numunenin okumasını yaparak kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyonunu belirledi.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



## 3.2. SU, TOPRAK GİBİ ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE KARBAMAT PESTİSİTLERİN TAYİNİ

Pestisitlerin kullanımı esnasında bir kısmı havaya karışarak yağmur, kar ve rüzgâr ile başka yerlere taşınmakta ve hedef kitle dışındaki canlıları olumsuz etkilemektedir. Büyük bir kısmı ise bitkilerin üzerinden yağmur, çığ, kar vb. etmenler ile önce toprağa karışır. Toprak ve bitkilerdeki pestisitler ise yağmur, kar ve sulama suları gibi etmenlerle yer altı ve yer üstü sularına karışmaktadır. Bu durum toprakta ve suda yaşayan canlıları olumsuz etkiler ayrıca besin zincirinin en üstünde bulunan insanlar bu ürünlerle beslendiğinde akut veya kronik sorunlar yaşayabilir.

### 3.2.1. Su, Toprak Gibi Çevresel Örneklerde Karbamat Pestisitlerin Tayini

Ditiyokarbamat (DC) pestisitlerinin moleküler spektroskopik yöntemler ile tayininde ultraviyole-görünür bölge spektrofotometri (UV-Vis), kemilüminesans ve Fourier Transform İnfrared (FTIR) teknikleri kullanılır. Ditiyokarbamat (DC) pestisitlerin UV-Vis spektrofotometrik yöntemlerle tayininde pestisit bir kompleksi oluşturulduktan sonra tayini prensibine dayanmaktadır. Ditiyokarbamat (DC) pestisitlerin organik maddelerle kompleks oluşturulduktan sonra pestisit, uygun çözücü varlığında ve pH değerinde organik bir madde eklenir ve oluşan ürünün spektrumundan yola çıkılarak pestisit derişimi belirlenmeye çalışılır. Spektrofotometrik olarak tayin edilebilecek bir kompleks oluşturmanın bir diğer yolu da DC pestisitinin yapısındaki metalin bakır ya da molibden gibi başka bir metal ile yer değiştirmesinin sağlanmasıdır.

Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi [GC-MS (Görsel 3.3)] ile analizi yapılacak bileşik mutlaka buharlaştırılmalıdır. Buharlaştırma işleminde taşıyıcı gaz olarak genelde Helyum (He), Hidrojen (H) veya Azot (N) kullanılır.



Görsel 3.3: GC-MS cihazı

Numunelerin kolonda bozulmasını önlemek için kısa sürede ve küçük hacimlerde ( $\mu\text{l}$ ) kolona enjekte edilmelidir. Numune hızlı bir şekilde buharlaştırılarak gaz fazına dönüştürülerek taşıyıcı gaz ile birlikte kolon içinde sürüklenir. Kolon boyunca, kolon içinde ilk olarak absorbe edilen madde sonradan gelen gaz ile tekrar desorbe edilir ve böylece kolonun değişik noktalarında ve değişik zamanlarda kolon içinde ortaya çıkan gazdaki kirletici parametreler bir dedektör yardımı ile kaydedilir. Parametreler, kaydedicide pik şeklinde grafiğe dökülür. Her bir pik bir kirletici parametreyi ve alanı, kirleticinin konsantrasyonunu ifade eder.



Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi (GC-MS) cihazının pestisit analizleri dışındaki kullanım alanlarını araştırınız.

### 3.2.2. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar

Ultrasonik banyo, katı faz özütleme filtreleri, Kolon (30 m uzunluk x 0,25 mm iç çap x 0,25  $\mu\text{m}$  film kalınlığı), şırınga, 1,5 ml cam şişe ve mini buharlaştırıcı kullanılır.

Gaz olarak yüksek saflıkta helyum (He), yüksek saflıkta azot (N), yüksek saflıkta çözücüler (sikloheksan, heksan,aseton), metanol, trifenil fosfat ( $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$ ), diklorometan (DCM), internal standart (iç standart): 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik pentakloronitrobenzen ( $\text{C}_6\text{Cl}_5\text{NO}_2$ ), vekil standart: (SS1: 2,4,5,6-tetrakloro tetrakloro-m-ksilen ve SS2: Decachlorobiphenyl), DC pestisit; 1,000  $\text{ng}/\mu\text{l}$ 'lik [1 nanogram 0,001 mikrograma ( $\mu\text{g}$ ) eşittir.] derişime sahip DC pestisit karışımı standartlar +4  $^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında saklanır.

### 3.2.3. Numune Hazırlama ve Analizin Yapılışı

**Toprak Örneği:** Analizi yapılacak toprağın büyüklüğüne göre farklı noktalardan ve farklı derinliklerden (0,10-20 cm) toprak numuneleri alınır. Alınan toprak numuneleri uygun kaplara konularak numaralandırılır. Hassas terazide toprak numunelerinden 2 g tartılarak ayrı ayrı tüplere alınır. Üzerine 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  surrogate standart (vekil standart) SS1: 2,4,5,6 tetrakloro-m-ksilen ve SS2: dekaklorobifenil ( $\text{C}_{12}\text{Cl}_{10}$ ) ile üzerine 60 ml heksan: aseton (3:1) karışımı eklenir. Ultrasonik banyoda 2 saat oda sıcaklığında ekstrakte edilip sodyum sülfat kolonundan süzülür. Son hacim olan 1  $\text{ml}$ 'ye getirilmeden üzerine 1,0 ml internal (iç) standart [pentakloronitrobenzen [ $(\text{C}_6\text{Cl}_5\text{NO}_2)$ ], 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] eklenir. Hazırlanan numune şırınga ile GC-MS cihazının kolonuna enjekte edilir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen GC-MS kromatogramı, standartlarla karşılaştırılarak sonuç raporlanır.

**Su Örneği:** Usulüne uygun olarak en az iki numune alınır. Numune alınacak kaplarda hava boşluğu bırakılmamalıdır ayrıca kapların numuneye fiziksel veya kimyasal bir etkisi olmamalıdır. Her bir örnek ikişer kere, katı faz ile ekstrakte edilir. Ekstraksiyon işlemi; disk organik çözücüyle ıslatılır ve 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  surrogate (vekil) standart [SS1: 2,4,5,6-tetrakloro-m-ksilen ve SS2: dekaklorobifenil ( $\text{C}_{12}\text{Cl}_{10}$ )] eklenir. 10 ml diklorometan (DCM), 10 ml metanol, 10 ml deiyonize su geçirilerek disk şartlanır. Daha sonra örnek süzülür. 20 ml DCM eklenir ve süzüntüsü erlene alınır. Süzüntü sodyum sülfat kolonundan süzülerek internal standart pentakloronitrobenzen ( $\text{C}_6\text{Cl}_5\text{NO}_2$ ) eklenir ve son hacim asetonla 1  $\text{ml}$ 'ye tamamlanır. Daha sonra GC-MS cihazı ile analiz edilir ve sonuç raporlanır.



## 2. UYGULAMA

**Görev** : Toprak örneğinde pestisitlerin tayinini yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak pestisitlerin tayinini yapınız.**

**Araç Gereç ve Kimyasallar** : Ultrasonik banyo, GC-MS cihazı, kolon, tüp, şırınga, pipet, mikro pipet, hassas terazi, diklorometan (DCM), iç standart: pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ), vekil standart: [SS1: 2,4,5,6 - tetrakloro - m - ksilen ve SS2: dekaklorobifenil ( $C_{12}Cl_{10}$ )], hegzan: aseton (3:1) karışımı

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz (Malzemelerin temiz ve kuru olmasına dikkat ediniz.).
3. 2 g toprağı ayrı ayrı tartıp tüplere koyunuz ve tüpleri numaralandırınız (Tartım işlemlerini dikkatli yapınız.).
4. Tüplerin üzerine 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vekil standartlardan [SS1: 2,4,5,6 tetrakloro-m-ksilen ve SS2: dekaklorobifenil ( $C_{12}Cl_{10}$ )] ilave ediniz.
5. Üzerine 60 ml hegzan: aseton (3:1) karışımı ekleyiniz.
6. Ultrasonik banyoda iki saat oda sıcaklığında ekstrakte ederek sodyum sülfat kolonundan süzünüz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
7. Zamana riayet ediniz.
8. Son hacim olan 1 ml'ye getirilmeden üzerine 1,0 ml internal (iç) standart [pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ), 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] ekleyiniz.
9. Hazırlanan numuneleri şırınga ile GC-MS cihazının kolonuna enjekte ediniz.
10. Ekstraksiyon sonrası elde edilen GC-MS kromatogramı standartlarla karşılaştırınız.
11. Sonuçlarınızı raporlayınız.

## DERECELEME ÖLÇEĞİ

2. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

## ÖLÇÜTLER

## DERECELER

	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. 2 g toprağı ayrı ayrı tartarak tüplere koydu, tüpleri numaralandırdı ve gerekli kimyasalları ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Ultrasonik banyoda iki saat oda sıcaklığında ekstrakte ederek sodyum sülfat kolonundan süzdü.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Son hacim olan 1 ml'ye getirilmeden üzerine 1,0 ml internal (iç) standart [pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ), 1,0 $\mu g/ml$ ]] ekleyerek cihaza enjekte etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Ekstraksiyon sonrası elde edilen GC – MS kromatogramı standartlarla karşılaştırdı ve sonuçları raporladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## NOT ALINIZ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....





### 3. UYGULAMA

**Görev** : Su örneğinde pestisit tayini yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak pestisit tayinini yapınız.**

**Araç Gereç ve Kimyasallar** : Ekstraksiyon cihazı, GC-MS cihazı, filtre, erlen, 2, 4, 5, 6 - tetrakloro-m-ksilen, dekalorobifenil ( $C_{12}Cl_{10}$ ), diklorometan (DCM), metanol, deiyonize su, aseton ve pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ) kullanılır.

#### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Çalışacağınız araç gereçleri kullanıma hazır hâle getiriniz (Malzemelerin temiz ve kuru olmasına dikkat ediniz.).
3. Su örneklerini ikişer kere, katı faz ile ekstrakte ediniz (Ekstraksiyon işlemi dikkatli yapınız.).
4. Diski organik çözücüyle ıslatınız ve 1,0 µg/ml surrogate (vekil) standart [SS1: 2,4,5,6 -tetrakloro-m-ksilen ve SS2:dekalorobifenil ( $C_{12}Cl_{10}$ )] ekleyiniz.
5. 10 ml diklorometan (DCM), 10 ml metanol, 10 ml deiyonize su geçirerek diski şartlayınız.
6. 20 ml DCM ekleyerek süzüntüyü erlene alınız (Süzme işlemi hassas yapınız.).
7. Süzüntüyü sodyum sülfat kolonundan süzerek internal standart pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ) ekleyiniz.
8. Son hacmi asetonla 1 ml'ye tamamlayarak GC-MS cihazı ile analiz ediniz.
9. Sonuçlarınızı raporlayınız.

## DERECELEME ÖLÇEĞİ

3. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

## ÖLÇÜTLER

## DERECELER

	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Su örneklerini ikişer kere, katı faz ile ekstrakte etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Diski organik çözücüyle ıslattı ve gerekli kimyasalları ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Süzüntüyü sodyum sülfat kolonundan süzerek internal standart pentakloronitrobenzen ( $C_6Cl_5NO_2$ ) ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Son hacmi asetonla 1 ml'ye tamamlayarak GC-MS cihazı ile analiz edip sonuçları raporladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## NOT ALINIZ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



### 3.3. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERİN TARAMA TESTİ OLARAK KULLANIMI

Spektrofotometre ile pestisit tayinleri; pestisitlerin çeşitli organik çözücülerle ekstrakte edilmesi ve aranacak pestisit belirlenen bir dalga boyundaki spektrofotometrede okunması temeline dayanmaktadır. Özellikle teknolojik gelişmelere paralel olarak geliştirilen gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) ile pestisitlerin analizi daha hassas yapılabilmektedir.

Yöntem, domateste kalıntı miktarı araştırılan ditiyokarbamat (DTC) olan mankozebin kalay klorür ( $\text{SnCl}_2$ ) katalizöründe asit ve sıcaklık etkisi ile yıkıma uğratarak açığa çıkarılan karbondisülfür'ün ( $\text{CS}_2$ ) izo-oktan fazında tuzaklanması ve tuzaklanan  $\text{CS}_2$  miktarının GC-MS cihazında tespit edilmesi esasına dayanır.

#### BİLGİ KÖŞESİ

##### Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometer)

Kütle spektrumu, örnekteki bileşiklerin kolaylıkla hareket edebilen iyonlara (çoğunlukla pozitif) dönüştürülmesi ve bu iyonların kütle / yük oranına göre sıralanmasıyla elde edilir. Spektral veriler, bazı bakımlardan infrared ve NMR spektrallardan daha kolay tanımlanır çünkü bilgiler bir örneğin yapısal bileşiminin moleküler kütlesi cinsinden ifade edilir. Bunun yanı sıra verilerden analitin molekül ağırlığı da doğru olarak saptanabilir.

Kütle spektresi kompleks karışımların kantitatif analizlerinde de kullanılır. İlk gerçek analitik uygulama 1940 yılında kompleks hidrokarbon karışımlarındaki bileşiklerin kantitatif tayinine yönelik yapıldı. Çalışmalar sonucunda kütle spektrometresinin bu tip analizler için çok değerli bir cihaz olduğu ispatlanmış ve yöntem petrol endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

#### 3.3.1. Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar

GC-MS cihazı, blender, balon joje, hassas terazi, amber renkli şişe, amber renkli vial, otomatik pipet, mikro pipet, derişik hidroklorik asit (HCl), izo-oktan ve su banyosu kullanılır.

**Kalay klorür ( $\text{SnCl}_2$ ) Çözeltisi:** 1 litrelik cam balon içinde 20 g  $\text{SnCl}_2$ , 50 ml derişik (%35-37) hidroklorik asit ile çözdürüldükten sonra balon joje hacim çizgisine kadar deiyonize su ile tamamlanır. Çözelti günlük hazırlanır.

**Karbondisülfür ( $\text{CS}_2$ ) Standart Çözeltileri:** Yüksek konsantrasyon 10,00 ve 5,00; orta konsantrasyon 1,00 ve 0,50; düşük konsantrasyon olarak ise 0,10 ve 0,05 ml/l düzeylerinde izo-oktan fazında hazırlanır. Bu standartlar sırasıyla 12,632, 6,316, 1,263, 0,32, 0,126 ve 0,063 mg  $\text{CS}_2$ /l izo-oktana eşittir.

#### 3.3.2. Analizin Yapılışı

Yaklaşık 200 g domates örneği, blender kullanılarak yüksek devirde 3 dakika homojenize edilir ve  $50 \pm 0,1$  g hassasiyetle tartılarak amber renkli laboratuvar şişesine konur. Üzerine 40 ml izo-oktan ve 100 ml  $\text{SnCl}_2$  çözeltisi ilave edilir. Daha sonra laboratuvar şişesinin kapağı kapatılır ve şişe  $80^\circ\text{C}$  sıcaklık ve 100 devir/dakika hızdaki çalkalamalı su banyosunda 60 dakika çalkalanır. Süre sonunda laboratuvar şişesi su banyosundan alınarak oda sıcaklığına kadar hızla soğutulur ve üst izo-oktan fazından otomatik pipet yardımıyla 2 ml amber renkli bir vial alınır ve GC-MS cihazına 2 µl hacminde enjeksiyon yapılır.

4. UYGULAMA

**Görev** : Spektrofotometrik yöntemle tarama testi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak tarama testini yapınız.**

**Araç Gereç ve Kimyasallar** : GC-MS cihazı, blender, balon joje, hassas terazi, amber renkli şişe, amber renkli vial, otomatik pipet, mikro pipet, derişik hidroklorik asi (HCl), izo-oktan, kalay klorür ( $\text{SnCl}_2$ ) çözeltisi, karbondisülfür ( $\text{CS}_2$ ) çözeltisi ve çalkalamalı su banyosu

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Çalışacağınız araç gereci kullanıma hazır hâle getiriniz (Malzemelerin temiz ve kuru olmasına dikkat ediniz.).
3. 200 g domates örneğini blenderden geçirerek homojen hâle getiriniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
4.  $50 \pm 0,1$  g'ı hassasiyetle tartarak amber renkli laboratuvar şişesine koyup üzerine 40 ml izo-oktan ve 100 ml  $\text{SnCl}_2$  çözeltisi ilave ediniz.
5. Laboratuvar şişesinin kapağını kapatıp şişeyi  $80^\circ\text{C}$  sıcaklık ve 100 devir/dakika hızdaki çalkalamalı su banyosunda 60 dakika çalkalayınız (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
6. Laboratuvar şişesini su banyosundan alarak oda sıcaklığına kadar hızla soğutunuz (Soğutma işlemini akan musluk altında yapınız.).
7. Soğuttuğunuz şişenin üst kısmındaki izo-oktan fazından otomatik pipetle 2 ml alarak amber renkli vial aktarınız.
8. GC-MS cihazına 2  $\mu\text{l}$  hacminde enjeksiyon yaparak numuneyi analiz ediniz.
9. Sonuçlarınızı raporlayınız.



## DERECELEME ÖLÇEĞİ

4. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Homojen hâle getirdiği numuneden 50±0.1 g'ı hassasiyetle tartarak amber renkli laboratuvar şişesine aktardı ve üzerine gereken kimyasalları ilave etti.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Laboratuvar şişesinin kapağını kapatarak şişeyi 80 °C sıcaklık ve 100 devir/dakika hızdaki çalkalamalı su banyosunda 60 dakika çalkaladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Soğuttuğu şişenin üst kısmındaki izo-oktan fazından otomatik pipetle 2 ml alarak amber renkli vialere aktardı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. GC-MS cihazına 2 µl hacminde enjeksiyon yaparak numuneyi analiz etti ve sonuçları raporladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## NOT ALINIZ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

### A) Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Maddelerin belirli bir dalga boyundaki ışını geçirmesi veya bu ışının ne kadarının çözelti tarafından tutulduğu ..... ile ölçülür.
2. Maddelerin belirli bir dalga boyundaki ..... tutması, maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri gibi değişmeyen bir özelliğidir.
3. Pestisitlerin spektroskopik yöntemler ile tayininde ..... görünür bölge spektrofotometri kullanılmaktadır.
4. Pestisitler yağmur, kar ve rüzgâr ile başka yerlere taşınmakta ve ..... dışındaki canlıları olumsuz etkilemektedir.
5. Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi (GC-MS) ile analizi yapılacak bileşiğin kolonda bozulmasını önlemek için kısa sürede ve küçük hacimlerde ( $\mu\text{l}$ ) kolona ..... edilmelidir.
6. Spektrofotometrik yöntem ile pestisit tayinleri; pestisitlerin çeşitli ..... çözücülerle, ekstrakte edilmesi ve belirli bir dalga boyundaki spektrofotometrede okunması temeline dayanmaktadır.

### B) Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

#### 7. Toprak numuneleri ultrasonik banyoda kaç saat ekstrakte edilir?

- A) 1/2 saat                      B) 1 saat                      C) 2 saat  
D) 3 saat                      E) 4 saat

#### 8. Aşağıdaki kimyasal maddelerden hangisi su örneğinde pestisit aranmasında kullanılmaz?

- A) Metanol                      B) Hegzan-aseton karışımı                      C) Dekaklorobifenil  
D) Diklorometan                      E) Pentakloronitrobenzen

### C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

9. Pestisit analizi amacıyla 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 5.0 mg/ml içeren çözelti serileri hazırlanmış ve spektrofotometrede okutularak elde edilen absorbans değerleri sırası ile 0.0, 0.001, 0.003, 0.005, 0.008 ve 0.012 değerleri okunmuştur. Numunenin absorbans değeri ise 0.004 okunduğuna göre numunenin pestisit içeriğini kalibrasyon grafiği çizerek bulunuz.

.....  
.....  
.....  
.....

#### 10. Çevresel faktörlerde yapılan pestisit analizlerinin önemini açıklayınız.

.....  
.....  
.....  
.....

# KROMATOGRFİK YÖNTEMLERLE PESTİSİT ANALİZLERİ

## 4. Öğrenme Birimi



### Hazırlık



### Çalışmaları

1. İnsan ve çevre sağlığını etkileyen maddelerin tesbitinde kullanılan yöntemleri araştırınız.
2. Kromatografik yöntemlerin kullanım alanlarını araştırınız.

### KONULAR

- 4.1. KROMATOGRFİK YÖNTEMLER
- 4.2. İNCE TABAKA KROMATOGRFİSİ (TLC)
- 4.3. GAZ KROMATOGRFİSİ (GC)
- 4.4. SIVI KROMATOGRFİSİ (SC)
- 4.5. KÜTLE SPEKTROMETRİ (MS)
- 4.6. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRFİSİ (HPLC)

### TEMEL KAVRAMLAR

kromatografi, spektrometre, GC-MS cihazı, HPLC cihazı, dedektör, kolon fırını, kolon, dragesser, pompa sistemleri, numune enjeksiyon sistemi

### ÖĞRENİLECEKLERİ

- Kromatografik yöntemlerini
- İnce tabaka kromatografisini
- Gaz Kromatografisinin çalışma prensibi ve kullanım alanlarını
- Sıvı Kromatografisi ve kullanım alanlarını
- Kütle spektrometrinin çalışma prensibi ve kullanım alanlarını
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin çalışma prensibini ve kullanım alanlarını



## 4.1. KROMATOGRFİK YÖNTEMLER

Pestisit analizlerinde kullanılan ana yöntem kromatografidir. **Kromatografi**, karışım hâlindeki maddelerin hareketli ve sabit fazlar arasında dağılımına ve bu fazlarla etkileşimine dayalı olarak ayrılması tekniğidir.

Kimyasal bileşik karışımlarını ayırmak ve arıtmak için iki önemli teknik vardır. Bu teknikler damıtma ve kromatografidir. Damıtma, farklı sıcaklıklarda kaynayan bileşikleri ayırır. Ne var ki birçok karışımın bileşenleri (özellikle biyolojik örnekler) ısıtıldıkları zaman bozulmaktadır. Bazıları aynı sıcaklıkta kaynar, bir bölümü de çok küçük miktarlarda bulunur. Bu nedenle karışımların sıvılardaki çözünürlüklerinden ya da katı maddelerin yüzeylerine tutunma farklılıklarından yararlanarak ayrılmasını sağlayan kromatografiler geliştirilmiştir (Görsel 4.1).



Görsel 4.1: kromatografi cihazı

### 4.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Çalışma Prensipleri

**Yöntemin Temel Prensipleri:** Analitin sabit fazın, hareketli faz ile etkileşime girmesi ve sabit fazda farklı hızlarla hareket etmesi prensibine dayanır. Böylece her maddeye özel sabit fazda kalma süresi (alınma zamanı) söz konusudur ve kromatografi yöntemi ile çok geniş yelpazedeki maddelerin analizi hassas ve spesifik bir şekilde yapılabilmektedir. Kromatografi tekniğinin temelinde üç ana unsur yer alır. Bu unsurlar şunlardır:

**Sabit Faz:** Kromatografide, bir kolon içine veya düz bir yüzeye tutturulmuş faza sabit faz (hareketsiz faz; durgun faz; stasyoner faz) denir. Bu faz daima bir "katı" veya bir katı destek üzerine emdirilmiş bir "sıvı" tabakasından oluşur.

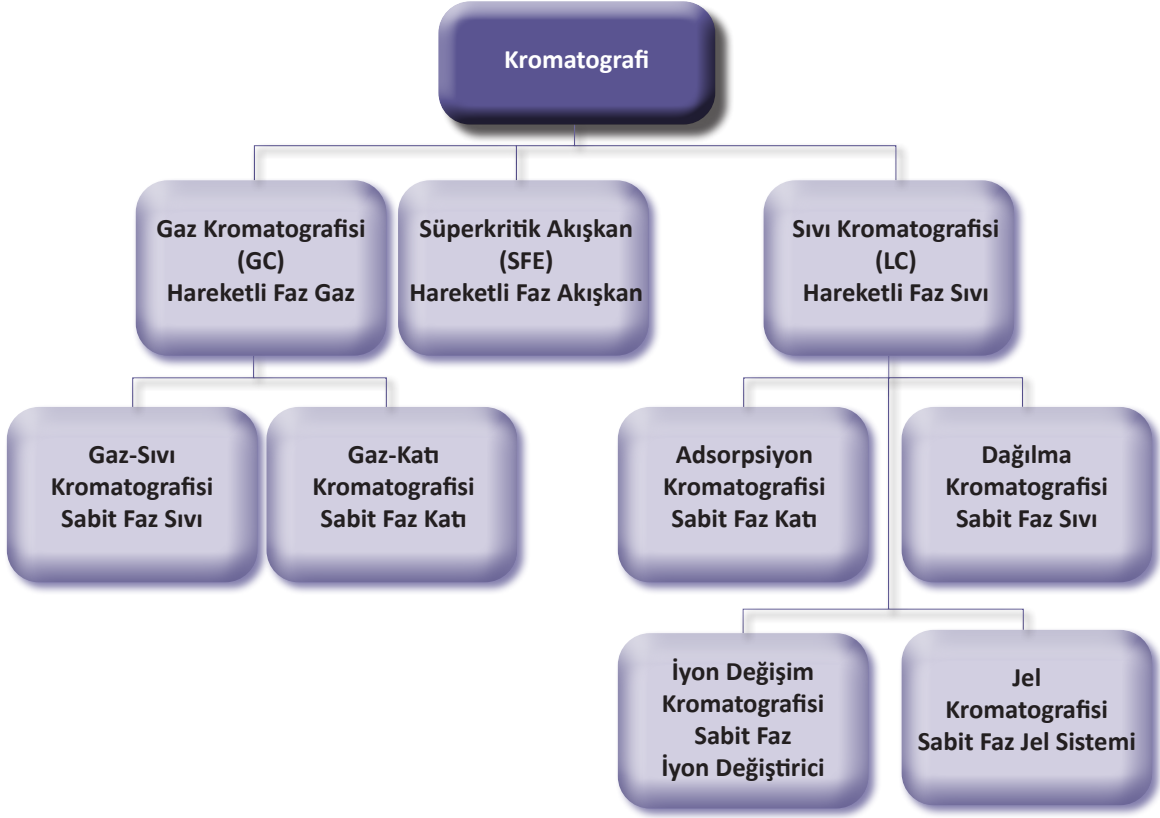
**Hareketli Faz:** Sabit fazın üzerinden veya arasından geçen faza **hareketli faz (sürükleyici faz, mobil faz)** denir. Bu faz daima bir "sıvı" veya "gazdan" oluşur.

**Sabit Faz, Hareketli Faz ve Karışımında Yer Alan Maddeler Arasındaki Etkileşimin Türü:** Kromatografide "yüzey tutunması veya adsorpsiyon" ile "çözünürlük" olguları temel etkileşim türlerini oluşturur.





Tablo 4.1: Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması



kromatografik yöntemlerin çalışma prensibi ile ilgili sunum hazırlayınız.

#### 4.1.2. Kromatografik Yöntem Çeşitleri ve Kullanılan Cihazlar

Pestisit analizlerinde kullanılan kromatografik yöntemler şunlardır:

- Kâğıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Gaz kromatografisi (GC)
- Sıvı kromatografisi (SC),
- Kütle spektrometresi (MS)
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Uygulanması en basit ve en çok kullanılan yöntemlerden biri olan kâğıt kromatografisinde, çoğunlukla özel yapım süzgeç kâğıtları kullanılır. Burada etkin mekanizma, dağılımadır. Süzgeç kâğıdı suyu çok kolay ve kuvvetle adsorbladığından yapılarında doğal olarak bir miktar su vardır ve sabit sıvı faz rolünü oynar. Kâğıda uygulanan maddeler karışımının birbirlerinden ayrılmaları, kâğıt üzerinde hareket eden çözücüyle kâğıdın içerdiği su arasındaki dağılıma farkına bağlıdır.

Analizi yapılacak madde, çözelti hâlinde olmalı ve katılar uygun bir çözücüde çözünmelidir. Çözeltiler belli bir konsantrasyonda olmalıdır (En az %1'lik çözelti kullanılmalıdır.).

## 1. UYGULAMA

**Görev** : Kromatografik yöntem çeşitleri ve kullanılan cihazlarla ilgili sunum hazırlama'  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak sunumunuzu hazırlayınız.**

**Araç Gereç** : Bilgisayar, genel ağ bağlantısı

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları özenle yapınız.
3. Çalışacağınız araç gereci (bilgisayar, internet vb.) kullanıma hazır hâle getiriniz.
4. Sunum hazırlama kurallarına uyunuz.
5. Sunumunuzda kullanacağınız cümlelerin net ve anlaşılır olmasına dikkat ediniz.
6. Sunumunuzu hazırlarken canlı renkler ve sunuma uygun yazı puntosunu kullanınız.
7. Sunum sonunda dinleyicilere soruları olup olmadığını sorunuz.
8. Dinleyicilere teşekkür ederek sunumu bitiriniz.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

1. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Konu ile ilgili gerekli araştırmaları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Sunum hazırlama kurallarına uydu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Sunumu dinleyicilere sundu.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Sunumda zamanı doğru kullandı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



## 4.2. İNCE TABAKA KROMATOGRFİSİ (TLC)

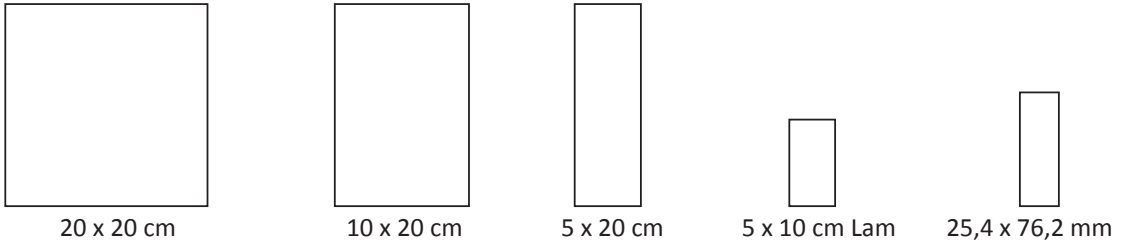
İnce tabaka kromatografisi, bir "katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisi"dir. Bu yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki cam plakalar üzerine ince bir tabaka hâlinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Bu kromatografi türünde, hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi aşağıdan yukarıya doğrudur. Çözücü, kılcallık etkisi ile içine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür.

### 4.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine Hazırlık

İnce tabaka kromatografisinde öğütülmüş bir malzeme, cam veya plastik bir plakaya belirli bir kalınlıkta kaplanır ve böylece üzerinde gözenekler olan aktif yüzeyli bir sabit faz oluşturulur. Bu işlem yapılırken kaplama malzemesinin bir çözücünde süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyon cam veya plastik üzerine dökülerek yüzey kaplanır. Ardından çözücü buharlaştırılır ve böylece yüzeyde sadece kaplama malzemesi kalır. Kaplama malzemesi, kullanılacak mekanizmaya göre belirlenir. Genellikle asidik karakterli maddeler için asidik adsorplayıcılar; bazik karakterli maddeler için de bazik adsorplayıcılar kullanılır (Asidik maddeler için silika jel; bazik maddeler için alüminyum oksit, talk vb. kullanılır.).

#### Adsorplayıcı Tabaka Kalınlığı ve Kurutulması

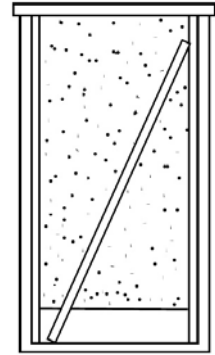
İnce tabaka kromatografisinde kullanılan cam levhaların boyutları; 5 x 10 cm, 5 x 20 cm, 10 x 20 cm, 20 x 20 cm'dir. Adsorplayıcı tabakanın kalınlığı, yapılacak analizin cinsine göre değişmektedir. Bu kalınlık 0,25-2 mm arasındadır (Görsel 4.2). Plakalar kullanılmadan önce 110 °C'deki etüvde 2 saat kurutulur ve hemen kullanılır.



Görsel 4.2: İnce tabaka kromatografisi plakaları

#### Adsorplayıcı Tabakanın Özellikleri

- Oldukça çok miktarda madde tutabilmelidir.
- Üzerinde adsorbe olmuş madde, başka çözücüler kullanılarak kolaylıkla geriye alınabilmelidir.
- Ayrılacak maddelerle ve çözücülerle kimyasal bir reaksiyona girmemelidir.
- Renklendirici ayıraçlarla reaksiyona girmemelidir.
- Yapısı, çözücünün rahatlıkla geçmesine elverişli olmalıdır.



Görsel 4.3: İnce tabaka kromatografisi çözücü tank iç kesiti

#### Kromatografi Kapları

Örneklerin plakalara uygulanması ve geliştirilmesi, kâğıt kromatografisinde olduğu gibidir. İnce tabaka kromatografisinde geliştirme, aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilmelidir (Görsel 4.3.).



İnce Tabaka Kromatografisinde yöntemin çalışma prensibi ve uygulama alanları konusunda araştırma yaptırılarak sunum hazırlanır.

### 4.2.2. İnce Tabaka Kromatografisinde Analiz

İnce tabaka kromatografisi, hem nitel (kalitatif) hem de nicel (kantitatif) analizlerde kullanılır. İnce tabaka kromatografisinde plakaya, incelenecek karışımın çözeltisinden ve karşılaştırılacak standartların çözeltisinden kapiler ile damlatılır. Daha sonra plaka, uygun bir çözücü veya çözücü karışımıyla yürütülür. Örnekteki lekeler ile standart lekeler karşılaştırılarak örnekte hangi standartlardan olduğu belirlenir. Böylece, incelenen örneğin nitel analizi yapılmış olur.

Bir karışımın bileşenlerinin hangi miktarlardan oluştuğunu belirlemek için kullanılan nicel (kantitatif) analiz uygulamalarında ise ayrımı yapılacak karışım, ince tabaka kromatografisi plakasının başlangıç çizgisi üzerine damlatılır. Daha sonra plaka, uygun bir çözücü veya çözücü karışımı ile yürütülür. Birbirinden ayrılan lekelerin etrafı sert bir cisimle çizilerek plakadan sabit faz ile birlikte kazınır ve ayrı ayrı kaplarda toplanır. Uygun bir çözücü ile çözülür. Çözelti süzülerek madde sabit fazdan ayrılır. Çözeltideki çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve kalan madde tartılarak madde miktarı belirlenir.

### 4.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi ile İndikatörlerin Analizi

İnce tabaka kromatografisi ile çeşitli indikatörlerin gecikme faktörü ( $R_f$  değerleri) belirlenerek bilinmeyen indikatör karışımının nitel analizi yapılır.

#### Kullanılan Araç Gereç

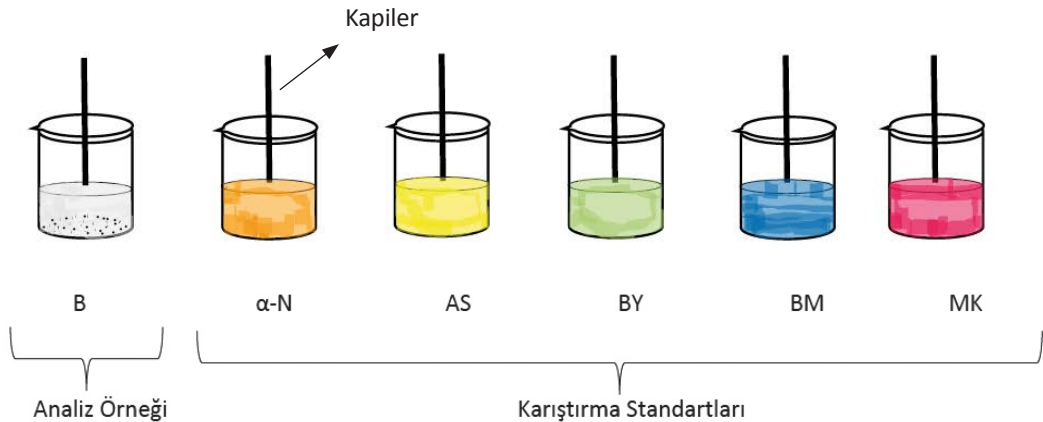
İnce tabaka kromatografisi ile indikatörlerin analizinde beher, erlen, ince tabaka plakası, kapiller cam boru, kurşun kalem, cetvel, pens ve saat camı kullanılır.

#### Kullanılan Kimyasallar

İnce tabaka kromatografisi ile indikatörlerin analizinde  $\alpha$ -Naftalin, metil kırmızısı, bromkrezol yeşili, bromtimol mavis ve alizarin sarısı kullanılır.

#### Standartların Hazırlanması

Analiz örneği (B) olarak, 10 ml'lik bir beher içine bilinmeyen indikatör karışımı alınır ve B olarak işaretlenir. Karşılaştırma standardı olarak, 10 ml'lik beş behere ayrı ayrı  $\alpha$ -naftalin ( $\alpha$ -N), alizarin sarısı (AS), bromkrezol yeşili (BY), bromtimol mavis (BM) ve metil kırmızısı (MK) indikatörlerinin 0,1g/100 ml çözeltilerinden beşer ml konulur. Ardından beherler sırasıyla  $\alpha$ -N, AS, BY, BM ve MK şeklinde etiketlenir (Görsel 4.4).

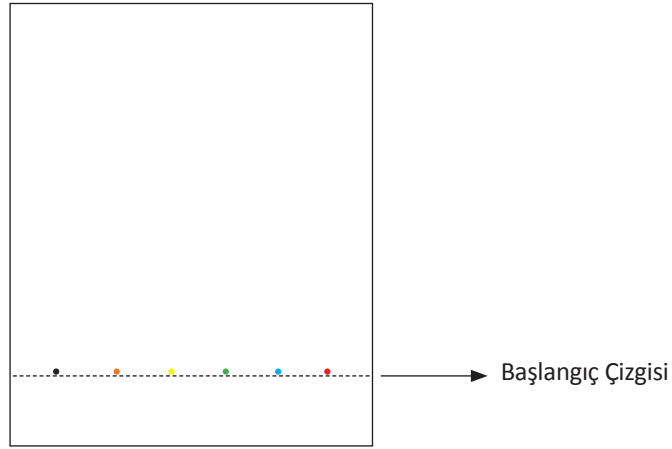


Görsel 4.4: İnce tabaka kromatografisi analizi yapılacak standart çözeltiler



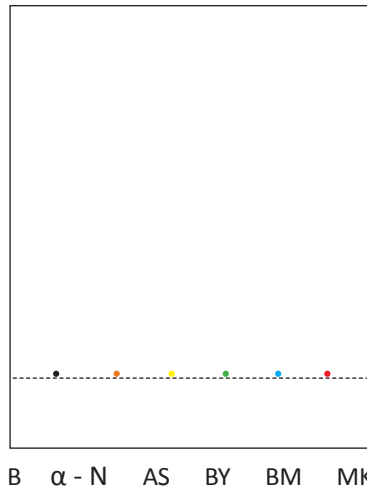
Sonra bir erlene 10 ml etil alkol çözeltisi ve 20 ml petrol eteri (40-60 °C) konularak hareketli faz hazırlanır. İnce tabaka kromatografisi plakasına çizilen başlangıç çizgisini geçmeyecek şekilde bu çözücü karışımından 250 ml'lik bir behere eklenir. Beherin ağzı bir saat camı ile kapatılır (Kromatografik analiz başlatılmadan önce yürütme kabında çözücü veya çözücü karışımı, buharıyla dengeye getirilir. Bunun için çözücü veya çözücü karışımı, analizden 5-10 dakika önce yürütme kabına konulur ve ağzı saat camı ile kapatılır.).

7 x 10 cm ölçülerindeki ince tabaka kromatografisi plakasının alt tarafından 1,5 cm yukarıya, yumuşak kurşun kalemle bir başlangıç çizgisi çizilir (Görsel 4.5). Bu çizgi üzerine 1 cm aralıklarla altı tane nokta işaretlenir. Bu noktaların altına beherlerdeki etiketler sırasıyla yazılır (Başlangıç çizgisi çizilirken ve noktalamalar yapılırken silikajel yüzeyinin aşınmamasına dikkat edilmelidir.).



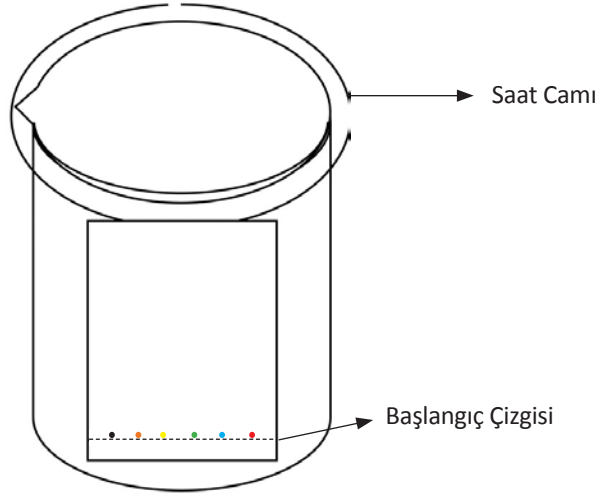
**Görsel 4.5:** İnce tabaka kromatografisinde başlangıç çizgisi ve maddelerin kapiler ile damlatılacakları yerler

Kapiler cam boru ile tüm beherlerden bir miktar çözelti alınarak kâğıt üzerindeki ilgili noktaya damlatılır (Görsel 4.6). Damlatma sonunda oluşan noktaların büyüklüklerinin aynı olmasına dikkat edilmelidir (Her çözelti için ayrı kapiler kullanılmalıdır. Aksi hâlde kapiler içinde kalan bir çözelti diğeriyle karışabilir ve bu durum analizde hatalara neden olabilir.).



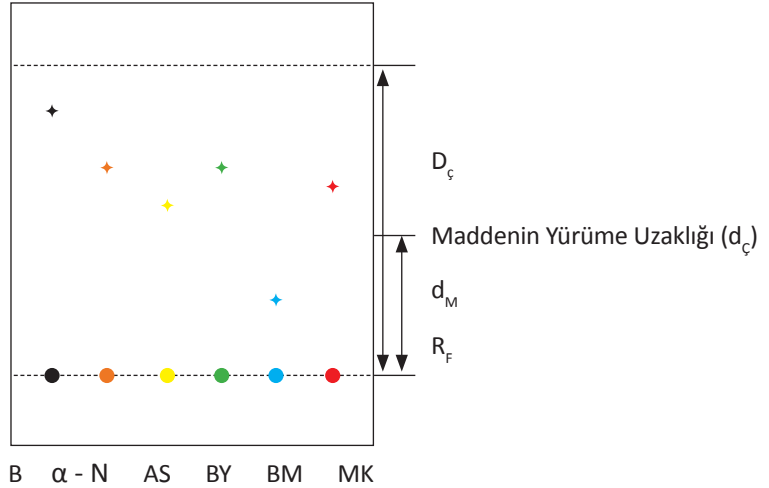
**Görsel 4.6:** İnce tabaka kromatografisinde maddelerin kapiler ile damlatılması

Hazırlanan ince tabaka kromatografisi plakası, çözücü ile doldurulmuş behere konulur. Beherin üzeri saat camı ile kapatılır. Çözücü ince tabaka kromatografisi plakasının üst sınırından 1 cm uzaklık kalıncaya kadar yürütülür (Görsel 4.7).



Görsel 4.7: İnce tabaka kromatografisinde yürütme işlemi

Yürütme işlemi bittiğinde kâğıt bir pens yardımıyla beherden çıkartılır. Çözücünün ve maddelerin ulaştığı uzaklıklar kurşun kalem ile işaretlenir. Bu uzaklıklar cetvel ile ayrı ayrı ölçülür (Görsel 4.8).



Görsel 4.8: İnce tabaka kromatografisinde yürütme işlemi sonucu görünüşü

#### 4.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi Hesaplamaları

Analiz sonucunda oluşan her leke için gecikme faktörü (Rf değerleri) aşağıdaki eşitlik kullanılarak ayrı ayrı hesaplanır. Karışımdaki lekelerin Rf değerleri ile karşılaştırma standartları (α-N, AS, BY, BM ve MK) lekelerinin Rf değerleri karşılaştırılır.

$$\text{Gecikme Faktörü } R_f = \frac{\text{Maddenin Yürüme Uzaklığı } d_{\text{MADDE}}}{\text{Çözücünün Yürüme Uzaklığı } d_{\text{ÇÖZÜCÜ}}} =$$

Gecikme faktörü (RF) sabit fazın kalınlığına ve çözeltilerin derişimine bağlıdır.



## 2. UYGULAMA

**Görev** : İnce tabaka kromatografisi ile indikatör analizi yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak analizi yapınız.**

**Araç Gereç** : Beher, erlen, ince tabaka kromatografi plakası, ince cam boru (kapiler), kurşun kalem, cetvel, pens, saat camı, etil alkol, petrol eteri,  $\alpha$ -naftalin, bromkresol yeşili, metil kırmızısı, bromtimol mavisi ve alizarin sarısı

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Numune çözeltisini hazırlayınız.
3. Standart indikatör çözeltileri hazırlayınız.
4. Hareketli fazı hazırlayarak behere ekleyiniz.
5. İnce tabaka kromatografi plakasını hazırlayınız.
6. Kapiler cam boru yardımıyla analiz ve standart çözeltileri, plaka üzerindeki ilgili noktalara damlatınız.
7. İnce tabaka kromatografi plakasını çözücü dolu behere yerleştiriniz ve bekleyiniz.
8. Yürütme işlemi bittikten sonra plakayı pens yardımı ile beherden alarak kurumasını bekleyiniz.
9. Çözücünün ( $d_c$ ) ve maddenin ( $d_M$ ) ulaştığı uzaklıkları ölçünüz.
10. Gecikme faktörü ( $R_f$ ) değerini hesaplayınız.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

2. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Numune ve standart numune çözeltilerini hazırladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. İnce tabaka kromatografi plakasını hazırladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Kapiler ile numune ve standart çözeltilerini ilgili yerlere damlattı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Gecikme faktörünü hesapladı.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

### 4.3. GAZ KROMATOĞRAFİSİ (GC)

Gaz kromatografisi, uçucu karışımların ayrılması ve analizi için kolaylıkla uygulanabilen basit bir tekniktir. Gaz kromatografisi için az miktarda numune yeterlidir. Bu metotla karışımlar büyük bir oranda birbirinden ayrılır.

Gaz kromatografisine konan numune içindeki maddeler, azot helyum gibi özel bir gazla sabit faz içinden sürüklenir. Bu arada numune içindeki gazlar, sabit fazla aralarındaki ilgiye göre az veya çok tutulur. Tutulma aslında bir frenlemedir. Bazıları çok bazıları az frenlenir. Gazların sabit fazla hareketli faz arasında dağılımlarında çözünürlük, bağlanma, adsorplanma, moleküler çözülebilme gibi olaylar etkili olmaktadır.

Her maddenin sabit fazla tutulma oranı farklıdır. Bazıları az bazıları ise çok tutulur. Fazlar, sıcaklık ve kolon uzunluğu sabit tutularak çeşitli maddelerin piklerini ihtiva eden cetveller yapılır. Bilinmeyen numuneler içindeki maddeler bu cetvellerden yararlanılarak analiz edilir.

Başlıca iki tür gaz kromatografisi vardır. Bunlar gaz-sıvı dağılıma kromatografisi ve gaz-katı adsorpsiyon kromatografisidir. Gaz kromatografisinde kolon sıcaklığı, maddelerin ayrılabilmesi için uygun değere ayarlanır. Bir bileşenin kolonda ilerleme hızı o bileşenin buhar basıncıyla orantılıdır. En uçucu bileşen en hızlı hareket eder ve böylece daha düşük buhar basınçlı diğer bileşenlerden ayrılır. Gaz kromatografisinin en önemli parçalarından biri de dedektördür. Alev iyonlaşmalı dedektör ve termal iletkenlik dedektörü yaygın olarak kullanılır.

#### 4.3.1. Gaz kromatografisi (GC) Yönteminin Çalışma Prensipleri, Kullanım Alanları ve Gaz Kromatografisini Oluşturan Bölümler

**Yöntemin Çalışma Prensipleri:** Yaş sebze, meyve, bal, tahıllar, süt ve süt ürünlerindeki pestisit kalıntılarının asetronitril,  $MgSO_4$ , NaAc, PSA ve GCB kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrakte edilmesi, GC-MSMS ile tesbit edilmesi prensibine dayanır.

**Gaz Kromatografisini Oluşturan Bölümler:** Gaz kromatografi aleti oldukça basittir. Sistem, belli başlı beş kısımdan oluşur. Bu kısımlar şunlardır:

**Numune Enjekte Etme Kısımı:** Ayrımı istenen karışım, bir enjektör yardımıyla enjeksiyon kısmına enjekte edilir. Enjekte edilen numune miktarı 0,2-10  $\mu$ l'dir. Gaz numuneler için bu miktar 0,001  $\mu$ l'dir.

**Isıtma Kısımı:** Enjektör bölümü ısıtılmış durumdadır. Karışım hemen buharlaşır ve buhar hâlinde inert (başka maddelerle kimyasal reaksiyona girmeyen) taşıyıcı gaz ile birlikte kolona girer.

**Taşıyıcı Gaz Kısımı:** Kolonda her bileşik kaynama noktasına, molekül büyüklüğüne ve kolondaki sabit faz ile etkileşimine bağlı olarak kolonda farklı hızlarda göç ederek devamlı taşınır. Böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkar.

**Kolon:** Kolon uzunluğu 2-100 m ve çapı 10-30 cm'dir. Farklı malzemelerden yapılır. Bakır, alüminyum, teflon, paslanmaz çelik, cam ve eritilmiş silicadan yapılmış çeşitleri vardır. Kolondan çıkan her bir bileşen dedektöre girer.

**Dedektör ve Yazıcı:** Her bileşik alıkonma zamanı ile belirlenir. Alıkonma zamanı, bir bileşiğin enjekte edilmesinden dedektörden çıkışına kadar geçen süredir. Bu süre her bileşik için farklıdır. Dedektörde bileşenlerin miktarı ile orantılı olarak belirlenir ve kaydedicide grafik olarak çizilir.



Gaz kromatografisi (GC) oluşturan bölümleri ve kullanım alanları hakkında araştırma yaparak bir sunum hazırlayınız.





### 4.3.2. Gaz Kromatografisi (GC) Uygulamaları İçin Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) İşlemleri

#### Kullanılan Araç Gereç

Hassas terazi, teflon kapaklı cam vial (1,5 ml'lik), blender, rondo, otomatik pipet (10-100 µl, 100-1000 µl), PP tüp (15-50 ml), santrifüj, cam vial (40 ml) kullanılır.

#### Kullanılan Kimyasallar

Asetik asit, asetonitril, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum asetat (NaAc), polimer seconder amin (PSA), grafize karbon blank (GCB), pestisit standartları, % 1 asetik asitli asetonitril (v/v): 1000 ml'lik balon jöjeye 10 ml asetik asit alınarak çizgisine asetonitril ile tamamlanır. Ekstraksiyon aşamasında metot, prosedürlerine uygun olarak hazırlanmış özel kitlerde kullanılabilir.

#### Standartların Hazırlanması

Standart çözeltiler 500 µg/l ara stok çözeltilisinden belirlenen derişimlerde hazırlanır.

#### Kalibrasyonun Tablosunun Oluşturulması

Blank, 10, 30, 50, 100, 200, 400 µg/l standartlar matriks içinde hazırlanıp cihaza verilerek bu konsantrasyonlara karşılık gelen alan ve alikonma süresi belirlenir. Konsantrasyona karşı alan grafiğı çizilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olur.

#### Numune Hazırlama

- Numune; parçalayıcı, blender veya rondoda parçalanarak homojen hâle getirilip karıştırılır.
- Yüksek su içerikli (>%80) numunelerden hassas terazide 50 ml'lik PP tüpün içine 15 +/- 0,05 g numune tartılır. Su içeriğı < %25 olan (bal, kuru meyve, tahıl, karma yem gibi) numunelerde, homojenize edilmiş ürün PP tüpün içine 7,5 g tartılır. Üzerine 15 ml su ilave edilerek analize uygun hâle getirilir. Su içeriğı %25-80 olan ürünlerde (muz vb.) ise ekstraksiyon öncesi parçalanıp homojenize edilmiş ürün, su ile karıştırılır. Su oranı artırılan numuneden 15 +/- 0,05 g tartılarak hazırlanır. Her iki durumda da sonuca düzeltme faktörü uygulanır.

### 4.3.3. Gaz Kromatografisi (GC) Analiz Yöntemi

- Hazırlanan numuneye 15 ml %1 asetik asitli asetonitril (v/v) ilave edilir.
- Tüp 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır.
- Tüp içine 6 g magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ) ve 1,5 g sodyum asetat (NaAc) ilave edilir.
- Tüp 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır.
- 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- 15 ml'lik PP tüp içine 0,5 g PSA, 1,5 g  $MgSO_4$  tartılır (Yüksek oranda karotinoid ve klorofil içeren meyve ve sebzelerde ekstraksiyon aşamasında karotinoid içeren meyve ve sebzeler için 25 mg; klorofil içeren meyve ve sebzeler içinse 75 mg GCB ilave edilir.).
- Santrifüj edilen numunede oluşan üst fazdan 10 ml alınarak 15 ml'lik PP tüp içine ilave edilir.
- Tüp 20 saniye kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır. GCB ilave edilen ekstraksiyonlarda bu süre 2 dakikaya çıkarılır.
- 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Oluşan üst faz vialle alınarak cihaza verilir.

### 4.3.4. Gaz Kromatografisi (GC) Cihazının Kullanımı ve Temizliği

Gaz kromatografisi cihazının kullanımı ve temizliği şu şekildedir:

1. Bilgisayar, ekran ve yazıcı açılır.
2. Masa üstünde bulunan "Data Acquisiton" programı çalıştırılır veya Start Menu\Programs\Agilent\Mass Hunter Workstation sekmesinden "Data Acquisiton" tıklanarak program çalıştırılır.
3. Metot kısmında kullanılacak metodun ismi bulunmalıdır. Farklı bir metot ise metot sekmesinden ilgili metot seçilir ve cihazın ilgili metot parametrelerine ulaşması beklenir.
4. Alt kısımda bulunan bölümde, sample ile ilgili bilgiler girilir. "Sample Name", "Auto Sampler" pozisyonu ve Data File" kısmında data adı ve path girilir.
5. "File Name" yazılırken çalışılan parametre adı belirtilir. Diazinon GC2 Scan, Diazinon Fragmentor Voltage, Diazinon Product ion ve Diazinon Collision Energy örnek olarak verilebilir.
6. ALS kısmında metot içinde tanımlı olan değerler kullanılabilir. Farklı aktifler için değişiklik yapmaya gerek duyulmamaktadır.
7. Akış hızı metot içinde tanımlanmıştır. Kolonsuz yapılacak çalışmalar için 0,1-0,3 aralığında bir akış seçilebilir ve yüksek oranlı B fazı tercih edilir. "Stop Time" olarak süre girilmeyebilir veya iki dakika ayarlanabilir (kolonsuz çalışma için).
8. Hazırlanan standart çözeltisi "Auto Sampler"a yerleştirilir ve numune ile ilgili bilgiler "Sample" bölümüne girilir. "GC QQQ" sekmesinde ilk olarak hangi "Scan Type" işlemi yapılacağı belirlenir (GC2 Scan, GC2 SIM gibi). "Scan Segment" kısmındaki bilgiler girilir. Scan Time 200 ve fragmentor için 100 değeri GC2 scan modu için kullanılabilir. İlk tarama işlemi için "Polarity"; Positive ve Negative olarak seçilir. Bu seçim, ilk satır bilgileri girildikten sonra satır üzerinde sağ tıklanarak "Add Row" seçeneği ile yapılır ve ikinci satırın sadece polarity değeri değiştirilir. "Apply" tıklanır ve Start (başlangıç) verilir.
9. Okuma işlemi tamamlandıktan sonra masa üstünde bulunan "Qualitative Analysis" programı çalıştırılır.
10. "File" menüsünden "Open Data File" seçeneği ile istenilen data açılır (Okuma işlemi için hazırlanan "Sample" kısmında yazılan data ismi, belirtilen "Data Path" içinden bulunur.).
11. Data açıldıktan sonra "TIC" üzerinde sağ tıklanarak istenilen bölgenin seçimi yapılır. Seçilen bölge üzerinde sağ tıklanarak "Extract GC Spectrum" yapılır. Bölge seçimi yapmadan önce "Range Select" kısmının aktif olması gerekmektedir. Bölgeyi taramadan önce "Range Select" kısmına tıklanır.
12. "Extract GC Spectrum" yaptıktan sonra "GC Spectrum Results" penceresinden sonuçlar görülür. "Preursor Ion ve Polarity" seçimi yapılır. Açılan pencerede her iki polarity değerine ait spectrumlar görülür. "-ESI (Negative)" penceresi negative iyon sonuçlarını; "+ESI" penceresi ise positive iyon sonuçlarını gösterir.
13. Q1 ve polarity belirlendikten sonra ikinci aşama olarak "Fragmentor Voltage" optimizasyonu yapılır. Bu çalışma için "Scan Type" olarak "GC2 SIM" seçilir. "Scan Segments" bölümüne "Mass" için bir önceki basamakta elde edilen Q1 değeri ve polarity değeri girilir. Satır üzerinde sağ tıklanarak "Add Row" yapılır. Satırlar için fragmentor değeri 70-130 aralığında onar artışlarla değerler yazılır (toplam yedi satır). "Sample" sekmesinde data ismi değiştirilir (Örneğin Diazinon GC2 SIM veya Diazinon FV). "Apply" yapılarak start verilir.
14. "File" menüsünden "Open Data File" seçeneği ile istenilen data açılır ("Sample" kısmında yazılan data ismi, belirtilen "Data Path" içinden bulunur.).
15. Gelen TIC kromatogram (chromatogram) üzerinde "Range Select" yapılarak sağ tıklanır ve



“Extract Chromatogram” yapılır.

16. Type kısmı “EIC” olarak; GC level, “GC” olarak belirlenir. m/z value değeri daha önce belirtilen Q1 değeri olarak girilir ve “Advance” tıklanır. Frangemtor değerleri tek tek seçilerek onaylanır ve TIC üzerinde gözlenir. Her fragmentor değerini eklemek için işlem tekrar edilir.
17. Tüm voltaj değerleri eklendikten sonra kromatogram üzerinde zoom yapılarak sol sekmedeki belirtilen değerler yardımı ile en yüksek voltaj değeri bulunur. Sol sekmedeki mavi olan satırın bilgileri kromatogram üzerinde görülebilir.
18. FV değeri belirlendikten sonra üçüncü aşama olarak product ion taraması yapılır. Bu işlem için “Scan Type Product Ion” seçilir. “Scan Segment” bölümünde Precursor Ion (Q1) değeri, tarama aralığı (başlangıç değeri 50 ve üst değer Q1 üzerinde bir değer), belirlenen polarity değeri ve Scan Time 200, fragmentor olarak GC2 SIM aşamasında belirlenen değer girilir. İlk satıra collision energy olarak 0 (sıfır) değeri girilir ve üç satır daha ilave edilir. İlave edilen satırlara 5-15-25 collision energy değerleri girilir. “Sample” bölümüne geçilir, data ismi değiştirilip “Apply” yapılır ve start verilir.
19. Okuma işlemi bittikten sonra “Qualitative Analysis” programından istenilen data açılır ve “Range Select” işlemi yapıp sağ tıklanarak “Extract GC Spectrum” seçilir. “GC Spectrum Results” bölümünde farklı collision energy değerleri için product iyonlar görülür. Buradan en yüksek sinyal şiddetine sahip en az iki adet iyon belirlenir. Bir sonraki aşamada bu iyonlar için en uygun collision energy değerleri bulunur.
20. Collision energy optimizasyonu için “Scan Type” olarak “MRM” seçilir. “Scan Segments” bölümünde önceki aşamalarda belirlenen precursor ion, fragmentor, polarity değerleri girilir. Dwell time olarak 200 girilir. Product ion olarak, bir önceki aşamada seçilen product iyonlardan bir tanesi girilip satır eklenir. 4-5 farklı collision energy değeri sırası ile girilir (Bu değerler bir önceki aşamada product iyon karar verirken sinyalin en yüksek olduğu değeri kapsayacak şekilde ikişer veya üçer birim artışlarla girilebilir. Örneğin 153 product iyonu 15 collision energy değeri civarında en yüksek sinyale sahip ise metot kısmında değerler 10-12-14-16-18-20 olarak girilebilir.). “Sample” kısmında data ismi değiştirilir. Apply yapılarak Start verilir. Bu kısımda data ismi verilirken örneğin Diazinon CE 153 yazılabilir. Daha sonra diğer product iyon için aynı işlem tekrar edilirken değerler değiştirilir ve data ismi Diazinon CE 169 olarak girilebilir. Okuma işlemi bittikten sonra aynı işlem diğer product iyon için tekrar edilir.
21. Okuma işlemleri bittiğinde, “Qualitative Analysis” programı açılır ve istenilen data çağrılır. “Range Select” ile peak bölgesi taranır ve sağ tıklanır. “Extract Chromatogram” seçilir. Type olarak MRM seçilir. GC level olarak GC/GC seçilir. Transition için okuması yapılan iyon çifti seçilir. Advanced kısmına geçilir.
22. Fragmentor değeri olarak optimizasyon için bulunan değer seçilir. Sıra ile metot için kullanılan collision energy değerleri seçilerek “OK” tıklanır.
23. Tüm değerler açıldıktan sonra, chromatogram üzerinde zoom yapılarak en yüksek sinyal şiddetine sahip olan değer bulunur. Sol sekmede mavi olan satırın bilgileri chromatogram üzerinde görülür. Bulunan değer (üstteki okuma için) 305>>>153 çifti için collision energy değeridir. Aynı işlem diğer iyon çifti için tekrar edilir. Hangi iyon çiftinin sinyal şiddeti diğerine göre daha yüksek ise yüksek değere sahip olan çift “Quantifier”; diğeri ise “Qualifier” olarak belirlenir. Üstteki örnekte 305 > 153 için belirlenen collision energy değerindeki sinyal şiddeti (yükseklik) yaklaşık olarak  $5,5 \times 10e5$ 'tir. Sonraki aşamada (alttaki grafik) 305 > 169 çifti için sinyal şiddeti yaklaşık  $0,95 \times 10e6$  olarak görülebilir. Bu durumda 169 iyonu sinyal şiddeti olarak daha yüksek bir değere sahip olduğu için 169 iyonu “Quantifier”; 153 iyonu ise “Qualifier” olarak belirlenir.
24. Elde edilen veriler doğrultusunda GC metodu şu şekilde bilgiler sağlamalıdır: Aktif adı/ Precursor/Product1/Product2/FV/CE1/CE2/Polarity

## 3. UYGULAMA

**Görev** : Gaz kromatografisi ile ölçüm yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ölçüm yapınız.**

**Araç Gereç** : Hassas terazi, teflon kapaklı cam vial (1,5 ml'lik), blender, rondo, otomatik pipet (10-100 µl, 100-1000 µl), PP tüp (15-50 ml), santrifüj, cam vial (40 ml), asetonitril, asetik asit, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum asetat (NaAc), poli-mer seconder amin (PSA), grafize karbon blank (GCB), %1 asetik asitli asetonitril (v/v) ve pestisit standartları

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Su içeriği %80'den fazla olan numuneden 15 g tartarak blender ile homojen hâle getiriniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
3. Hazırlanan numuneye 15 ml %1 asetik asitli asetonitril (v/v) ilave ederek tüpü 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalayınız.
4. Tüpün içine 6 g magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ) ve 1,5 g sodyum asetat (NaAc) ilave ediniz.
5. Tüpü 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkaladıktan sonra 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj ediniz.
6. 15 ml'lik PP tüp içine 0,5 g PSA ve 1,5 g  $MgSO_4$  koyarak santrifüjleyiniz.
7. Santrifüj edilen numunenin üst fazından 10 ml alıp 15 ml'lik PP tüp içine ilave ediniz.
8. Tüpü 20 saniye kuvvetli bir şekilde elle çalkaladıktan sonra 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj ediniz.
9. Oluşan üst fazı vial olarak cihaza veriniz.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

3. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

**ÖLÇÜTLER****DERECELER**

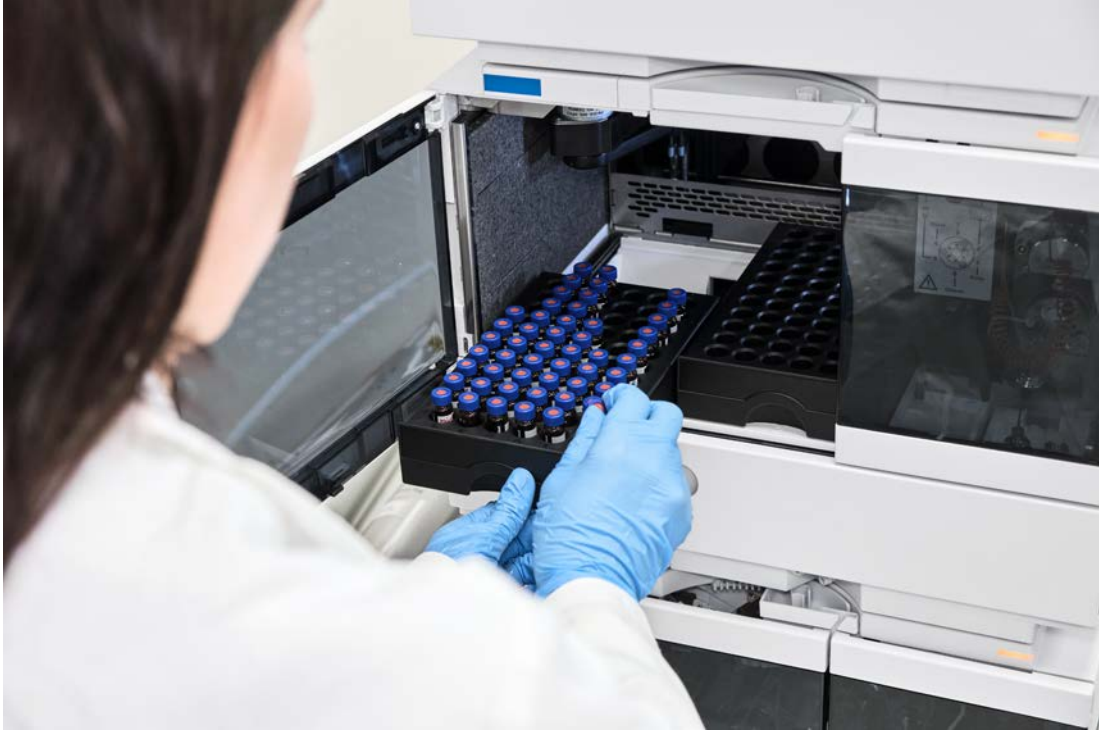
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Numuneden 15 g tartarak homojen hâle getirdi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Numunenin üzerine gerekli kimyasal maddeleri ilave etti.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Numuneyi 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjledi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Üst fazı alarak cihaza verdi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.



#### 4.4. SIVI KROMATOGRFİSİ (SC)

Sıvı kromatografisi (Görsel 4.9), yüksek sıcaklık altında bozulan ve polar olmayan maddelerin analizlerinde tercih edilen bir yöntemdir. Gaz kromatografisinde taşıyıcı faz olarak helyum (He), hidrojen (H) ve azot (N); sıvı kullanılırken sıvı kromatografisinde taşıyıcı faz olarak asetonitril, diklormetan vb. kullanılır.



Görsel 4.9: Sıvı kromatografi cihazı

##### 4.4.1. Sıvı Kromatografisinin Çalışma Prensibi ve Uygulama Alanları

Klasik sıvı kromatografisi yönteminde, çapı 10-50 mm olan ve 50-500 cm uzunluğunda katı sabit faz malzemesi içeren cam tüpler kullanılır. Uygun bir akış hızı alınabilmesi için katı malzemenin tanecek büyüklüğünün 150-200 mikrometreden fazla olması gereklidir. Dolgu maddesinin yukarıdaki sıvının yüksekliği, hareketli fazı kolon boyunca yürütebilecek seviyede olmalıdır. Akış hızının dakikada mililitrenin onda bir kaçı kadar olmasından dolayı ayırma işlemi uzun zamanda olur.

1960'lı yıllarda, sıvı kromatografisinin çapı uygulamada uzun zaman aldığı için 10 mikrometre gibi çok küçük taneciklerin üretildiği ve kullanıldığı yeni bir teknoloji geliştirilmiştir. Klasik sıvı kromatografisinde kullanılan basit sistemlerin tersine çok karmaşık yapıya sahip "yüksek performanslı sıvı kromatografisi [HPLC (highperformance liquid chromatography)]" geliştirilmiştir. Klasik kromatografilerde yapılamayan birçok uygulamada başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografiler (HPLC), sıvı kromatografilerin yerini almıştır.



Sıvı kromatografisinin çalışma prensibi ve uygulama alanları ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlayınız.

#### 4.4.2. Numune Hazırlığı, Temizliği (Clean-Up) İşlemleri

##### Kullanılan Araç Gereç

Analitik terazi, blender veya mikser, HPLC cihazı (otomatik enjeksiyonlu), amberli vial, vorteks (Görsel 4.10), santrifüj, su banyosu, azot kurutma düzeneği, pH metre, mezür, pipet, tek kullanımlık filtre (0,45 mm) kullanılır.

##### Kimyasal Maddeler

$N_2$  gazı (analitik saflıkta), silikajel (SiOH), derişik asetik asit ( $CH_3COOH$ ), asetonitril (analitik saflıkta), susuz magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum klorür (NaCl), florosil ( $MgSiO_3$ ), metanol (analitik saflıkta), primersekonder amin (PSA), aminopropil ( $NH_2$ ) kullanılır.

**Standartların Hazırlanması:** İlk olarak aktif maddelerin metanolde veya asetonitrilde 1,0 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri ve stok çözeltilerin seyreltilmesi ile çalışma çözeltileri (1.0, 10.0 ve 100.0  $\mu g/ml$ ) hazırlanır.

Mobil Faz ve Tampon: Asetonitril (HPLC grade), %2'lik asetik asit

##### Analizin Yapılışı

Analizi yapılacak sebze ve meyve örneklerinden 1-2 kg alınarak homojenize edilir. Örnekler homojenize edildikten sonra analiz edilinceye kadar  $-18^\circ C$ 'de derin dondurucuda saklanır.

Örneklerin ekstraksiyonunda ve temizlenmesinde Quechers metodu ile 40 ml'lik santrifüj tüpüne 10 g homojenize örnek + 10 ml asetonitril konur ve 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bunun üzerine 4 g  $MgSO_4$  ve 1 g NaCl ilave edilerek yine 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır. 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenir. Temizlemede ise bir önceki aşamada elde edilen asetonitril fazından 1 ml alınır ve 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne konur. Bunun üzerine 25 mg PSA ve 150 mg susuz  $MgSO_4$  ilave edilerek 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır ve 1 dakika da 6.000 rpm'de santrifüjlenir. Daha sonra üst faz alınarak üzerine asetonitril : asetik asit çözeltilisi (suda) (1:1; v/v) ilave edilerek viallere alınır. Vialler HPLC cihazına yerleştirilerek okuması yapılır.



Görsel 4.10: Vorteks cihazı



## 4. UYGULAMA

**Görev** : Sıvı kromatografisi ile ölçüm yapma  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ölçüm yapınız.**

**Araç Gereç** : Analitik terazi, teflon kapaklı cam vial (1,5 ml'lik), blender, rondo, otomatik pipet (10-100 µl, 100-1000 µl), PP tüp (15-50 ml), santrifüj, cam vial (40 ml), asetonitril, asetik asit, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum klorür (NaCl), polimer seconder amin (PSA), 1:1 asetik asitli asetonitril (v/v) çözeltisi, metanol, silika jel, aminopropil ve pestisit standartları

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Numuneleri blender ile homojen hâle getiriniz ve analiz edilinceye kadar  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza ediniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
3. 40 ml'lik santrifüj tüpüne 10 g homojenize örnek ve üzerine 10 ml asetonitril ilave ederek 1 dakika santrifüjleyiniz.
4. Tüp içine 4 g magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ) ve 1 g sodyum klorür (NaCl) ilave ederek 1 dakika vortekste karıştırınız.
5. Vortekste karıştırılan tüpü 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj ediniz.
6. 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne asetonitril fazından 1 ml alınarak üzerine 25 mg PSA, 150 mg susuz  $MgSO_4$  ilave edip vortekste 1 dakika karıştırınız.
7. Vorteksten alınan tüpü 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj ediniz.
8. Oluşan üst fazı vial olarak üzerine asetonitril : asetik asit çözeltisi (suda) (1:1; v/v) ilave ediniz.
9. Vialler HPLC cihazına yerleştirilerek okumasını yapınız.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

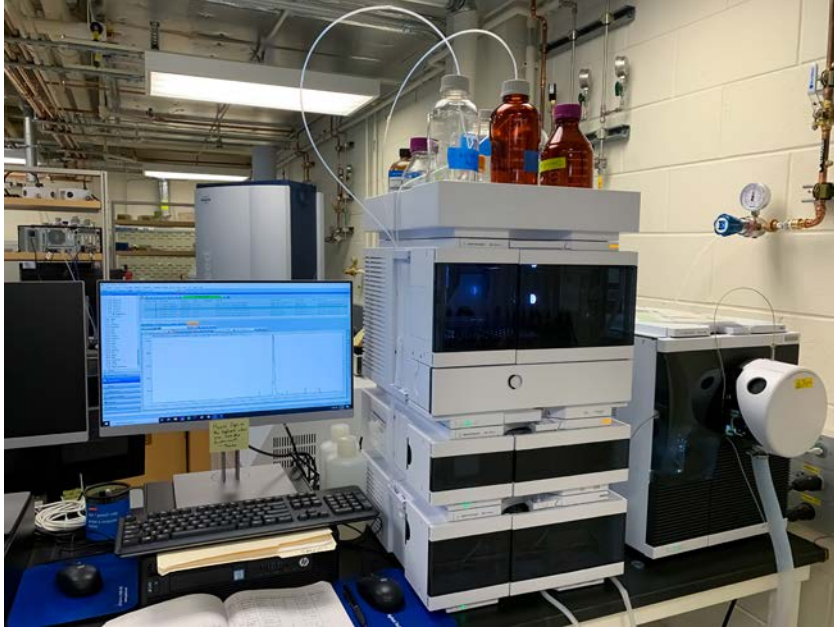
4. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmeniniz tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Numune ve standart numune çözeltilerini hazırladı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. İnce tabaka kromatografi plakasını hazırladı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Kapiler ile numune ve standart çözeltilerini ilgili yerlere damlattı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Gecikme faktörünü hesapladı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## 4.5. KÜTLE SPEKTROMETRE (MS)

Kütle spektrometrisi (MS) tekniği ile pestisit analizlerinde önemli gelişmeler sağlanmıştır. Kütle spektrometrelerini etkin ayırma, tanımlama ve miktar belirlemenin yanı sıra doğrulama gerektirmemesi MS tekniğinin diğer bir üstünlüğüdür. Aynı zamanda moleküle özgü iyonları tespit etme (SIM modu) temeline dayanarak çalışan bu teknikte tespit limitleri 10 ppb seviyelerine kadar inmiş; gaz kromatografisi (GC/MS) ve sıvı kromatografisi [LC/MS (Görsel 4.11)] sistemleri ile entegre edilerek rutin kalıntı analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Sıralı MS sistemlerinin geliştirilmesi ile seçicilik ve hassasiyet 1 ppb seviyelerine kadar artırılmıştır. LC/MS/MS tekniğinin kullanılmaya başlaması ile daha önce tespit edilemeyen polar pestisitlerin birçoğunun tespiti mümkün olmuştur. Çeşitli sıralı MS sistemleri olmakla birlikte triple quadropole (TQ) ve ion-trap sistemleri en yaygın kullanılanlardır.



Görsel 4.11: LC/MS cihazı

### 4.5.1. Kütle Spektrometri Yönteminin Çalışma Prensipleri, Kullanım Alanları ve Kütle Spektrometresini Oluşturan Bölümler

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri, kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırarak ölçme esasına göre çalışan cihazlardır. Kütle spektrometresinin dedektörü üç kısımdan oluşur. Bu kısımlar şunlardır:

**İyon Kaynağı:** Numunenin iyonlaştırılarak cihaza gönderildiği kısımdır. Analizi yapılacak numunenin özelliklerine göre ESI (Electrospray Ionization) veya APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) iyonizasyon teknikleri kullanılabilir. Genel olarak aminler, peptidler ve proteinler gibi polar bileşikler ESI tekniği ile; steroidler gibi apolar bileşikler ise APCI tekniği ile analiz edilir.

**Kütle Analizörü:** İyon kaynağından gelen iyonlar, kuadropoller sayesinde değişen elektromanyetik bir alana tabi tutularak  $m/z$  (kütle/yük) oranlarına göre ayrılır.

**MS İyon Dedektör Sistemi:** MS dedektörü yüksek duyarlılığa sahip, pozitif ve negatif iyon modlarında çalışabilen, iyonları kütle ve yüklerine göre analiz edebilen bir sistemdir. Kütle spektromet-





resi; bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması, organik ve inorganik moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi gibi her türlü bilinen bileşiğin kantitatif analizinin “yüksek duyarlılık ve özgüllükte” ölçebildiği bir tekniktir. Molekülleri ( $m/z$ ) kütle/yük oranına göre ayırıştırır ve ölçer. Bunun için önce moleküller iyonlara (elektriksel olarak “+” ya da “-” yüklü hâle) dönüştürülür. Ardından gaz fazına geçirilerek cihaza gönderilir. LC-MS’de her molekül için bir retansiyon (alikonma) zamanı ve bir  $m/z$  değeri vardır. Aynı  $m/z$  oranına sahip pek çok molekül mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10.000’dir. LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda bile maddenin miktar tayininin yapılmasını mümkün kılar. Sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır. MS/MS, kantitatif uygulamalar için yüksek duyarlılık ve kesinlik sağlar (Görsel 4.12).



Görsel 4.12: MS iyon dedektörü sistemi



Kütle spektrometresini oluşturan bölümleri ve kullanım alanları hakkında araştırma yaparak bir sunum hazırlayınız.

#### 4.5.2. MS Uygulamaları İçin Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) İşlemleri

##### Kullanılan Araç Gereç

Hassas terazi, teflon kapaklı cam vial (1,5 ml’lik), blender, rondo, otomatik pipet(10-100  $\mu$ l,100-1000  $\mu$ l), PP tüp (15-50 ml), santrifüj, cam vial (40 ml) kullanılır.

##### Kullanılan Kimyasallar

Asetonitril, asetik asit, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum asetat ( $NaAc$ ), polimer seconder amin (PSA), grafit karbon blank (GCB), %1 asetik asitli asetonitril (v/v): 1000 ml’lik balon jojeye 10 ml asetik asit alınarak çizgisine asetonitril ile tamamlanır ve pestisit standartları kullanılır.

Ekstraksiyon aşamasında metod prosedürlerine uygun olarak hazırlanmış özel kitler de kullanılabilir.

### Standartların Hazırlanması

Standart çözeltiler 500 µg/l ara stok çözeltisinden belirlenen derişimlerde hazırlanır.

### Kalibrasyonun Tablosunun Oluşturulması

Blank, 10, 30, 50, 100, 200, 400 µg/l standartlar matriks içinde hazırlanıp cihaza verilerek bu konsantrasyonlara karşılık gelen alan ve alikonma süresi belirlenir. Konsantrasyona karşı alan grafiğı çizilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olur.

Numune, parçalayıcı, blender veya rondoda parçalanarak homojen hâle getirilerek karıştırılır. Yüksek su içerikli (>%80) numunelerden hassas terazide 50 ml'lik PP tüpün içine 15 +/- 0,05 g numune tartılır. Su içeriğı < %25 olan (bal, kuru meyve, tahıl, karma yem vb.) numunelerde, homojenize edilmiş ürün PP tüpün içine 7,5 g tartılır. Üzerine 15 ml su ilave edilerek analize uygun hâle getirilir. Su içeriğı %25-80 olan ürünlerde (muz vb.) ise ekstraksiyon öncesi parçalanmış ve homojenize edilmiş ürün su ile karıştırılır. Su oranı artırılan numuneden 15 +/- 0,05 g tartılarak hazırlanır. Her iki durumda da sonuca düzeltme faktörü uygulanır.

### 4.5.3. MS Analiz Yöntemi

- Hazırlanan numuneye 15 ml %1 asetik asitli asetonitril (v/v) ilave edilir.
- Tüp 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır.
- Tüp içine 6 g magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>) ve 1,5 g sodyum asetat (NaAc) ilave edilir.
- Tüp 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır.
- 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- 15 ml'lik PP tüp içine 0,5 g PSA, 1,5 g MgSO<sub>4</sub> tartılır (Yüksek oranda karotinoid ve klorofil içeren meyve ve sebzelerde ekstraksiyon aşamasında, karotinoid içeren meyve ve sebzeler için 25 mg; klorofil içeren meyve ve sebzeler içinse 75 mg GCB ilave edilir.).
- Santrifüj edilen numunede oluşan üst fazdan 10 ml alınarak 15 ml'lik PP tüp içine ilave edilir.
- Tüp 20 saniye kuvvetli bir şekilde elle çalkalanır. GCB ilave edilen ekstraksiyonlarda bu süre 2 dakikaya çıkarılır.
- 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Oluşan üst faz vialle alınarak cihaza verilir.

### 4.5.4. MS Cihazının Kullanımı ve Temizliğı

MS cihazının kullanımı ve temizliğı şu şekildedir:

1. Bilgisayar, ekran ve yazıcı açılır.
2. Masa üstünde bulunan "Data Acquisiton" programı çalıştırılır veya Start Menu\Programs\Agilent\MassHunter Workstation sekmesinden "Data Acquisiton" tıklanarak program çalıştırılır.
3. Metot kısmında kullanılacak metodun ismi bulunmalıdır. Farklı bir metot ise metot sekmesinden ilgili metot seçilir ve cihazın ilgili metot parametrelerine ulaşması beklenir.
4. Alt kısımda bulunan bölümde, Sample ile ilgili bilgiler girilir. "Sample Name", "Auto Sampler" pozisyonu ve "Data File" kısmında data adı ve path girilir.
5. "File Name" yazarken çalışılan parametre adı belirtilir. Örneğın Diazinon MS2 Scan, Diazinon Fragmentor Voltage, Diazinon Product ion, Diazinon Collision Energy



6. ALS kısmında metot içinde tanımlı olan değerler kullanılabilir. Farklı aktifler için değişiklik yapmaya gerek duyulmamaktadır.
7. Akış hızı metot içinde tanımlanmıştır. Kolonsuz yapılacak çalışmalar için 0,1 -0,3 aralığında bir akış seçilebilir. Kolonsuz çalışmalar için yüksek oranlı B fazı tercih edilir. "Stop Time" olarak süre girilmeyebilir veya iki dakikaya ayarlanabilir (kolonsuz çalışma için).
8. Hazırlanan standart çözeltisi "Auto Sampler"a yerleştirilir ve numune ile ilgili bilgiler "Sample" bölümüne girilir. "MS QQQ" sekmesinde ilk olarak hangi Scan Type işlemi yapılacağı belirlenir (MS2 Scan, MS2 SIM gibi) ve "Scan Segment" kısmındaki bilgiler girilir. Scan Time 200 ve fragmentor için 100 değeri MS2 scan modu için kullanılabilir. İlk tarama işlemi için "Polarity"; Positive ve Negative olarak seçilir. Bu seçim, ilk satır bilgileri girildikten sonra satır üzerinde sağ tıklanarak "Add Row" seçeneği ile yapılır ve ikinci satırın sadece polarity değeri değiştirilir. "Apply" tıklanır ve "Start" verilir.
9. Okuma işlemi tamamlandıktan sonra masa üstünde bulunan "Qualitative Analysis" programı çalıştırılır.
10. "File" menüsünden "Open Data File" seçeneği ile istenilen data açılır (Okuma işlemi için hazırlanan "Sample" kısmında yazılan data ismi belirtilen "Data Path" içinden bulunur.).
11. Data açıldıktan sonra TIC üzerine gelinerek sağ tıklanıp istenilen bölgenin seçimi yapılır. Seçilen bölge üzerinde sağ tıklanarak "Extract MS Spectrum" yapılır. Bölge seçimi yapmadan önce "Range Select" kısmının aktif olması gerekmektedir. Bölgeyi taramadan önce "Range Select" kısmına tıklanır.
12. "Extract MS Spectrum" yaptıktan sonra "MS Spectrum Results" penceresinden sonuçlar görülür. "Preursor Ion" ve "Polarity" seçimi yapılır. Açılan pencerede her iki polarity değerine ait spectrumlar görülür. "-ESI" (Negative) penceresi negative iyon sonuçlarını; "+ESI" penceresi ise positive iyon sonuçlarını gösterir.
13. Q1 ve polarity belirlendikten sonra ikinci aşama olarak "Fragmentor Voltage" optimizasyonu yapılır. Bu çalışma için "Scan Type" olarak MS2 SIM seçilir. "Scan Segments" bölümüne Mass için bir önceki basamakta elde edilen Q1 değeri ve polarity değeri girilir. Satır üzerinde sağ tıklanarak "Add Row" yapılır. Satırlar için fragmentor değeri 70-130 aralığında onar artışla değerler yazılır (toplam 7 satır). "Sample" sekmesinde data ismi değiştirilir (Örneğin Diazinon MS2 SIM veya Diazinon FV). "Apply" yapılarak, "Start" tıklanır.
14. "File" menüsünden "Open Data File" seçeneği ile istenilen data açılır ("Sample" kısmındaki data ismi belirtilen "Data Path" içinden bulunur.).
15. Gelen TIC kromatogramı üzerinde "Range Select" yapılarak sağ tıklanır ve "Extract Chromatogram" yapılır.
16. Type kısmı "EIC" olarak; MS level "MS" olarak belirlenir. m/z value değeri daha önce belirtilen Q1 değeri olarak girilir ve "Advanced" kısmına tıklanır. Fragmentor değerleri tek tek seçilir ve TIC üzerinde gözlenir. Her fragmentor değerini eklemek için işlem tekrar edilir.
17. Tüm voltaj değerleri eklendikten sonra, chromatogram üzerinde zoom yapılarak sol sekmedeki belirtilen değerler yardımı ile en yüksek voltaj değeri bulunur. Sol sekmedeki mavi olan satırın bilgileri kromatogram üzerinde görülebilir.

18. FV değeri belirlendikten sonra üçüncü aşama olarak product ion taraması yapılır. Bu işlem için "Scan Type Product Ion" seçilir. "Scan Segment" bölümünde Precursor Ion (Q1) değeri, tarama aralığı (başlangıç değeri 50 ve üst değer Q1 üzerinde bir değer), belirlenen polarity değeri ve Scan Time 200, fragmentor olarak MS2 SIM aşamasında belirlenen değer girilir. İlk satıra Collision Energy olarak 0 (sıfır) değeri girilir ve üç satır daha ilave edilir. İlave edilen satırlara 5-15-25 collision energy değerleri girilir. "Sample" bölümüne geçilir ve data ismi değiştirilir. "Apply" yapılır ve Start tıklanır.
19. Okuma işlemi bittikten sonra, "Qualitative Analysis" programından istenilen data açılır ve "Range Select" işlemi yapılır. Sağ tıklanarak "Extract MS Spectrum" seçilir. "MS Spectrum Results" bölümünde farklı collision energy değerleri için product iyonlar görülür. Buradan en yüksek sinyal şiddetine sahip en az iki adet iyon belirlenir ve bir sonraki aşamada bu iyonlar için en uygun collision energy değerleri bulunur.
20. Collision Energy optimizasyonu için "Scan Type" olarak "MRM" seçilir. "Scan Segments" bölümünde önceki aşamalarda belirlenen precursor ion, fragmentor ve polarity değerleri girilir. Dwell Time olarak 200 girilir. Product ion olarak bir önceki aşamada seçilen product iyonlardan bir tanesi girilir ve satır eklenerek 4-5 farklı Collision Energy değeri sırası ile girilir (Bu değerler bir önceki aşamada product iyon karar verirken sinyalin en yüksek olduğu değeri kapsayacak şekilde ikişer veya üçer birim artışlarla girilebilir. Örneğin 153 product iyonu 15 collision energy değeri civarında en yüksek sinyale sahip ise metot kısmında değerler 10-12-14-16-18-20 olarak girilebilir.). "Sample" kısmında data ismi değiştirilir. "Apply" yapılarak "Start" tıklanır. Bu kısımda data ismi verilirken örneğin Diazinon CE 153 yazılabilir. Daha sonra diğer product iyon için aynı işlem tekrar edilirken değerler değiştirilir ve data ismi Diazinon CE 169 olarak girilebilir. Okuma işlemi bittikten sonra aynı işlem diğer product iyon için tekrar edilir.
21. Okuma işlemleri bittiğinde "Qualitative Analysis" programı açılır ve istenilen data çağrılır. "Range Select" ile peak bölgesi taranır ve sağ tıklanır. Extract Chromatogram seçilir. Type olarak "MRM" seçilir. MS level olarak "MS/MS" seçilir. Transition için okuması yapılan iyon çifti seçilir. Advanced kısmına geçilir.
22. Fragmentor değeri, optimizasyon için bulunan değer seçilir. Sıra ile metot için kullanılan collision energy değerleri seçilip "OK" tıklanarak açılır.
23. Tüm değerler açıldıktan sonra chromatogram üzerinde zoom yapılarak en yüksek sinyal şiddetine sahip olan değer bulunur. Sol sekmede mavi olan satırın bilgileri chromatogram üzerinde görülür. Bulunan değer (üstteki okuma için) 305>>>153 çifti için collision energy değeridir. Aynı işlem diğer iyon çifti için tekrar edilir. Hangi iyon çiftinin sinyal şiddeti diğerine göre daha yüksek ise yüksek değere sahip olan çift "Quantifier"; diğeri ise "Qualifier" olarak belirlenir. Örneğin üstteki örnekte 305>153 için belirlenen collision energy değerindeki sinyal şiddeti (yükseklik) yaklaşık olarak  $5,5 \times 10^5$ 'tir. Sonraki aşamada (alttaki grafik) 305>169 çifti için sinyal şiddeti yaklaşık  $0,95 \times 10^6$  olarak görülebilir. Bu durumda 169 iyonu sinyal şiddeti olarak daha yüksek bir değere sahip olduğu için 169 iyonu "Quantifier"; 153 iyonu ise "Qualifier" olarak belirlenir.
24. Elde edilen veriler doğrultusunda MSMS metodu şu şekilde bilgiler sağlamalıdır: Aktif adı/ Precursor/Product1/Product2/FV/CE1/CE2/Polarity



## 5. UYGULAMA

**Görev** : Kütle spektrometresi ile ölçüm yapma  
**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ölçüm yapınız.**

**Araç Gereç** : Hassas terazi, teflon kapaklı cam vial (1,5 ml'lik), blender, rondo, otomatik pipet (10-100 µl, 100-1000 µl), PP tüp (15-50 ml), santrifüj, cam vial (40 ml), asetonitril, asetik asit, magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ), sodyum asetat (NaAc), polimer seconder amin (PSA), grafize karbon blank (GCB), %1 asetik asitli asetonitril (v/v) ve pestisit standartları

### İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. Su içeriği %80'den fazla olan numuneden 15 g tartarak blender ile homojen hâle getiriniz (Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.).
3. Hazırlanan numuneye 15 ml %1 Asetik asitli asetonitril (v/v) ilave ederek tüpü 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkalayınız.
4. Tüp içine 6 g magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ) ve 1,5 g sodyum asetat (NaAc) ilave ediniz.
5. Tüpü 1 dakika kuvvetli bir şekilde elle çalkaladıktan sonra 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj ediniz.
6. 15 ml'lik PP tüp içine 0,5 g PSA, 1,5 g  $MgSO_4$  koyup üzerine santrifüj edilen numunenin üst fazından 10 ml ilave ediniz.
7. Tüpü 20 saniye kuvvetli bir şekilde elle çalkaladıktan sonra 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj ediniz.
8. Oluşan üst fazı vial olarak cihaza veriniz.

### DERECELEME ÖLÇEĞİ

5. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Numuneden 15 g tartarak homojen hâle getirdi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Numunenin üzerine gerekli kimyasal maddeleri ilave etti.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Numuneyi 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjledi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Üst fazı alarak cihaza verdi.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## 4.6. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRFİSİ (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); polar, uçucu olmayan türler, termal yönden kararsız ve yüksek molekül kütlesine (54'ten 450.000 daltona kadar) sahip bileşikler için tercih edilen bir ayırma tekniğidir (Kellner ve diğ. 2004). Modern sıvı kromatografi sistemlerinde, tanecik boyutu 2-10 µm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için özel pompa sistemleri kullanılmalıdır. Yüksek basınçlardaki sistem gereksinimleri HPLC cihazının (Görsel 4. 13) gelişimiyle sağlanmıştır. HPLC cihazında farklı kolonlar kullanılarak dört farklı mekanizma uygulanabilir. Bu mekanizmalar şunlardır:

- Adsorbsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel geçirgenlik kromatografisi



Görsel 4.13: HPLC cihazı

**Adsorbsiyon:** Katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvveti yardımıyla yüzeyde tutmasına adsorbsiyon denir. Burada sözü edilen adsorbsiyon fiziksel adsorbsiyondur. Zayıf van der Waals, elektro statik çekimler ve dipol-dipol etkileşimlerine dayanır, tersinirdir.

Adsorbsiyon kromatografisinde ayırım; karışımı oluşturan farklı bileşiklerin sabit faz yüzeyinde değişik derecede adsorbe olmaları ilkesine dayanır. Sabit faz, katı; hareketli faz, sıvı veya gazdır. Sabit faz olarak alümina ( $Al_2O_3$ ), silikajel ( $SiO_2$ ), talk ve bunun gibi gözenekli maddeler; hareketli faz olarak alkol, aseton, kloroform gibi bütün organik çözücüler kullanılır. Sabit ve hareketli fazın seçimi, ayırımı yapılacak bileşiklerin polaritesine ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler; apolar maddeler için apolar çözücüler kullanılır.

Maddelerin adsorblanma dereceleri farklı olduğundan sürüklenmeleri ve hareketleri de farklıdır. Çok adsorblanan maddeler yavaş hareket ederken az adsorblanan maddeler daha hızlı hareket eder.

**Dağılma Kromatografileri:** Dağılım, bir karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içindeki çözünlükleri oranında dağılmasıdır. Bu, çözücünün ve maddenin özelliklerine bağlı bir fonksiyondur.



Dağılıma kromatografilerinin temel prensibi; çözünürlük esasına göre karışımın sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımına dayanır. Bu yöntemde sabit sıvı faz, yüksek yüzey alanlı gözenekli bir katı destek maddesine emdirilmiştir. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır. Ayırımı gerçekleştirilecek bileşikler, hareketli ve sabit faz sıvılarında farklı çözünür. Bileşikler sistemi çözünürlük farkından dolayı önce veya sonra terk etmektedir.

**İyon Değişirme Kromatografisi:** Bu yöntemde sabit faz, anyon ve katyon değişimi yapabilecek gruplar içeren reçineler; hareketli faz ise tamponlanmış sıvılardır. Örneğin yapısındaki  $\text{Na}^+$  iyonundan dolayı doğal bir reçine olan zeolit ( $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$ ), katyon değiştirmede kullanılır.

**Jel Geçirgenlik (Moleküler Eleme) Kromatografisi:** Bu yöntem doğal ve yapay polimer karışımlarını ayırmada kullanılır. Bu yöntemde sabit faz, gözenekli bir reçinedir. Reçineler, büyük molekül ağırlıklı polimer maddelerdir. Gözeneklere girip çıkan küçük moleküller, kolonu daha geç terk eder. Gözeneklere girmeyen büyük moleküller, kolonu önce terk ederek ayrılır. Burada ayırma, molekül büyüklüğüne göredir.

**Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC):** (HPLC) bir sıvıda çözünmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirinden ayrılması temeline dayanır.

#### 4.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Yöntemin Çalışma Prensibini, Uygulama Alanlarını ve HPLC Sistemini Oluşturan Aygıtlar

HPLC yönteminin temel prensibi, yüksek basınç altında kolondan geçen maddelerin dedektör yardımı ile tespit edilmesidir. Taşıyıcı faz olarak sıvı kullanılır. HPLC cihazını oluşturan kısımlar şunlardır:

**Hareketli Faz Haznesi:** Modern bir HPLC cihazında bir veya birden fazla cam veya paslanmaz çelik kap bulunur. Bunların her biri 500 ml'den daha fazla çözücü alacak kapasiteye sahiptir. Sistemde kullanılan hareketli fazın seçimi uygulanan ayırma tipine bağlıdır. HPLC sistemlerinde kullanılacak tüm çözücüler çok saf olmalıdır. Az miktardaki safsızlık kolonu etkileyerek dedeksiyon sisteminde girişime neden olabilir.

**Degasser:** Mobil faz içinde bulunan eriyik gazların giderilmesi için kullanılan bir sistemdir. Tüm solventlerin gazının alınması gereklidir. Mobil fazda hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda problemlere yol açabilir. Gazın alınması; solventlerin ısıtılması, karıştırılarak vakuma maruz bırakma, ultra sonifikasyon, solvent şişesine helyum gazı verilmesi gibi farklı şekillerde gerçekleştirilir. Ancak gelişen teknoloji ile cihazda standart olarak bulunan bir modül hâline gelmiştir.

**Pompa Sistemleri:** HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistemde elüentin, enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır. HPLC'de kullanılan başlıca iki tip pompa vardır. Bunlar pistonlu pompa ve vida güdümlü sürgülü pompadır. Modern ticari cihazların hemen hemen hepsinde pistonlu pompa kullanılır.

**Numune Enjeksiyon Sistemi:** Örnekler HPLC'ye enjeksiyon ünitesinden enjekte edilir. Enjekte edilen numune hacimleri genellikle 0,1-20  $\mu\text{L}$  arasındadır. Sistemdeki yüksek basınca dayanıklı olmalıdır.

**Kolon Fırını:** Çalışmanın kalitesi açısından kolonun tutulduğu ortam sabit bir ısıda olmalıdır. Bunun için kolon fırını HPLC cihazlarında önem arz eder. Hava sirkülasyonlu ve blok ısıtıcılı olmak üzere iki türü vardır.

**Kolon:** 5-100  $^{\circ}\text{C}$  arasında ayarlanabilir. Ayırma kolonda gerçekleşir. Durgun faz mm boyutlu poröz

partiküllerden oluşur. Bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır. Ayrım, bileşenlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerine göre gerçekleşir. Analizler için doğru kolon seçimini yapmak çok önemlidir.

**Dedektör:** Kolonu terk eden bileşenlerin görülmesini ve ayrılan molekül miktarının belirlenmesini sağlar. Dedektörden geçen maddeler bir kaydedici yardımıyla kaydedilerek zamana karşı dedektör cevabına ait bir grafik oluşturulur. Buna da kromatogram denir. En çok kullanılan dedektörler şunlardır:

- Ultraviole/görünür bölge dedektörü (ultraviolet/visible dedector-UV/VIS)
- Fotodiyot array dedektörü (photodiode array dedector-DAD)
- Floresans dedektörü (fluorescence dedector-FLD)
- İletkenlik dedektörü (conductivity dedector-CDD)
- Refraktif indeks dedektörü (refractive index dedector-RID)
- Elektrokimyasal dedektör (electrochemical dedector-ECD)
- Kütle dedektörü (mass dedector-MS)

**Kaydedici:** HPLC cihazında okunan değerleri kaydeder.



Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yöntemin çalışma prensibini, uygulama alanlarını ve HPLC sistemini oluşturan aygıtlar ile ilgili araştırma yaparak sunum hazırlayınız.

### HPLC Uygulama Alanları

HPLC uygulama alanları şunlardır:

- İlaçlar (antibiyotikler, sedatifler, analjezikler)
- Biyokimyasallar (amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler)
- Gıda maddeleri (suni tatlandırıcılar, antioksidanlar, aflatoksinler, katkı maddeleri)
- Endüstriyel kimyasallar (çok halkalı aromatikler, yüzey aktif maddeleri, iticiler, boyalar)
- Kirleticiler (pestisitler, herbisitler, fenoller)
- Klinik tıp (safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre özütleleri, östrojenler)
- Uyuşturucular (uyuşturucu ilaçlar, zehirler, kan alkolü, narkotikler)

### 4.6.2. Numune Hazırlığı ve Temizliği (Clean-Up) İşlemleri

Katı faz ekstraksiyonu azot atmosferi varlığında, kuruluğa kadar buharlaştırılmış olan sediment ve sebze örneklerine 5 ml asetonitril ilave edilir. Karışım iyice çalkalandıktan sonra çözelti içindeki partikülleri uzaklaştırmak için 0,2 µm'lik şırınga filtreden süzülür. 5 ml'lik süzüntüye 25 ml asetik asit/su (1:99 oranında) karışımı ilave edilerek seyreltilir. Elde edilen çözelti 3 ml asetik asit/su (1:99 oranında) ile şartlandırılan aromatik sülfonik asit (PhSO<sub>3</sub>H) SPE kolonundan geçirilir. Bu işlemle analitler kolonda alıkonulurken matriks bileşenleri kolondan uzaklaştırılır. Olası alıkonan farklı polaritedeki matriks bileşenlerinin kolondan uzaklaştırılması için sırasıyla 2 ml asetik asit/su (1:99 oranında) ve 1 ml asetonitril kolondan geçirilir. Daha sonra ortamdaki asidik -SO<sub>3</sub>H gruplarını sülfonatlar hâline





getirerek hidrojen bağınyı zayıflatmak amacıyla 1 ml 0,1 M potasyum dihidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) çözeltisi kolondan geçirilir ve kolon 2 dakika boyunca vakum altında kurumaya bırakılır. Son olarak kolonda tutunmuş olan analitler, 2 ml asetonitril/0,1 M  $K_2HPO_4$  (1:1 oranında) ile elue edilir. Elue edilen örnekler, belirlenen HPLC çalışma şartlarında sisteme enjekte edilir.

### 4.6.3. HPLC Analiz Yöntemi

#### Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasallar

Numune kabı, soxhlet cihazı, hassas terazi, etüv, buzdolabı, deiyonize su, doğrayıcı, asetik asit, kloroform, nitrik asit, potasyum dihidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ), asetonitril ve metanol kullanılır.

#### Herbisit Standartları

Stok standart çözeltiler (1 mg/ml), herbir herbisitten 10 mg tartılarak 10 ml'lik metanolde çözümlenir. Seyreltik çözeltiler, stok çözeltilerden seyreltilerek deneyin yapıldığı gün hazırlanmalıdır.

#### Analizin Yapılışı

+4 °C'de vakumlu kaplarda bulunan sebze örneklerinden 50 g tartılarak öğütülür. Öğütülen sebze örnekleri ekstraksiyon kartuşuna yerleştirilir. Daha sonra 50 ml kloroform ile 8 saat soxhlet ekstraksiyonuna tabii tutulur. Altta ve üstte oluşan fazlar birleştirilerek azot ( $N_2$ ) varlığında ekstraktlar kuruyana kadar buharlaştırılır ve SPE uygulanır. Örnek çözeltiler HPLC cihazına 20 µL olarak enjekte edilir. 222 nm'de spektrometrede ölçülür.

### 4.6.4. HPLC Cihazının Kullanımı ve Temizliği

HPLC cihazının kullanımı ve temizliği şu şekildedir:

**Test Edilecek Biyomolekülün Uygun Bir Çözücüde Çözünmesi:** Protein, peptit ya da diğer test edilecek olan moleküller organik ya da uygun bir çözücü kullanılarak çözülür.

**Numunedeki Bileşenlerin Ayrımı:** Bileşenlerin ayrımı sabit faz olarak nitelendirdiğimiz kolonda gerçekleşir. Çözünen karışım kolona enjekte edilir. Kolon boyunca bu karışım ve mobil fazdan oluşan sıvının hareket etmesi için bir basınç uygulanır. Bu basınçla birlikte farklı bileşenler, kolonda farklı hızlarda ilerler. Böylece bileşenler çıkışta farklı zamanlarda ulaşır.

**Ayrılan Bileşenlerin ve Miktarlarının Tayin Edilmesi:** Bileşenler ayrıldıktan sonra miktarlarının tayini için detektörlerden faydalanılır. Bunun için numunelerin özelliklerine göre UV, floresans, iletkenlik, kütle gibi farklı detektör seçilebilir.

**Kromatogramların Değerlendirilmesi:** Detektörden elde edilen kromatogramlar, günümüzde değişik bilgisayar programları yardımıyla rahatça yorumlanır.

Kolonun bir sonraki analize hazır hâle getirilmesi için önce asetonitril daha sonra saf su kolondan geçirilerek kolon temizlenir.

## 6. UYGULAMA

**Görev** : HPLC ile ölçüm yapma

**Verilen işlem basamaklarını uygulayarak ölçüm yapınız.**

**Araç Gereç** : Numune kabı, soxhlet cihazı, hassas terazi, etüv, buzdolabı, deiyonize su, doğrayıcı, asetik asit, kloroform, nitrik asit, potasyum dihidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ), asetonitril, metanol ve pestisit standartları

**İşlem Basamakları**

1. İş sağlığı ve güvenliği önlemlerini alınız.
2. +4 °C'de vakumlu kaplarda bulunan sebze örneklerinden 50 g tartarak öğütünüz.
3. Öğütülmüş sebze örneklerini ekstraksiyon kartuşuna yerleştiriniz.
4. Ekstraksiyon kartuşuna yerleştirdiğiniz numuneye 50 ml kloroform ilave ederek 8 saat soxhlet ekstraksiyonuna tabii tutunuz.
5. Altta ve üstte oluşan fazları birleştirerek azot ( $N_2$ ) varlığında ekstraktlar kuruyana kadar buharlaştırınız.
6. Katı faz ekstraksiyonu [solid phase extraction (SPE)] işlemi uygulayınız.
7. Örnek çözeltileri HPLC cihazına 20 µL olarak enjekte ediniz.
8. 222 nm'ye ayarlanmış spektrometrede ölçüm yapınız.
9. Arkadaşlarınızla yardımlaşınız.

**DERECELEME ÖLÇEĞİ**

6. UYGULAMA'da yapılan çalışma DERECELEME ÖLÇEĞİ'nde yer alan ölçütlere göre öğretmenin tarafından değerlendirilecektir. Çalışmanızı planlarken ölçütleri dikkate alınız.

ÖLÇÜTLER	DERECELER			
	(4) Çok iyi	(3) İyi	(2) Orta	(1) Geliştirilebilir
1. Çalışma öncesi gerekli hazırlıkları yaptı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Numuneden 50 g tartarak öğüttü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Numunenin üzerine 50 ml kloroform ilave ederek soxhlet cihazında 8 saat ekstrakte etti.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Katı faz ekstraksiyonu işlemi uyguladı.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Örnek çözeltileri HPLC cihazına 20 µL olarak enjekte etti.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>TOPLAM PUAN</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Değerlendirme: 50-100 puan arası başarılı, 0-49 puan arası uygulama tekrarı yapılmalı.

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

### A) Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

1. Karışım hâlindeki maddelerin, hareketli ve sabit fazlar arasında dağılımı ve bu fazlarla etkileşimine dayalı olarak ayrılması tekniğine ..... denir.
2. Kromatografide, bir kolon içine veya düz bir yüzeye tutturulmuş faza ..... denir.
3. İnce tabaka kromatografisinde plakalar kullanılmadan önce ..... °C'deki etüvde 2 saat kurutularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır.
4. Gaz kromatografileri, gaz-sıvı dağılma kromatografisi ve gaz-katı ..... kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.
5. Sıvı kromatografilerinde uygun bir akış hızı alınabilmesi için katı malzemenin tanecik büyüklüğünün .....mikrometreden fazla olması gereklidir.
6. Kütle spektrometreleri, hareket eden yüklü partikülleri ..... oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek ölçen cihazdır.
7. MS/MS kantitatif uygulamalar için yüksek bir ..... ve kesinlik sağlamaktadır.
8. Kütle spektrometrelerin dedektörü; iyon kaynağı, kütle analizörü ve ..... sistemi olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.
9. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) .....I yönden karar-sız ve yüksek molekül kütlesine sahip bileşikler için tercih edilen bir ayırma tekniğidir.
10. Dağılma kromatografilerinin temel prensibi ..... esasına göre karışımın sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımına dayanmaktadır.
11. HPLC'ye genellikle enjekte edilen numune hacimleri ..... µL arasıdır.

### B) Aşağıdaki soruları okuyarak doğru olan seçeneği işaretleyiniz.

#### 12. Aşağıdakilerden hangisi ince tabaka kromatografisinde adsorplayıcı tabakanın özelliklerinden değildir?

- A) Oldukça çok miktarda madde tutabilmelidir.
- B) Ayrılacak maddelerle ve çözücülerle kimyasal bir reaksiyona girmemelidir.
- C) Renklendirici ayıraçlarla reaksiyona girmemelidir.
- D) Plakaların kalınlığı 5 mm olmalıdır.
- E) Üzerinde adsorbe olmuş madde başka çözücüler kullanılarak kolaylıkla geriye alınabilmelidir.

13. İnce tabaka kromatografisi ile indikatörlerin gecikme faktörü (Rf değerleri) belirlenerek bilinmeyen indikatör karışımının nitel analizi yapılır. Aşağıdakilerden hangisi ince tabaka kromatografisi ile indikatörlerin analizinde kullanılan kimyasallardan değildir?

- A) Metil kırmızısı
- B) Bromkrezol yeşili
- C) Alizarin sarısı
- D) Metilen mavisi
- E) A- Naftalin

14. Sıvı kromatografisinde taşıyıcı faz olarak aşağıdakilerden hangisi kullanılır?

- A) Asetonitril
- B) Azot (N)
- C) Helyum (He)
- D) Hidrojen (H)
- E) Oksijen (O)

15. Aşağıdakilerden hangisi gaz kromatografisini oluşturan sistemlerden biri değildir?

- A) Ayrımı istenen karışım, bir enjektör yardımıyla enjeksiyon kısmına enjekte edilir.
- B) Enjektör bölümü ısıtılmış durumdadır. Karışım hemen buharlaşır ve buhar hâlinde inert taşıyıcı gaz ile birlikte kolona girer.
- C) Kolonda her bileşik; kaynama noktasına, molekül büyüklüğüne ve kolondaki sabit faz ile etkileşimine bağlı olarak farklı hızlarda göç ederek devamlı taşınır.
- D) Kolondan çıkan her bir bileşen, dedektöre girer. Dedektörde bileşenlerin miktarı ile orantılı olarak belirlenir ve kaydedicide grafik olarak çizilir.
- E) Bileşiklerin çeşitleri dedektörde bekleme zamanları hesap edilerek belirlenir.

C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

16. Gaz kromatografisini oluşturan kısımların adlarını yazınız.

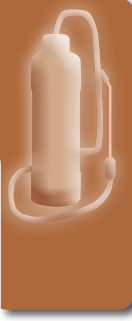
.....  
.....  
.....

17. HPLC sistemini oluşturan aygıtların adlarını yazınız.

.....  
.....  
.....

18. HPLC cihazının kullanım alanlarını yazınız.

.....  
.....  
.....



## EK - 1

### PESTİSİTLERLE İLGİLİ YASAL MEVZUAT

Gıdalarda pestisit kalıntılarının resmi kontrolleri için bakanlık görevlileri tarafından “Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Pestisit Kalıntılarının Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Tebliği”nde açıklanan hususlar doğrultusunda numune alınır. Bu tebliğ esasları doğrultusunda hazırlanan laboratuvar numuneleri, analiz edilmek üzere laboratuvarlara gönderilir.

Laboratuvarlarda numuneler analiz edildikten sonra raporlanır. Gıdalarda tespit edilen pestisit kalıntı miktarlarının uygunluğu “Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği” esaslarına ve ilgili eklerine göre değerlendirilir. Yönetmelik eklerinde her bir aktif maddenin her bir ürün için tanımlanmış maksimum kalıntı limitleri (MRL) yer almaktadır.

“Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Pestisit Kalıntılarının Resmî Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Tebliği” ve “Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği” aşağıda verilmektedir. “Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği”nin eklerine genel ağ üzerinden ulaşılabilir.

#### TÜRK GIDA KODEKSİ GIDALARDA PESTİSİT KALINTILARININ RESMÎ KONTROLÜ İÇİN NUMUNE ALMA METOTLARI TEBLİĞİ

(TEBLİĞ NO: 2011/34)

#### Amaç

**MADDE 1 –** (1) Bu Tebliğin amacı gıdalarda bulunan pestisit kalıntılarının resmi kontrolü için gıdalardan numune alma metotlarını belirlemektir.

#### Kapsam

**MADDE 2 –** (1) Bu Tebliğ, gıdalarda bulunan pestisit kalıntılarının resmi kontrolleri için numune alma metodunu ve resmi kontrollerde kullanılan analiz metotları için numune hazırlanmasını ve kriterlerini kapsar. Canlı hayvan ve diğer hayvan ürünleri ile ilgili numune stratejilerini, numune miktarlarını ve numune alma sıklığını kapsamaz.

#### Dayanak

**MADDE 3 –** (1) Bu Tebliğ, 16/11/1997 tarihli ve 23172 sayılı (1. Mükerrer) Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’ne göre hazırlanmıştır.

#### Tanımlar

**MADDE 4 –** (1) Bu Tebliğde geçen;

- Analitik kısım: Kalıntı konsantrasyonunun doğru olarak ölçülmesini sağlayacak miktarda, analitik numunedan alınan temsili miktardaki kısmı,
- Analitik numune: Numune alma hatası en az olacak şekilde analitik kısımları elde etmek amacı ile analiz edilecek ürüne ait kısmın ayrılarak; karıştırma, öğütme, parçalama ve diğer işlemleri takiben analiz için laboratuvar numunesinden hazırlanan numuneyi,
- Bakanlık: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığını,
- Birincil numune/İnkremental numune: Partinin bir yerinden alınan bir veya daha fazla

birimi

- d) Birim: Birincil numunenin tümünü veya bir kısmını oluşturmak üzere çekilecek olan, bir parti içerisindeki en küçük bağımsız kısmı,
- e) Laboratuvar numunesi: Paçal numuneyi temsil edebilecek miktardaki numunenin laboratuvara gönderilen veya laboratuvar tarafından kabul edilen miktarını,
- f) MRL: Maksimum kalıntı limitlerini,
- g) Numune alma aleti: Birimi; paçal materyalden, ambalajın içinden veya et ve kanatlı etinde birincil numune için fazla olan parçayı ayırmak amacıyla kullanılan kepçe, taşıyıcı, bıçak ve benzeri araç ve gereçler ile laboratuvar numunesinin paçal numuneden hazırlanmasında veya analitik kısmın analitik numuneden hazırlanmasında numune kapları da dahil olmak üzere kullanılan araçları,
- ğ) Numune büyüklüğü: Numuneyi oluşturan birim sayısı veya miktarını,
- h) Paçal numune: Et ve kanatlı eti dışındaki ürünler için, partiden alınmış olan birincil numunelerin birleştirilmesi ve çok iyi karıştırılması ile elde edilen numunedir. Et ve kanatlı eti için ise, tek bir birincil numune paçal numune olarak kabul edilir.
- ı) Parti: Bir seferde teslim edilen veya üretilen ve numuneyi alan kontrol görevlisi tarafından orijin, üretici, çeşit, ambalajlayıcı, ambalaj tipi, işaretleme, yükleyici gibi özelliklerinin aynı olduğu bilinen veya öngörülen gıdanın miktarını,
- i) Şahit numune: İtazlı durumlar için, paçal numuneden ayrılan numuneyi,
- j) Şüpheli parti: Herhangi bir nedenle maksimum kalıntı limitlerini aşacak düzeyde pestisit kalıntısı içerdiğinden şüphelenilen partiyi,
- ifade eder.

### Genel hükümler

#### MADDE 5 – 1. Numune alma:

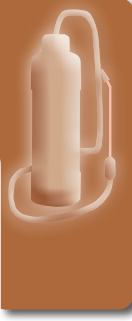
- a) Numune, kontrol görevlisi tarafından alınır ve usulüne uygun olarak laboratuvara gönderilir.
- b) Analiz sonucunu etkileyeceğinden, numune alma işleminin tüm aşamalarında, numunelerin kontaminasyonu ve zarar görmesini engelleyecek önlemler alınmalıdır.
- c) Alınan numunenin partiyi tam olarak temsil ettiğinden emin olunmalıdır.

#### 2. Birincil numunelerin toplanması:

Partiden alınması gereken minimum birincil numune sayısı EK – 1'e, kırmızı et ve kanatlı eti partisinin şüpheli olması durumunda alınması gereken minimum birincil numune sayısı ise EK – 2'ye uygun olmalıdır. Her bir birincil numune, mümkün olduğunca partinin rastgele kısımlarından alınmalıdır. Birincil numuneler, partiden laboratuvar numunesi oluşturulmasını sağlayacak miktarda alınmalıdır.

#### 3. Paçal numunenin hazırlanması:

- a) Paçal numunenin hazırlanmasında kırmızı et ve kanatlı eti için uygulanacak işlem EK – 3'e uygun olmalıdır. Her bir birincil numune ayrı bir paçal numune olarak değerlendirilmelidir. Bitkisel ürünler, yumurtalar ve süt ürünlerinden numune alma işlemleri EK – 4 ve EK



– 5'e uygun olmalıdır. Paçal numuneyi oluşturacak birincil numuneler birleştirilmeli ve mümkünse iyice karıştırılmalıdır.

- b) Paçal numuneyi oluşturmak amacıyla karıştırma ve birleştirme işleminin yapılmasının mümkün olmadığı veya paçal numunenin alt birimlerinin karıştırılması sırasında birimlerin zarar görmesinin kalıntı miktarını etkilediği veya büyük birimlerin tek bir homojen kalıntı dağılımı sağlayacak kadar karıştırılamadığı durumlarda; birincil numunenin alınışı ile aynı anda, rastgele biçimde laboratuvar paralel numuneleri alınmalıdır. Bu durumda, analiz sonuçlarının ortalaması alınarak geçerli analiz sonucu belirlenmelidir.

#### **4. Laboratuvar numunesinin hazırlanması:**

Laboratuvar numunesinin hazırlanmasında, paçal numune, laboratuvar numunesi için gereken miktardan daha fazla ise, temsil eden miktarı sağlayacak şekilde bölünür. Bölme işlemi uygun boyutlarda küçültülerek veya dörde bölünerek yapılır. Ancak bu aşamada taze bitki ürünleri veya bütün yumurtalar kesilmemeli veya kırılmamalıdır. Gerek görürse, bu aşamada laboratuvar paralel numuneleri hazırlanmalıdır. Laboratuvar numuneleri için gereken minimum miktarlar EK – 3, EK – 4 ve EK – 5'e uygun olmalıdır.

#### **5. Numune kaydının tutulması:**

Numune alan kişi, partinin orijini ve yapısını, sahibini, tedarikçisini veya taşıyıcısını; numunenin alınma tarih ve yerini ve gerekli diğer bilgileri kaydetmek zorundadır. Önerilen numune alma metodundan yapılan her sapma kaydedilir. Her bir numuneye bu kaydın imzalı bir kopyası iliştilirilmeli, bir kopyası da numuneyi alan kişi tarafından saklanır. Numune alma kaydının bir nüshası, mal sahibi veya temsilcisine verilir.

#### **6. Numunenin laboratuvara gönderilmesi:**

Numune kapları, kontaminasyonu ve numunenin zarar görmesini önleyecek ve sızıntı yapmayacak, numune ile etkileşmeyecek nitelikte olmalıdır. Resmi kontroller için alınan her numune alındığı yerde mühürlenir. Kap sıkıca kapatılır, güvenli bir biçimde etiketlenir ve numune alma kaydı da kaba iliştilirilir. Numune, laboratuvara mümkün olan en kısa sürede ulaştırılır. Nakil sırasında bozulma önlenmelidir. Taze numuneler serin ortamda tutulmalı, dondurulmuş numunelerin dondurulmuş halleri muhafaza edilmelidir. Kanatlı eti ve kırmızı et numunelerinin bozulma olmadan laboratuvara ulaştırılması sağlanamıyorsa, laboratuvara gönderilmeden önce dondurulur.

#### **7. Analitik numunenin hazırlanması:**

Laboratuvar numunesinin laboratuvara ulaşma tarihi ve miktarı numune alma formuna kayıt edilir. Bu aşamadan sonra analitik numune en kısa sürede hazırlanır. Sert çekirdekli meyvelerin çekirdeklerinde olduğu gibi analize alınmayacak kısımlar ayrılmalı, ancak ayrılmış bu parçaların ağırlıkları da hesaplamalarda mutlaka dikkate alınmalıdır.

#### **8. Analitik kısmın hazırlanması ve depolanması:**

Analitik kısımların hazırlanmasında, temsili analitik kısımların alınabilmesi için analitik numune öğütülmeli ve iyice karıştırılmalıdır. Analitik kısmın miktarı, analitik metoda ve numunenin hazırlanma şekline göre belirlenmelidir. Öğütme ve karıştırma metodlarının kaydı tutulmalı ve bu metodlar, analitik numunede bulunan kalıntı miktarında değişikliğe yol açmamalıdır. Gerekli durumlarda olumsuzlukları en aza indirmek amacıyla analitik numune özel koşullarda (örneğin sıfırın altında sıcaklıklarda) işleme tabii tutulmalıdır. Uygulanacak işlem kalıntı miktarını etkileyecekse ve pratik alternatif bir metot yok ise,

analitik kısım bütün birimlerden veya birimlerden alınmış parçalardan oluşabilir. Bu nedenle analitik kısım birkaç birim veya parçadan oluşuyorsa, bu kısım analitik numuneyi tam temsil edemeyeceğinden, yeterli miktarda paralel numune de analize alınmalı ve ortalama değerdeki belirsizlik gösterilmelidir. Analitik kısımlar analizden önce depolanacaksa, depolama metodu ve süresi kalıntı sonucunu etkilemeyecek biçimde seçilmelidir.

### **Açıklayıcı hükümler MADDE 6 – 1. Parti:**

- a) Yüklemenin farklı üreticilerden geldiği tanımlanabilen birden fazla partiden oluştuğu durumlarda her bir parti ayrı değerlendirilmelidir.
- b) Büyük hacimli yüklemelerde her bir partinin miktarı ya da sınırı açıkça tespit edilemiyorsa, bir seri vagon, kamyon, tekne ve benzeri ayrı bir parti olarak değerlendirilebilir.
- c) Bir yükleme bir veya daha fazla partiden oluşabilir.
- ç) Bir parti sınıflandırma veya imalat işlemleri için karıştırılabilir.

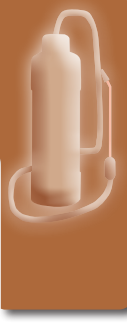
### **2. Birincil numune:**

- a) Birincil numunenin alındığı yer partiden rastgele seçilir. Ancak bu fiziksel olarak mümkün değilse partinin ulaşılabilen kısımlarından rastgele alınır. Birincil numune için alınması gereken birim sayısı, laboratuvar numunesi için gereken minimum sayı ve miktar olarak belirlenir.
- b) Birincil numuneler yükleme veya boşaltma sırasında alınıyorsa, numune alma yeri ve zamanı belirlenir.
- c) Bitki, yumurta ve süt ürünlerinde bir partiden birden fazla birincil numune alındığında, her bir birincil numune paçal numuneye yaklaşık aynı miktarlarda katılır.
- ç) Birincil numunelerin toplanması ve paçal numunelerin hazırlanması sırasında;
  - 1- Birimlerin büyük birimler halinde olması ve karıştırma işleminin paçal numunenin temsil edilebilirliğini artırmadığı durumlarda,
  - 2- Yumurta ve yumuşak meyve gibi karıştırıldığında numunenin zarar göreceği ve kalıntı miktarının etkileneceği durumlarda,
  - 3- Karıştırma ve birleştirme işleminin yapılmasının mümkün olmadığı durumda veya paçal numunenin alt birimlerinin karıştırılması sırasında birimlerin zarar görmesi durumunda, birincil numunenin alınışı ile aynı anda, rastgele biçimde laboratuvar paralel numuneleri alınır. Bu durumda analiz sonucunu, geçerli analiz sonuçlarının ortalaması belirler.
- d) Kırmızı et ve kanatlı eti partisinde EK – 3’de yer alan alt birimler belirtilmediği sürece birincil numuneyi oluşturmak amacıyla birimler bölünemez ve parçalanamaz.

### **3. Paçal numune:**

- a) Paçal numune, birincil numunelerin karıştırılması ile elde edilir.
- b) Paçal numune; bitkisel ürünler, yumurta ve süt ürünlerinde 1 den 10’a kadar birincil numuneden, kırmızı et ve kanatlı etinde tek birincil numuneden oluşur.
- c) Birincil numuneler paçal numuneden tüm laboratuvar numunelerinin alınmasını sağlayacak miktarda olmalıdır.





#### 4. Birim: Ürün gruplarına göre birimler aşağıdaki şekilde oluşturulabilir:

- Çok küçük olanlar hariç olmak üzere taze meyve ve sebzelerde, her bir tam meyve, sebze veya bunların doğal salkımlarıdır.
- Birimler numune alma aleti kullanılıyor ise, materyale zarar vermeden oluşturulur.
- Büyük hayvanlarda hayvanın parçaları veya organları belirtilen kısmı veya organın tümü veya bir kısmı birimi oluşturur. Organ kısımları, birimi oluşturmak için kesilebilir.
- Küçük hayvanlarda, her bir hayvanın tamamı veya bir parçası veya organı birimi oluşturabilir. Kalıntı miktarının etkilenmemesi amacıyla bu aşamada alınacak birimlerinin hayvanın diğer organları ve numune alma araçları ile etkileşimi olmamalıdır.
- Yumurtalar, taze sebze ve meyveler analitik numune oluşturma aşamasına kadar kesilmemeli ve kırılmamalıdır.
- Tüm ürünlerin ambalajlanmış materyallerinde farklı paketlerin en küçüğü, birim olarak alınır. En küçük paketin çok büyük olması halinde numune, paçal olarak alınır. En küçük paketin çok küçük olduğu durumlarda paketlerin içinde bulunduğu ambalaj, birim olarak kabul edilir.
- Birincil numune olamayacak kadar büyük hacimli paketlerde ve paçal materyalde birimler numune alma aleti ile oluşturulur.

#### 5. Laboratuvar Numunesi:

- Laboratuvar numunesi paçal numunenin bir bölümü veya tamamı olabilir.
- Kırmızı et ve kanatlı eti partisinde laboratuvar numunesi için EK – 3'de yer alan alt birimler belirtilmediği sürece; laboratuvar numunelerini oluşturmak amacıyla birimler bölünemez ve parçalanamaz.
- Gerek görüldüğü takdirde, laboratuvar paralel numuneleri hazırlanır.
- Birincil numunelerin alınışı ile aynı anda, ayrı laboratuvar numuneleri hazırlanması gerekiyorsa; paçal numune, laboratuvar numunelerinin toplamıdır.

#### 6. Analitik Numune:

Analitik numunenin hazırlanması, maksimum kalıntı limitlerinin belirlenmesinde kullanılan işlemi yansıtmalıdır. Bu durumda analiz edilecek ürün, normal olarak tüketilmeyen kısımları da içerebilir.

#### 7. Numune Alma Aleti:

Numune alma ve numune hazırlamanın gerekli aşamalarında numune alma araçları kullanılmalıdır.

#### 8. Şahit numune:

Şahit numune, homojenize edilmiş paçal numuneden ayrılır. Şahit numuneye ilişkin hükümler Bakanlıkça belirlenir.

#### 9. Sonuçların Yorumlanması:

- Analitik sonuçlar  $x \pm U$  olarak raporlanır. Burada  $x$  analitik sonucu,  $U$  ise genişletilmiş ölçüm belirsizliğini ifade eder. Analitik sonucun yasal limitlere uygunluk değerlendirme-

si, analiz sonucundan ölçüm belirsizliğinin çıkarılmasıyla elde edilen sonuca göre yapılır.

- b) Ölçüm belirsizliği hesaba katılarak elde edilen laboratuvar numunesi analiz sonucu, maksimum limitlere uyuyorsa kabul edilir.
- c) Ölçüm belirsizliği hesaba katılarak elde edilen laboratuvar numunesi analiz sonucu, maksimum limitleri aşıyorsa reddedilir.

### **Avrupa Birliği'ne uyum**

**MADDE 7 – (1)** Bu Tebliğ, 2002/63/EC sayılı Bitkisel ve Hayvansal Gıdalarda Pestisit

Kalıntılarının Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Komisyon Direktifi dikkate alınarak Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde hazırlanmıştır.

Yürürlükten kaldırılan mevzuat

**MADDE 8 – (1)** Bu Tebliğin yayımı tarihinden itibaren, 2/12/2006 tarihli ve 26364 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan 2006/51 Tebliğ no'lu Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Pestisit

Kalıntılarının Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Metotları Tebliği yürürlükten kaldırılmıştır.

### **Yürürlük**

**MADDE 9 – (1)** Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

**MADDE 10 – (1)** Bu Tebliğ hükümlerini Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı yürütür.

**27.09.2021**

**Resmî Gazete**

**Sayı : 31611 (Mükerrer)**

## **YÖNETMELİK**

Tarım ve Orman Bakanlığından:

# **TÜRK GIDA KODEKSİ PESTİSİTLERİN MAKSİMUM KALINTI LİMİTLERİ YÖNETMELİĞİ BİRİNCİ BÖLÜM**

## **Amaç, Kapsam, Dayanak ve Tanımlar**

### **Amaç**

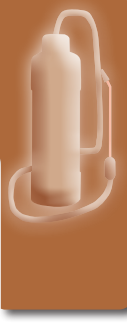
**MADDE 1 - (1)** Bu Yönetmeliğin amacı; tüketicinin yüksek seviyede korunmasını sağlamak üzere bitkisel ve hayvansal orijinli gıdalarda pestisit kalıntılarının maksimum limitlerine ilişkin uygulama usul ve esaslarını belirlemektir.

### **Kapsam**

**MADDE 2 - (1)** Bu Yönetmelik, Ek-1'de belirlenmiş bitkisel ve hayvansal ürünlere ve bu ürünlerden elde edilen işlenmiş veya kompozit ürünlere uygulanır.

(2) Bu Yönetmelik, Ek-1'de yer alan ancak gıda amacı dışında üretilen ürünleri, bitki çoğaltım materyallerini ve aktif maddelerin ilgili mevzuat çerçevesinde onaylanması sürecinde kullanılan ürünleri kapsamaz.

(3) Bebek formülleri, devam formülleri, bebek ve küçük çocuk ek gıdaları ile ilgili mevzuat hükümleri saklıdır.



### Dayanak

**MADDE 3** - (1) Bu Yönetmelik, 11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 21 inci, 22 nci, 23 üncü, 24 üncü, 31 inci, 32 nci ve 34 üncü maddelerine dayanılarak hazırlanmıştır.

### Tanımlar

**MADDE 4** - (1) Bu Yönetmelikte geçen;

- a) Aktif madde: Hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlar ile diğer etmenler üzerine asıl biyolojik etkiyi yapan maddeyi,
- b) Bakanlık: Tarım ve Orman Bakanlığını,
- c) Değerlendirmeye esas tespit limiti (LOD): Doğrulanmış kontrol yöntemleri ile rutin izlemeler sonucunda ölçülebilen, geçerli kılınmış en düşük kalıntı miktarını,
- ç) İşleme faktörü: İşlenmiş üründe bulunan pestisit kalıntı miktarının, işlenmemiş üründe bulunan pestisit kalıntı miktarına oranını,
- d) Maksimum Kalıntı Limiti (MRL): Bu Yönetmelik kapsamındaki ürünlerde yasal olarak bulunmasına izin verilen en yüksek pestisit kalıntı miktarını,
- e) Pestisit: Zirai mücadele araştırma ve uygulamalarında kullanılan her türlü kimyasal madde ve preparatları,
- f) Pestisit kalıntısı: Veteriner tıbbi ürünleri ve biyosidal ürün kullanımından kaynaklananlar da dahil, zirai mücadelede kullanılan bitki koruma ürünleri aktif maddelerinin ve bu maddelerin metabolitlerinin ve/veya parçalanma veya reaksiyon ürünlerinin Ek-1'de belirtilen ürünlerde bulunan kalıntısını, ifade eder.

(2) Bu Yönetmelikte geçen ve birinci fıkrada yer alamayan tanımlar için 5996 sayılı Kanunun 3 üncü maddesinde yer alan tanımlar geçerlidir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### Yönetmelik Ekleri ve Uygulama Esasları

#### Maksimum kalıntı limitleri

**MADDE 5** - (1) Bu Yönetmeliğin eklerine dair açıklamalar şunlardır:

- a) Ürünlere ait kod numaraları, MRL'nin uygulanacağı kategori, grup, alt grup ve temel ürünler, bu ürünlerin bilimsel adları ile ürünlerin MRL değerlendirmesine tabi tutulacak kısımlarını içeren Bölüm A ve bu bölümdeki ürünlerle aynı MRL'lerin uygulanacağı benzer ürünleri içeren Bölüm B, Ek-1'de yer almaktadır.
- b) Türkiye'de, 9/11/2017 tarihli ve 30235 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve Piyasaya Arzı Hakkında Yönetmelik hükümlerine göre ruhsatlandırılmış pestisitlerin kabul edilebilir MRL'leri ve MRL belirlenmesine ihtiyaç duyulmayan pestisitler Ek-2'de yer almaktadır.
- c) İthal ürünlerde ve Ek-2'deki pestisitler için hayvansal ürünlerde uygulanacak MRL'ler ve bu Yönetmelik kapsamındaki ürünlere uygulanacak LOD değerleri Ek-3'te yer almaktadır.
- ç) Türkiye'de kullanımı sonlandırılmış olan yasaklı pestisitler Ek-4'te yer almaktadır.
- d) İthal ürünlerde MRL belirlenmesine ihtiyaç duyulmayan pestisitlere ait liste Ek-5'te yer almaktadır.

#### Uygulama esasları

**MADDE 6** - (1) Ülkemizde üretilmiş ürünlerde aşağıdaki uygulama esasları sırasıyla uygulanır:

- a) Ek-4'te bulunan veya bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden sonra ruhsatı iptal edilmiş olan bir pestisit tespit edilmesi durumunda sırasıyla Ek-3'teki LOD değerine göre, yoksa 0,01\* mg/kg değerine göre değerlendirme yapılır.
- b) Ürünün kod numarası Ek-1 Bölüm A'dan belirlenir. Eğer ürün Ek-1 Bölüm A'da yer almıyorsa Ek-1 Bölüm B'ye bakılır ve bu bölümde bulunan ürün için Ek-1 Bölüm A'da karşılık gelen ürünün kod nu-

marası esas alınır.

c) Belirlenen kod numarası kullanılarak bitkisel ürünlerde Ek-2'de yer alan MRL'ye, hayvansal ürünlerde ise sadece Ek-2'deki pestisitler için Ek-3'te yer alan MRL'ye göre değerlendirme yapılır.

ç) Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve Piyasaya Arzı Hakkında Yönetmelik kapsamında, bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden sonra ruhsatlandırılmış veya acil durumlar için geçici kullanım izni verilmiş pestisitler için Bakanlıkça belirlenmiş MRL'lere göre değerlendirme yapılır.

d) Ruhsatlandırılmamış veya acil durumlar için geçici kullanım izni verilmemiş pestisitlerde Ek-3'teki LOD değerine göre değerlendirme yapılır. Ek-3'te ürün için bir LOD değeri var ise bu değere göre, yoksa ürünün ait olduğu alt grup veya gruptaki en düşük LOD değerine göre, yoksa ürünün ait olduğu kategorideki en düşük LOD değerine, yoksa ürün ve pestisit için belirlenmiş sütündeki en düşük LOD değerine göre değerlendirme yapılır. Ek-3'te LOD değeri bulunamaması halinde 0,01\* mg/kg değerine göre değerlendirme yapılır.

(2) İthal edilen veya piyasaya arz edilmiş ithal ürünlerde aşağıdaki uygulama esasları sırasıyla uygulanır:

a) Ürünün kod numarası Ek-1 Bölüm A'dan belirlenir. Eğer ürün Ek-1 Bölüm A'da yer almıyorsa Ek-1 Bölüm B'ye bakılır ve bu bölümde bulunan ürün için Ek-1 Bölüm A'da karşılık gelen ürünün kod numarası esas alınır.

b) Belirlenen kod numarası kullanılarak Ek-3'te karşılık gelen MRL veya LOD değerine göre değerlendirme yapılır.

c) Ek-3'te pestisit yer almıyorsa 0,01\* mg/kg değerine göre değerlendirme yapılır.

(3) Bitkisel ve hayvansal ürünler için bulunan analiz sonucu, birinci ve ikinci fıkralarda belirtilen uygulama esaslarına göre belirlenen limit değerlerini (MRL veya LOD veya 0,01\* mg/kg) aşamaz.

(4) Ek-1'de tanımlanan ürünler, Ek-5 hariç olmak üzere üçüncü fıkraya uymaması durumunda piyasaya arz edilemez.

(5) Üçüncü fıkraya göre uygun olmayan ürünler pestisit kalıntısı değerlerini düşürmek üzere, kendisiyle aynı veya diğer ürünlerle karıştırılarak veya işlenerek piyasaya arz edilemez.

(6) Bu Yönetmelik kapsamında pestisit kalıntı değerlendirmelerinde ölçüm belirsizliği mevzuata uygun olarak dikkate alınır.

#### **Bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden sonra ruhsatlandırma veya ruhsat iptali**

**MADDE 7 -** (1) Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve Piyasaya Arzı Hakkında Yönetmelik kapsamında, bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden sonra kullanımı sonlandırılmış ve eklerde yer almayan pestisitler için bu Yönetmelikte belirlenmiş MRL'ler, pestisit kullanım sonlandırma tarihinden önce üretilmiş gıdalarda raf ömrü boyunca uygulanır. Kullanımı sonlandırılmış pestisitler bitki koruma ürünleri veri tabanında duyurulur.

(2) Bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden sonra ruhsatlandırılmış veya acil durumlar için geçici kullanım izni verilmiş pestisitler için uygulanacak MRL'ler bitki koruma ürünleri veri tabanında duyurulur. Acil durumlar için geçici kullanım izni verilmiş pestisitlerde uygulanan MRL'ler, pestisit kullanım sonlandırma tarihinden önce üretilmiş gıdalarda raf ömrü boyunca uygulanır.

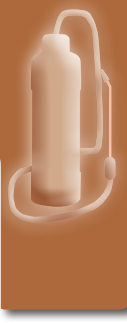
(3) Pestisit kullanım sonlandırma tarihinden sonra üretilmiş gıdalar LOD değerine, LOD yoksa 0,01\* mg/kg değerine göre değerlendirilir.

(4) Resmî kontrollerde pestisit kullanım sonlandırma tarihi veya ürünün üretim tarihine göre işlem gerektiren durumlarda, geçerli belge sunulmaması halinde değerlendirmede güncel tarih esas alınır.

#### **İşlenmiş gıdalar için uygulama esasları**

**MADDE 8 -** (1) İşlenmiş gıdalardaki değerlendirmeler mutlaka Ek-1'deki üründe kalıntı miktarı hesaplanarak ve 6 ncı maddedeki esaslar uygulanarak yapılır.

(2) Ek-1'de listelenmiş ürünlerin işlenmesiyle elde edilmiş işlenmiş gıdalarda aşağıdaki uygulama esasları uygulanır:



- a) İşlenmiş gıdanın elde edildiği Ek-1'deki ürün veya ürünler belirlenir.
- b) İşlenmiş hayvansal gıdalar için işleme faktörü kullanılmaz. İşlenmiş hayvansal gıdaya ait analiz sonucu işlenmemiş ürün için belirlenmiş limitlere uygun olur.
- c) Ek-4'teki pestisitler için işleme faktörü kullanılmaz.
- ç) İşlenmiş gıda analiz sonucu Ek-1'deki ürün için geçerli LOD değerini aşmıyorsa işlenmiş ürün uygun olarak değerlendirilir.
- d) Ek-1'deki üründe 6 ncı maddenin değerlendirmeye esas bölümünde LOD belirlenmiş ise işlenmiş gıda ve pestisit için; belirlenmiş işleme faktörü  $\leq 1$  olması durumunda işlenmiş gıdada MRL olarak LOD değeri kullanılır. İşleme faktörü  $> 1$  ise işlenmiş üründeki kalıntı miktarı işleme faktörüne bölünerek elde edilen değer LOD değeri ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır.
- e) Ek-1'deki üründe ilgili pestisit için 6 ncı maddenin değerlendirmeye esas bölümünde MRL veya LOD bulunmuyor ise işlenmiş gıda için MRL olarak 0,01\* mg/kg değeri kullanılır.
- f) Ek-1'deki üründe ilgili pestisit için 6 ncı maddenin değerlendirmeye esas bölümünde LOD dışında bir MRL belirlenmiş ise işlenmiş üründeki kalıntı miktarı işleme faktörüne bölünerek elde edilen değer, Ek-1'deki işlenmemiş ürünün MRL'si ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır.
- g) İşleme faktörü belirlenmemiş ürünlerde uygulama Bakanlıkça değerlendirilir.

### ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

#### İşleme Faktörü

#### İşleme faktörünün belirlenmesi ve uygulanması ile ilgili esaslar

**MADDE 9** - (1) Ek-1'de yer alan ürünlerin işlenmesiyle elde edilen işlenmiş gıdaların değerlendirilmesi için işleme faktörleri Bakanlıkça belirlenir. İşleme faktörleri belirlenirken uluslararası kabul görmüş metotlara göre yapılmış çalışmalar sonucunda belirlenmiş spesifik veya varsayılan faktörler esas alınır. Spesifik olarak belirlenmiş bir işleme faktörü yoksa ve varsayılan faktörün kullanılması durumunda; uluslararası kabul görmüş metotlara göre daha yüksek varsayılan faktörler olması durumunda dahi bir ürün-pestisit için kullanılacak işleme faktörü 5'i aşamaz. Belirlenmiş işleme faktörleri bir liste halinde uygulama birlikteliğinin sağlanması için [www.tarimorman.gov.tr/GKGM](http://www.tarimorman.gov.tr/GKGM) resmî internet sitesinde yayımlanır ve burada yayımlanmış işleme faktörleri kullanılır.

- (2) İşleme faktörleri belirlenmemiş ürün ve pestisitler için Bakanlıktan görüş alınır.
- (3) İşleme faktörü, işleme teknolojisine bağlı olarak her üründe, her bir aktif madde için ayrı olarak belirlenir.
- (4) Birinci fıkrada belirtilen haller dışında, işleme faktörünün belirlenmesine gerek duyulduğunda Bakanlıkça;

- a) İşlenmiş ürünün beslenme önemi ve tüketim miktarı,
- b) İşleme teknolojisine tabi tutulacak üründeki kalıntı miktarı,
- c) Aktif maddenin veya ilgili metabolitlerinin fiziko-kimyasal özellikleri,
- ç) Ürünün işlenmesi sonucunda toksik metabolitlerin oluşma ihtimali,
- d) Ekstrapolasyon çalışmaları,
- dikkate alınır.

### DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

#### Çeşitli ve Son Hükümler

#### Numune alma ve analiz metotları

**MADDE 10** - (1) Bu Yönetmelik kapsamında, kontrol amacıyla numune alma işlemi, gıdalarda pestisit kalıntılarının resmî kontrolü için numune alma metotları ilgili mevzuata

göre, analizi ise uluslararası kabul görmüş analiz metotlarına göre yapılır.

#### **İdari yaptırımlar**

**MADDE 11 - (1)** Bu Yönetmeliğe aykırı davranışlar hakkında 5996 sayılı Kanunun ilgili maddelerine göre idari yaptırım uygulanır.

#### **Avrupa Birliği mevzuatına uyum**

**MADDE 12 - (1)** Bu Yönetmeliğin hazırlanmasında, 23/2/2005 tarihli ve (AT) 396/2005 sayılı Bitkisel ve Hayvansal Gıdalardaki Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Hakkında Avrupa Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü dikkate alınmıştır.

#### **Yürürlükten kaldırılan yönetmelik**

**MADDE 13 - (1)** 25/11/2016 tarihli ve 29899 mükerrer sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği yürürlükten kaldırılmıştır.

#### **Geçiş hükümleri**

**GEÇİCİ MADDE 1 - (1)** Bu Yönetmeliğin eklerinde pestisit kullanım sonlandırma tarihi belirtilen pestisitler için pestisit kullanım sonlandırma tarihinden önce üretilmiş gıdalar raf ömrü boyunca piyasada bulunabilir. Pestisit kullanım sonlandırma tarihinden sonra üretilmiş gıdalar LOD değerine, LOD yoksa 0,01\* mg/kg değerine göre değerlendirilir.

(2) Bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden itibaren üç ay içerisinde bu Yönetmelik hükümlerine uyum sağlanır. Bu Yönetmeliğin yayımı tarihinden önce üretilmiş ve 13 üncü madde ile yürürlükten kaldırılan Yönetmelik hükümlerine uygun gıdalar raf ömrü boyunca piyasada bulunabilir.

(3) Resmî kontrollerde üretim tarihine göre işlem gerektiren durumlarda, üretim tarihi ile ilgili geçerli belge sunulmaması halinde bu Yönetmelik hükümleri uygulanır.

#### **Yürürlük**

**MADDE 14 - (1)** Bu Yönetmelik yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

#### **Yürütme**

**MADDE 15 - (1)** Bu Yönetmelik hükümlerini Tarım ve Orman Bakanı yürütür.

# KAYNAKÇA

- AYKUT U., TEMİZ H., (Derleme, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi (3) 51-59) Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, 2006.
- AKDOĞAN A., (Doktora Tezi) Bazı Pestisitlerin Kromatografik Ayrılmaları ve Tayinleri, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- AKÇA Y., ALKAN F., ÖZKUL A., DAĞALP S. B., KARAOĞLU M. T., OĞUZOĞLU T. Ç. (Slayt ) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa).
- ALPAY B. M. (Yüksek Lisans Tezi), Kromatografik Strip Test Geliştirerek Şap Virusunu Antijeninin Tespit Edilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2011.
- ALTINIŞIK M. (slayt-sunu), İmmünolojik Teknikler, ADÜTF Biyokimya AD, 2004.
- BAHADIR E. B., MERİÇ PAGANO S., (Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt 3, Sayı 2, 18-28) Pestisit Analizlerinde Elektrokimyasal Biyosensörlerin Kullanımı, 2014.
- Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tekirdağ, Namık Kemal Üniversitesi, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Çorlu, Tekirdağ
- BAŞ D., DENİZ E., (Derleme) Gıda Güvenliği Ve Kalite Kontrolünde Biyosensörler Çankırı Karatekin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Nanobiyanaliz ve Gıda Güvenliği Araştırma Grubu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 2014.
- BEŞERĞİL B., Enstrümantal Analiz, C.B. Üniversitesi, Çeviri, Cilt I, II, Manisa, 2002
- BOZ B., PAYLAN İ. C., KIZMAZ M. Z., ERKAN S., (Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 13 (3), 141-148), Biyosensörler ve Tarım Alanında Kullanımı Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir, 2017
- BOLAT G., (Doktora Tezi), Pestisit Tayini İçin Elektrokimyasal Nanosensörlerin Hazırlanması ve Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, 2016.
- ÇALIŞKAN N., (Slayt/Sunu), İmmünolojik Yöntemler, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Samsun, 2020.
- ÇALIŞIR F., (Doktora Tezi ) Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresinde Bazı Eser Elementlerin Tayin Öncesi Çeşitli Yöntemlerle Ayrılması ve Zenginleştirilmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- ÇETİNKAYA AÇAR Ö., Pestisit Analizleri T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi, 2015.
- ÇON N., (Slayt/Sunu) Özel Histokimya Teknikleri, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Samsun, 2020.
- ÇOLAK D., (Slayt) Klinik Mikrobiyoloji’de Enzimli İmmün Deney “Enzyme Immuno Assay” .
- DOĞAN Y., KOÇ F., Gıdalarda Kimyasal Kalıntılar ve Analiz Metotları, Erciyes Üniv Vet Fak Derg (15(3), 264-270), 2018.
- EYQEM F. Soyanın ELISA İle Nicel Saptanması, Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri, Bölüm 12. European Commission.
- HAHN A., FRIMME F., HÄSCL A., HENKELMANN G., and HOCK B. Immunolabelling of Atrazine Residues in Soil, Lehrstuhl für Botanik der TU München (Weihenstephan), W-8050 Freising 12, FRG Lehrstuhl für Wasserchemie der Universität Karlsruhe, Richard-Willstätter-Allee 5, W-7500 Karlsruhe 1, FRG

Bayer. Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Menzinger Str. 54, W-8000 München 19, FRG.

KAYA E., AKATA I., BAKIRCI S., DERELİ D., KÜÇÜKGÜVEN E., YILMAZ İ., (Derleme) İmmünokromatografik Kart Testlerin Çalışma Prensipleri Ve Üretim Teknikleri, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi (16(3): 45-53), 2014.

KARAKOÇ Ö., NAKİBOĞLU N., Ditiyokarbamat Pestisitleri ve Tayin Yöntemleri, BAÜ FBE Dergisi Cilt:12, Sayı:1, s.112-135, 2010.

Kışlalıoğlu M., Berkes F., Ekoloji ve Çevre Bilimleri, s. 36-37.

KÖKBAŞ U., KAYRIN L., TULİ A. (Arşiv Kaynak Tarama Dergisi ), Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Adana, Turkey

Li, Yanbin. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: DEMİRCİOĞLU P. ve BÖĞREKÇİ İ., Çeviri Editörleri: TARHAN S. ve ÖZGÜVEN M. M., 2006.

MİNBAŞ F. Z., EYİGÖR Ö., ÇAVUŞOĞLU İ., KAHVECİ Z., Reseptör İmmünohistokimyasında Mikrodalga Işınımlı "Antijen Retrieval" Yönteminin Kullanımı, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 28 (2): 21-26, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bursa, 2002.

ÖZÖĞÜT D., Organik Kimya Lab. Notları, ESOĞÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü.

KARAKOÇ Ö., NAKİBOĞLU N., Ditiyokarbamat Pestisitleri ve Tayin Yöntemleri, BAÜ FBE Dergisi Cilt:12, Sayı:1, s.112-135., 2010.

SIFATULLAH K. M., TUNCEL S. G. (). Çevresel Örneklerde Pestisit Analizi; Su ve Toprak Kirliliği 6. Ulusal Hava Kirliliği ve Kontrolü Sempozyumu, İzmir, 7-9 Ekim 2015.

ŞEN GÜRSOY S. , GÜRSOY O., (Derleme Makale ) Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Burdur, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur, 2017.

TAĞI Ş., İmmunolojik Teknikler-Gıda Mikrobiyolojisinde Uygulamaları, 2017.

TİMUR S., (Doktora Tezi) Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Pestisit Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Biyokimya Anabilim Dalı Bilim Dalı, İzmir, 2001.

TİRYAKİ O., Türkiye’de Yapılan Pestisit Kalıntı Analiz ve Çalışmaları, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 17020, Çanakkale, Türkiye. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):72-82.

Toros Üniversitesi, ELISA READER (Biochrom Anthos 2020), KULLANIM TALİMATI.

VATANSEVER H. S., Hücreyi İnceleme Yöntemleri, İmmünohistokimya ve Tunel Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD Manisa, Yakın Doğu Üniversitesi Desam Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu Temel Prensipler, 3-4 Haziran 2016.

YAVUZ O., AKSOY A., (Derleme), Pestisit Analizlerinde Kullanılan Metotlar, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Samsun, 2016.

YETİŞMEYEN A., İmmünojenik Test Yöntemlerinin Süt Sanayiinde Kullanımı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara.

YILMAZ F. M., KILINÇ Ö. O., GC-MSMS’de Pestisit Analizi Çalışma Talimatı, Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü.

YILMAZ F. M., KILINÇ Ö. O., LC-MSMS Çalışma Talimatı, Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü.



YILDIZ G., (Yüksek Lisans Tezi), İyon Hareketliliği Spektrometresi ile Birleştirilmiş LC-MSMS Cihazı Kullanılarak Bazı Sebzelerde Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi, T.C. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2012.

TDK'ye göre düzenlenmiştir.

## GENEL AĞ KAYNAKÇASI

<http://www.foodelphi.com/gaz-kromatografisi/> erişim tarihi 05.12.2021 saat: 21:50

<https://docplayer.biz.tr/108930570-Mankozeb-kalintilarinin-domates-matrisinde-gc-ms-kullanilarak-tanimlanmasi.html> Erişim tarihi 06.12.2021 saat:22:25

[https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/74/yuksek-performansli-sivi-kromatografi-hplc#:~:text=Y%C3%BCksek%20performansli%C4%B1%20s%C4%B1v%C4%B1%20kromatografisi%20\(daha,analitik%20kimyada%20kullan%C4%B1lan%20bir%20tekniktir.](https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/74/yuksek-performansli-sivi-kromatografi-hplc#:~:text=Y%C3%BCksek%20performansli%C4%B1%20s%C4%B1v%C4%B1%20kromatografisi%20(daha,analitik%20kimyada%20kullan%C4%B1lan%20bir%20tekniktir.) Erişim tarihi 21.11.2022 saat 19:25

[file:///C:/Users/ACER/Downloads/Hafta%207%20HPLC%20\(%20Y%C3%9CKSEK%20PERFORMANSLI%20SIVI%20KROMATOGRAF%C4%B0S%C4%B0\)-GT%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/ACER/Downloads/Hafta%207%20HPLC%20(%20Y%C3%9CKSEK%20PERFORMANSLI%20SIVI%20KROMATOGRAF%C4%B0S%C4%B0)-GT%20(1).pdf) Erişim tarihi 03.12.2021 saat: 18:05

[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/42/097/42097931.pdf?r=1&r=1](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/42/097/42097931.pdf?r=1&r=1) Erişim tarihi 20.11.2021 saat 19:05

<https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=TqZz5J4qNEPw4jGLuCLE9Q&no=eGzZWIPVA1X8d-wlCyUYZw> Erişim tarihi 20.11.2021 saat 19:35

<https://acikerisim.uludag.edu.tr/bitstream/11452/3433/1/202287.pdf> Erişim tarihi 22.11.2021 saat 19:00

[http://besergil.cbu.edu.tr/25\\_BOLUM\\_8.pdf](http://besergil.cbu.edu.tr/25_BOLUM_8.pdf) Erişim tarihi 22.11.2021 saat 20:55

## GÖRSEL KAYNAKÇASI



Kitabın görsel kaynakçasına bu karekodu okutarak ulaşabilirsiniz.

# CEVAP ANAHTARI

## 1. Öğrenme Birimi

1. Pestisit
2. Etken
3. Zehirlenmelere
4. Ekstraksiyon
5. Kuru
6. Pestisit
7. D
8. C

## 2. Öğrenme Birimi

1. antikor-antijen
2. 12 x 8 = 96 adet kuyucuklu
3. Akış enjeksiyon analizi (FIA)
4. antikor temelli biyosensörler ya da immünosensörler
5. immuno-enzim, (Enzyme immunoassay)
6. D
7. C
8. E

## 3. Öğrenme Birimi

1. Spektrofotometre
2. Işını
3. UV - Vis
4. Hedef
5. Enjekte
6. Organik
7. C
8. B

## 4. Öğrenme Birimi

1. kromatografi	12. D
2. Sabit faz	13. D
3. 110 °C	14. C
4. Adsorpsiyon	15. A
5. 150 - 200	
6. Kütle/yük (m/z)	
7. duyarlılık	
8. İyon dedektörü	
9. termal	
10. Çözünürlük	
11. 0,1 - 20	