



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BAZI PESTİSİTLERİN AYIRMA YÖNTEMLERİ İLE
ANALİZİ, PESTİSİT-DNA ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ
VE DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI**

Boğaç Buğra BARUT

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. BENGİ USLU**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI PESTİSİTLERİN AYIRMA YÖNTEMLERİ İLE
ANALİZİ, PESTİSİT-DNA ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ
VE DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI**

Boğaç Buğra BARUT

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. BENGİ USLU**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Boğaç Buğra BARUT tarafından hazırlanan

“Bazı Pestisitlerin Ayırma Yöntemleri ile Analizi, Pestisit-DNA Etkileşimin İncelenmesi ve DNA Hasarının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ /OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.05.2022

Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. İ. Murat PALABIYIK

Ankara Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı Pestisitlerin Ayırma Yöntemleri ile Analizi, Pestisit-DNA Etkileşimin İncelenmesi ve DNA Hasarının Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Boğaç Buğra Barut

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitler	1
1.2. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Yapı ve Özellikleri	6
1.3. Pestisitler ile Yapılmış Çalışmalar	8
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Peptisitler	18
2.1.1. Tiram	18
2.1.2. Epoksikonazol	18
2.1.3. Hekzakonazol	19
2.1.4. Tebukonazol	19
2.1.5. Dietofenkarb	20
2.2. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın eş zamanlı miktar tayini için geliştirilen YPSK yönteminde;	22
2.2.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	22
2.2.2. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	23
2.2.3. Toprak Numunelerin Hazırlanması	23
2.2.4. Elma Numunelerin Hazırlanması	24
2.2.5. İdrar Numunelerin Hazırlanması	24
2.3. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın DNA ile etkileşiminin incelenmesi için geliştirilen YPSK yönteminde;	25
2.4. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın eş zamanlı miktar tayini ve pestisit-DNA etkileşmesinin incelenmesi için kullanılan YPSK yöntemi;	25
2.4.1. Kromatografi	25
2.4.2. Dağılma Kromatografisi	27
2.4.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi	27
2.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	28
2.4.5. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri	29
2.4.6. Pompalama Sistemleri	30
2.4.7. Numune Enjeksiyon Sistemleri	30
2.4.8. Sıvı Kromatografi Kolonları	30
2.4.9. Dedektörler	31
2.4.10. Foto Diyot Dizi Dedektör	32
2.5. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb pestisitlerinin DNA hasarlarının incelenmesi;	33

2.5.1. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar	33
3. BULGULAR	37
3.1. Optimizasyon Çalışmaları	37
3.2. Kalibrasyon ve Validasyon Çalışmaları	51
3.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmaları	68
3.4. Pestisitlerin DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi	70
3.5. Pestisitlerin DNA Hasarının İncelenmesi ve Komet Testi Sonuçları	77
4. TARTIŞMA	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
ÖZET	86
SUMMARY	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	96



ÖNSÖZ

Tez kapsamında tarımda mantarlara karşı kullanılan pestisitlerden Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın komet testi ile DNA'ya yaptıkları hasarlar araştırılmıştır ve ilk kez eş zamanlı tayini için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Bu sebeple, çeşitli sabit fazlar denenerek maddelerin ayırımları için en iyi sabit faz belirlenmiştir. Diğer taraftan farklı hareketli faz kompozisyonları, farklı derişimlerde tampon çözeltiler, sıcaklık, akış hızı etkileri gibi deney şartları da optimize edilmiştir.

Öncelikle bana analitik kimyayı sevdiren, her daim yanımda olan, tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

DNA hasarı çalışmalarımda desteklerinden dolayı Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a ve Arş. Gör. Seda İPEK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana yardımcı olan Uzm. Kim. Müh. Cem Erkmen başta olmak üzere Analitik Kimya Anabilim Dalının bütün hocalarına vermiş oldukları bilgiler için teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında vermiş olduğu desteklerinden dolayı Kim. Ceyda BİLGİNAY'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca bizzat benim ile birlikte Ankara'ya gelen prenses kızım Bilge Beste BARUT ve aslan oğlum Bilgehan Bartu BARUT'a ve her zaman yanımda olan, desteğini bir an olsun esirgemeyen, hayat arkadaşım, eşim İnci BARUT'a sonsuz teşekkür ederim.

Lisans, yüksek lisans ve doktora öğrenim sürecinde benden hiçbir desteği esirgemeyen ve benim bugünlere gelmemde çok büyük katkıları olan, her zaman ve her koşulda benim yanımda olan annem Figen BARUT ve babam Cevat BARUT’a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarıma proje desteği ile katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün 20L0237007 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



SİMGELER VE KISALTMALAR

A_0	Maddenin pik alanı
A	DNA-madde kompleksinin pik alanı
α	Seçicilik Faktörü
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
CN	Siyano
DCD	Disiyandiamid
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
DIE	Dietofenkarb
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş kartal ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DTC	ditiyokarbamat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ϵ_G	Maddenin absorpsiyon katsayısı
ϵ_{H-G}	DNA-madde kompleksinin absorpsiyon katsayısı
EPO	Epoksikonazol
FDD	Foto diyot dizi detektörü
GK	Gaz kromatografisi
HEX	Hekzakonazol
K	Bağlanma sabiti
k	Kapasite Faktörü
LMPA	Düşük erime noktalı agaroz
LSD	En az önemli fark testi
N	Etkin Tabaka Sayısı
NMPA	Normal erime noktalı agaroz
ODS	Oktadesilsilan
PE	Polietilen
RNA	Ribo Nükleik Asit

Rs	Ayrırma Gücü
SEM	Ortalamının standart hatası
SERS	Raman spektroskopisi
SK	Sıvı kromatografisi
SK-KS/KS	Sıvı kromatografisi- Kütle/Kütle spektroskopisi
SUT	Sistem Uygunluk Testi
TAS	Tayin alt sınırı
TEB	Tebukonazol
TFSK	Ters faz sıvı kromatografisi
THR	Tiram
TNS	Tripsin nötralizasyon çözeltisi
TS	Teşhis sınırı
t_r	Alıkonma zamanı
UV	Ultra viyole
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
3T3	Fare fibroblast hücresi

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Hindistan’da Union Carbide firmasında meydana gelen kazadan haber (Vaihayasi 2016). 3
- Şekil 2.1.** Tez kapsamında çalışılan pestisitlerin kimyasal yapıları A) THR, B) EPO, C) HEX, D) TEB ve E) DİE. 20
- Şekil 2.2.** Kromatografik ayırımın şematik gösterimi (Sagar 2022). 26
- Şekil 2.3.** YPSK cihazının şematik gösterimi (1) Solvent rezervuarları, (2) solvent gaz giderici, (3) gradyan valfi, (4) mobil fazın iletimi için karıştırma kabı, (5) yüksek basınç pompası, (6) anahtarlama valfi “enjeksiyon konumunda”, (6) anahtarlama valfi “yük konumunda”, (7) numune enjeksiyon döngüsü, (8) ön kolon (koruyucu kolon), (9) analitik kolon, (10) dedektör, (11) veri toplama, (12) atık veya fraksiyon toplayıcı (wikipedia). 29
- Şekil 3.1.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) (A), THERMO HYPERSİL C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (B), PHENYL112 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (C) ve INERTSİL C8 (150 x 4,6 mm, 5µm) (D) sabit fazların etkisini gösteren kromatogramlar. 38
- Şekil 3.2.** Farklı dalga boyu denemelerine ait kromatogramlar. 39
- Şekil 3.3.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/ dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol (A) ve asetonitril (B): 5 mM amonyum asetat (pH: 6,3); (77,5/22,5; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar. 40
- Şekil 3.4.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/ dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5mM amonyum asetat (A), 5mM amonyum format (B) (pH: 6,3); (77,5/22,5; h/h) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar. 41
- Şekil 3.5.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM (A), 10 mM (B), 20 mM (C), ve 40 mM (D) amonyum asetat (pH: 6.3); (77.5/22.5; h/h) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar. 42
- Şekil 3.6.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol (75/25; h/h) (A), (77,5/22,5; h/h) (B), (80/20; h/h) (C), (85/15; h/h) (D), (90/10; h/h) (E) ve (95/5; h/h) (F): 5 mM amonyum asetat (pH: 6.3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar. 44
- Şekil 3.7.** LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h), pH: 2,0 (A), pH: 4,0 (B), pH: 6,3 (C) ve pH: 8,0 (D) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar. 46

Şekil 3.8. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, 0,6 mL/ dk (A), 0,8 mL/ dk (B), 1 mL/ dk (C), 1,1 mL/ dk (D) ve 1,2 mL/ dk (E), 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h) (pH: 6,3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.	48
Şekil 3.9. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C) kolon sıcaklığı, 1 mL/ dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h) (pH: 6,3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.	50
Şekil 3.10. Optimum koşullarda kalibrasyon kromatogramları; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.	52
Şekil 3.11. Optimum koşullarda kalibrasyon eğrileri; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.	53
Şekil 3.12. Optimize edilen koşullarda THR içeren zirai ilaç (A), TEB içeren zirai ilaç (B), elma suyu (C), toprak (D), içme suyu (E), kuyu suyu (F), atık su (G) serum (H) ve idrar (I) numuneleri ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonucunda kaydedilen kromatogramlar.	59
Şekil 3.13. Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait sonuçlar; 0.1 M HCl (A), 1 M HCl (B), 0.1 M NaOH (C), 1 M NaOH (D), % 0.3 H2O2 (E), % 3 H2O2 (F), UV (G), Etüv (H).	69
Şekil 3.14. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 µg/mL DİE üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.	72
Şekil 3.15. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 µg/mL EPO üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.	72
Şekil 3.16. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-EPO etkileşimi için 1/[DNA]'ya karşı A0/(A-A0) grafiği.	73
Şekil 3.17. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 µg/mL HEX üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.	73
Şekil 3.18. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-HEX etkileşimi için 1/[DNA]'ya karşı A0/(A-A0) grafiği.	74
Şekil 3.19. A) pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 20 µg/mL TEB üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar, B) DNA'ya ait kromatogramların yakından görünümü, C) TEB'e ait kromatogramların yakından görünümü.	75
Şekil 3.20. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-TEB etkileşimi için 1/[DNA]'ya karşı A0/(A-A0) grafiği.	75
Şekil 3.21. A) pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 5 µg/mL THR üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar, B) THR'ye ait kromatogramların yakından görünümü.	76

Şekil 3.22. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-THR etkileşimi için $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ grafiği. 77

Şekil 3.23. Pestisitlerin neden oldukları DNA hasarlarına ait sonuçlar. 79



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmalar kapsamında kullandığımız kolonlar ve özellikleri.	21
Çizelge 2.2. Çalışmalarda kullandığımız kimyasal maddeler.	22
Çizelge 3.1. SUT parametrelerine göre organik çözücü etkisi.	40
Çizelge 3.2. SUT parametrelerine göre tampon çözeltilerinin türlerinin kıyaslanması.	42
Çizelge 3.3. SUT parametrelerine göre tampon çözelti molaritesinin kıyaslanması.	43
Çizelge 3.4. SUT parametrelerine göre hareketli faz bileşimlerinin kıyaslanması.	45
Çizelge 3.5. SUT parametrelerine göre tampon çözelti pH'sının kıyaslanması.	47
Çizelge 3.6. SUT parametrelerine göre akış hızının kıyaslanması.	49
Çizelge 3.7. SUT parametrelerine göre kolon sıcaklığının kıyaslanması.	50
Çizelge 3.8. Pestisitlerin eş zamanlı analizi için optimize edilmiş kromatografik şartlar.	51
Çizelge 3.9. Pestisitlere ait sistem uygunluk testi parametreleri.	51
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan çözücü, elma suyu ve toprak örneklerinde validasyon parametreleri.	56
Çizelge 3.11. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan içme suyu, kuyu suyu ve atık su örneklerinde validasyon parametreleri.	57
Çizelge 3.12. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan insan serumu ve insan idrarı örneklerinde validasyon parametreleri.	58
Çizelge 3.13. Ticari satılan tarım ilacı için geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	60
Çizelge 3.14. Elma suyuyla yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	61
Çizelge 3.15. Toprak ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	62
Çizelge 3.16. İçme suyu ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	63
Çizelge 3.17. Kuyu suyuyla yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	64
Çizelge 3.18. Atık su ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	65
Çizelge 3.19. Serum ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	66
Çizelge 3.20. İdrar ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.	67
Çizelge 3.21. Ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.	78

1. GİRİŞ

1.1. Pestisitler

Pestisitlerin tarımda kullanılması ile elde edilen hasatlarda ciddi oranlarda artışlar sağlanmaktadır. 1930 ve 1940 yılları arasında, tütün ve pamuk gibi gıda olarak tüketilmeyen ürünlerde diklorodifeniltrikloroetan (DDT) kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda dünya çapında herbisit, insektisit ve fungusitlerin kullanılması da artmıştır. Elde edilen gıda hasılatını arttırmak için, II. dünya savaşından sonra pestlere karşı kullanılan tarım ilaçlarını geliştirmek için ciddi anlamda çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalar sonucunda şu anki pestisitler ve diğer tarım ilaçları bulunmuştur. Fakat, ilerleyen yıllarda pestisitlerin modern tarımda fazla kullanılması bir çok dezavantajı da beraberinde getirmiştir. Bundan dolayı yeryüzündeki fauna ve flora hasara uğramış, yüzeysel ve yer altındaki sularda ve hatta deniz sularında kirlenmeler ortaya çıkmıştır. Günümüzde de modern tarım aşamalarında pestisitlerin yaygın kullanılması birçok sorun ortaya çıkarmaktadır. Pestisitlerin neden olduğu en büyük sorunlardan biri; besin yolu ile alınan gıdalarda pestisitlerin hangi oranda olması gerektiğine dair yeterli bilginin olmamasından kaynaklanmaktadır. Çiftlikte yaşayan hayvanlar pestisitli bitkilerle beslendiğinde, pestisit kalıntıları hayvanların vücudunda “gut” isimli bakteriye sebep olabilmektedir. Bu hayvanların etlerinin tüketilmesiyle kimyasal maddeler özellikle çocuklarda birikmekte ve hastalıklara neden olabilmektedir (Wang ve ark., 2021; Čuš ve ark., 2021; Campanale ve ark., 2021 ve Shah ve ark., 2021).

Bitkileri korumak amaçlı yapılan ilaçlamalar sonucunda kullanılan kimyasal maddelerin çevredeki sirkülasyonu karmaşık ve çok yönlü yapıdadır. Bahçe, tarla veya ormandaki ağaçların hastalık veya bitkilerde yaşayan zararlı canlılara karşı yapılan ilaçlamalar sonucunda ilaç zerrelere havaya, toprağa ve yağmur sularıyla yer altında bulunan sulara ve bunların neticesinde su ekosistemine karışabilmektedirler. Bitkilerde var olan pestisit kalıntıları, bazen besin yoluyla insan ve hayvanlara geçebilmekte ve ani zehirlenme vakalarına ve dahası genetik yapıyı etkileyerek

kanser hastalığına neden olacak kadar tehlike arz edebilmektedir. Her hangi bir pestisit kullanılmayan kutuplarda yaşayan ayı balıklarında, penguenlerde ve eskimolarda'da DDT maddesinin varlığı saptanmış ve bu durum tarımda kullanılan ilaçların dünyadaki sirkülasyonunun ne kadar tehlikeli olduğunu göstermiştir (Sarker ve ark., 2021; Castilla ve ark., 2021 ve Maggi ve ark., 2021).

Tarımda pestisitlerin kullanımı ile sağlık ve ekonomik olarak ciddi anlamda yarar sağlamaktadır. Fakat yanlış kullanılmaları sonucundan ciddi derecede zararlı boyutları ortaya çıkmıştır. Pestisitlerin intihar amaçlı veya yanlış kullanımları sonucu, akut ve kronik zehirlenmeler görülebilmektedir. Evlerde kullanılmaları ile ortaya çıkan kazaen zehirlenmeler, bitmiş ambalaj kutularının rastgele atılması, pestisitlerin uygulama talimatına uymama veya tamamen yanlış bir kullanıma bağlı olarak olabilmektedir. Örneğin Türkiye'de 1979 yılının ağustos ayında Ödemiş ilçesinde Folidol (parathion) şişesi ile zeytinyağı şişesini yan yana koyan yaşlı bir kadının, yanlışlıkla Folidol ile börek kızartan ve bu börekleri yiyen 16 kişi zehirlenmiş ve bu 16 kişiden 6'sı maalesef ölmüştür (Zhang ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2022 ve Sarker ve ark., 2021).

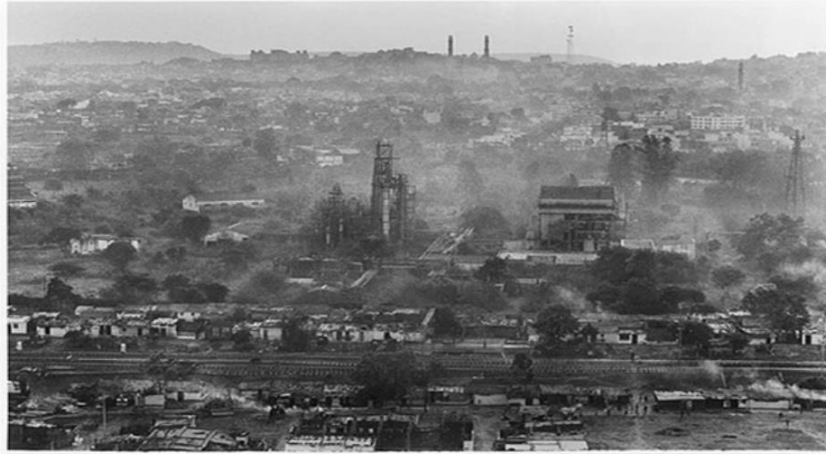
Pestisit kalıntısı içeren gıdaların tüketilmesi ile kronik veya akut zehirlenmeler oluşabilmektedir. Sebze ve meyvelere pestisit uygulanma işleminden sonra gerekli yıkama işlemi yapılmadan ve bekleme süresine dikkat edilmeden tüketilen besinler ile zehirlenme vakalarına rastlanılmaktadır. 1963 yılında Bursa ilinde Folidol ile ilaçlama yapılmış şeftaliyi tüketen 32 kişi içinden 7 kişinin ölmesi, 1979 yılında Ödemiş ilçesinde Folidol ile ilaçlama yapılmış karpuz yiyen 7 kişinin zehirlenmesi akut zehirlenmelere birer örnek olarak verilebilir (Erkmen ve ark., 2020 ve Tajdar ve ark., 2021).

Pestisitlere maruz kalma sonucu meydana gelen mesleki zehirlenmeler gelişmekte olan ülkelerde ve gelişmiş ülkelerde rastlanılmaktadır. Fakat gelişmiş olan ülkelerde gerekli koruyucu önlem ve tedbirlerin alınması ile birlikte, iş yeri ortamında ve buna maruz olan çalışanlarda biyolojik ve çevresel izlemenin yapılabilmesiyle zehirlenmeler ciddi oranda azaltılabilmektedir. Pestisitlere mesleki

maruz kalma başlıca deri olmak üzere, solunum yoluyla ve daha az oranda ise oral yol ile olduğu görülmektedir. Endüstri kazasında meydana gelen pestisit zehirlenmeleri, sadece mesleki olarak değil, hatta çevrede yaşamakta olanları bile etkileyebilmektedir. Bu duruma örnek olarak 1984'te Hindistan'da Union Carbide isimli firmasına (Şekil 1.1.) ait karbamat grubundan olan bir pestisit üretimi yapan fabrikada, metil izosiyanat maddesinin bulunduğu tanktan kazayla sızmasının sonucunda, çevrede bulunan 2500 bireyin ölmesine sebep olmuştur (Delińska ve ark., 2021 ve Kamboh ve ark., 2021).

Dünyanın zehirlendiği gün: Bhopal faciası

3 Aralık 1984, gece yarısından hemen sonra ölüm aniden geldi. Hindistan'ın Bhopal bölgesindeki Union Carbide fabrikasının yüksek bir bacasından ince bir beyaz buhar dumanı çıkmaya başladı.



Şekil 1.1. Hindistan'da Union Carbide firmasında meydana gelen kazadan haber (Vaihayasi 2016).

Pestisitler; ilacın fiziki haline göre, formülasyon şekillerine göre, kullanma tekniğine göre, kullanılmış oldukları zararlılara , etkileyiş şekline, zararlının biyolojik dönemine, kontrol ettiği zararlıların olduğu yer ve konukçu durumuna, bileşimindeki etken maddenin grubuna göre olmak üzere çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. Yapısındaki aktif madde grubuna ve kullanıldıkları zararlı gruplarına göre yapılan sınıflandırmalar en çok kullanılandır (Fu ve ark., 2021; Abubakar ve ark., 2019 ve Chavoshani ve ark., 2020).

Kullanıldıkları zararlı grubu ve bileşimindeki etkili madde grubuna göre pestisitler;

- İnsektisitler (Böcekleri öldüren)
- Akarisitler (Akarları öldüren)
- Kışlık mücadele ilaçları ve yazlık yağlar
- Nematisitler, fumigantlar, ve toprak fumigantları
- Rodentisitler ve mollussisidler
- Fungisitler (fungusları öldüren)
- Herbisitler (Yabancı otları öldüren)
- Bitki koruma alanında kullanılan diğer maddeler

olmak üzere 8 ayrı sınıfta değerlendirilebilirler.

Pestisitler sadece kullanıldıkları zararlılara göre sınıflandırıldığında bu gruplara afisit (yaprak bitlerini öldüren), fungustatikler (fungusların faaliyetlerini durduranlar), bakterisit (bakterileri öldüren), repellent (kaçırıcılar), avensitler (kuşları öldüren veya kaçırıcılar), algisitler (algileri öldürenler), atraktanlar (çekiciler) da dahil edilmektedir (Parween ve ark. 2019).

Ayrıca, kullanıldıkları zararlı gruplarına veya hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırma şeklinde, fungisit, insektisit ve herbisitler yer almaktadır. Herbisit, insektisit ve fungisitler içinde yer alan pestisitler, yapısına göre sınıflandırıldığında amidler, benzoik asitler, karbamatlar, nitriller, nitroanilinler, organofosforlular, fenoksi asitler, piridinler ve amonyum bileşenleri, piridazinler ve piridazinonlar, triazinler, ürealar, fenilurealar, sulfonilurealar, benzoilurealar, organoklorlular, organofosforlular, pirethroidler, azoller, benzimidazoller, dithiokarbamatlar, morfolinler ve diğerleri gibi gruplara ayrılırlar (Parween ve ark., 2019 ve Ochoa ve ark., 2018).

İnsan ve çevre sağlığı açısından önem taşıyan ve farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip olan yüzlerce aktif maddeyi içeren pestisitlerin, farklı ortamlarda, aynı anda analiz edilebiliyor olması gerekliliği, hızlı, hassas, güvenilir, sağlam ve maliyeti düşük analiz metotların geliştirilmesi ile mümkündür.

1960 - 1970 yıllar arasında gaz kromatografisi (GK) tekniğinin geliştirilmesi ve dolgulu kolonların çoklu kalıntı analizlerinde kullanılabiliyor olması, bu kromatografi türünün pestisit analizlerinde kullanılmaya başlanması önünü açmıştır. Daha sonralarında ise, yüksek ayırma gücüne sahip kapiler kolonlar kullanılarak seçici ve hassas dedektörlerin geliştirilmesi, tek seferde analiz edilebilen aktif madde sayısının ciddi oranda artışını sağlamış ve gelişmelerin sonucunda kapiler GK tekniğinin pestisit analizlerinde en çok tercih edilen yöntem olmuştur (Novak ve ark., 2010; Fan ve ark., 2015; Giacinti ve ark., 2017 ve İslam ve ark., 2021).

İlerleyen dönemlerde GK ile analizi mümkün olmayan yapıda olan; polar, uçuculuğu düşük veya ısıya karşı duyarlılığı olan pestisitlerin analizlerinde olan sıkıntılar; 1980'li yıllarda uygun Ultra Viyole (UV) veya floresans dedektör ile birleştirilen ters faz sıvı kromatografisinin (TFSK) pestisit analizlerinde kullanılmasıyla aşılmış ve sıvı kromatografisi (SK), özellikle polar pestisitlerin analizinde GK'yı tamamlayıcı yöntem olarak kullanılmasının önü açılmıştır. İlerleyen zamanlarda dedektör ve kolon materyali teknolojisindeki gelişmeler SK analiz alanının ciddi oranda artmasına imkan vermiştir (Masiá ve ark., 2014; Gómez ve ark., 2013 ve Kaur ve ark., 2021).

Bu tez kapsamında ilk olarak, fungusit grubu pestisitlerden Tiram (THR), Epoksikonazol (EPO), Hekzakonazol (HEX), Tebukonazol (TEB) ve Dietofenkarb (DİE)'nin eş zamanlı tayinleri için ilk kez, kısa sürede, doğru, hassas, seçici ve tekrarlanabilir sonuçlar sunan yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) yöntemi geliştirilmiştir.

1.2. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Yapı ve Özellikleri

Deoksiribo nükleik asit (DNA), tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. DNA'nın başlıca rolü bilgiyi uzun süre saklamasıdır. DNA ilk kez İsviçreli hekim Friedrich Miescher tarafından saflaştırılmıştır, kendisi 1869'da atık cerrahi pansumanlardaki irin içinde mikroskobik bir madde keşfetmiştir. Hücre çekirdeklerinde (nükleus) bulunduğu için ona "nüklein" adını vermiştir. 1919'da Phoebus Levene, nükleotit birimleri oluşturan baz, şeker ve fosfatı tanımlamıştır. Levene DNA'nın, birbirine fosfat grupları ile bağlı olan nükleotit birimlerden oluşan bir zincir olduğunu öne sürmüştür. Ancak, Levene, bu zincirin kısa olduğunu ve bazların kendini tekrar eden bir sıralamaya sahip olduğunu düşünmüştür. 1937'de William Astbury DNA'nın düzenli bir yapıya sahip olduğunu gösteren ilk X ışını difraksiyon görüntülerini elde etti. DNA'yı meyadan getiren zincir yapılar birbirlerinden rahatlıkla ayrılabilir ve tekrardan birleşebilen gelebilen bir yapıda olduğundan dolayı DNA'nın replikasyonuna ve protein sentezine imkan sağlamaktadır. DNA molekülünde var olan hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler sonucunda nükleotidler arasındaki kovalent bağlar çözülür ve bu olaya denatürasyon ismi verilir. Çözölmüş olan hidrojen bağlarının tekrardan oluşması, nükleotidlerin bir araya gelerek sarmal yapıyı tekrardan oluşmasını sağlamaktadır ve buna renatürasyon ismi verilir. DNA molekülünün başlıca iki görevi bulunmaktadır. Hücre bölünmeye hazırlandığı esnada DNA molekülünün kendini kopyalaması ilk görevidir ve buna replikasyon ismi verilir. Bu olayda iki sarmal zincirini bir arada tutmakta olan hidrojen bağları tıpkı fermuar misali açılmaktadır. Açık olarak kalan nükleotidler ise hücrede daha öncesinden sentezlenmiş nükleotidler ile tamamlanmaktadır. Sonuç olarak aynı iki DNA oluşmaktadır. Diğer görevi ise; kendisinde var olan bilgiyi Ribo Nükleik Asit'e (RNA) aktarım yapmasıdır ve bu olaya transkripsiyon ismi verilir. Bu durum neticesinde RNA'da toplanmış olan bilgi, ribozomlarda enzim ve protein benzeri maddelerin sentezlenmesine olanak sağlamaktadır ve buna translasyon adı verilmektedir (Marçal ve ark., 2020 ve Kapka ve ark. 2019).

KontROLSÜZ ve hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerin sebep olduğu kanser hastalığı, hücre içerisinde büyüme kontrolünün yitirilmesine neden olmaktadır. Hücre bölünmesi, dokuların yenilenmesi ve onarımı maksadıyla meydana gelmektedir. Kanserli hücrelerin oluşmasının ana nedeni ise, hücre bölünmesi esnasında ortaya çıkan yanlış DNA replikasyonlarıdır. Bu yanlış DNA replikasyonuna sebep olan faktörlere predispozan (hazırlayıcı) faktörler denmektedir. Kanser bütün tiplerinde ana patolojik mekanizmaları birbirine benzer olsalar da ilerleyişleri farklı şekilde olabilmektedir. Hastalığın ilerlemesi ve tedavi edilmesi; büyüme ve yayılma hızlarına, başladığı yaşa, bulunduğu organ veya dokuya, evrelerine ve tedaviye verdikleri cevaba göre farklılıklar göstermektedir. Kanser hastalığı; hücre içi fonksiyon bozukluğuna neden olan mutasyonlar, kimyasal faktörler, radyasyon veya başka kanserojen ajanlara maruziyet neticesinde meydana çıkmaktadır. Kanserli hücreler normal büyüme sinyalleri olmadan da yaşayabilmektedirler ve sınırı olmaksızın replikasyon potansiyellerine sahiptirler ve bundan dolayı kontrolsüz bir şekilde yayılabilmektedirler (Nishiyama ve ark., 2021 ve Rahnamay ve ark., 2021).

DNA molekülünün kimyasal olarak bazı maddelerle etkileşme girmesi ve bu etkileşmelerin farklı yöntemler kullanılarak tayin edilebilir olması, son yıllarda önemli bir konu olarak ele alınmaktadır. Etkileşmelerinin bir kısmı kovalent bağlarla, bir kısmı da kovalent olmayan etkileşmelerle ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşimlerin neticesinde DNA-madde kompleks yapısı oluşmaktadır. Yan etkileri en az düzeye indirilen bir maddeyi sentezleyebilmek için, ve sentezlenen bu maddenin etki mekanizmasının aydınlatılmasının yanında hücre özelliklerinin de mutlaka iyi biliniyor olması gerekmektedir. Hücrelerde ortaya çıkan değişikliklerin açıklanması ve saptanması ise gün geçtikçe zor hale gelmektedir. Hücresel fonksiyon için gerekli tüm genetik bilgiyi içeren bir molekül olarak DNA, farklı koşullar altında, özellikle bazı moleküller ile etkileşime girerek zarar görebilir ve canlı organizmalarda çeşitli patolojik değişikliklere yol açabilir. Bu nedenle, pestisitler gibi küçük moleküller ile DNA etkileşimi, pestisitlerin fizyolojik olarak etkileşim mekanizmasını anlamak için onlarca yıldır yoğun olarak araştırılan bir konu olmuştur. Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanması, esas olarak, DNA'nın küçük oluğu boyunca hidrofobik

etkileşimi, dış şeker-fosfat omurgasından kaynaklanan güçlü elektrostatik etkileşimi ve ana oluktan yığılmış doğal DNA çiftleri arasındaki interkalatif etkileşimi içeren üç modda gerçekleşir. (Tremi ve ark., 2021).

Bu kapsamda, pestisitlerin DNA ile etkileşip etkileşmediği ve bu etkileşimlerin türünün belirlenmesine yönelik analitik metotlar ciddi anlamda önem kazanmaktadır. DNA-madde etkileşimlerini ortaya çıkarmak için genelde elektrokimyasal ve spektroskopik yöntemler kullanılmakta, bunun yanı sıra kromatografik yöntemler doğal özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle, DNA ve küçük moleküller arasındaki etkileşimin karakterizasyonu ve tanımlanmasından önemli rol oynamaya başlamıştır (Dindar ve ark., 2021 ve Moldoveanu ve ark., 2021).

Tezin ikinci bölümünde ise insan sağlığına doğrudan etkileri bulunan THR, EPO, HEX, TEB ve DİE'nin DNA ile etkileşimlerinin kromatografik olarak incelenmesi ve DNA hasarı araştırılmıştır. Sonuç olarak, tez kapsamında seçilen pestisitlerin DNA ile afinitesi ve etkileşim mekanizmasının araştırılması, bu pestisitlerin organizmalar üzerindeki biyolojik etkilerinin öngörülmesi için bazı yararlı bilgiler sağlayacaktır.

1.3. Pestisitler ile Yapılmış Çalışmalar

Wang ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada hızlı ayırım ve analitlerin tespiti, gıda güvenliği ve çevre bilimi de dahil olmak üzere potansiyel uygulamalar için bir araştırma yapmışlar. Burada, çoklu analitlerin hızlı ayrılması ve analizi için YPSK ve yüzey arttırılmış Raman spektroskopisi (SERS) kombinasyonuna dayanan bir deney gerçekleştirmişler. Sonuç olarak THR için TS (teşhis sınırı) 10^{-7} mol/L'e kadar olabildiği bulunmuştur. Analiz sonucunda YPSK-SERS sisteminin modern analitik bilim ve teknolojide iyi bir teknik olduğu kanısına varılmıştır (Wang ve ark., 2015).

Jiaji ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, eser düzeydeki THR'ın belirlenmesi için kağıt tabanlı bir mikroakışkan yüzey destekli SERS cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen nanopartiküller, kağıt bazlı mikroakışkanların numune ekleme bölgelerinden birine, diğerine ise THR solüsyonu damlatılmıştır. Çözeltiler, kılcal etki ile kendi kanallarından aktı ve reaksiyon ortamında birbirine karışmıştır. THR'ın TS 10^{-9} mol/L kadar düşük olduğu görülmüş ve (bağıl standart sapma) BSS sonuçlarının tümü %10'un altında olduğu görülmüştür. Karıştırılmış çay örneklerinde THR'ın geri kazanım değerleri %95 ila %110 arasında olduğu bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, önerilen bu yöntemin eser düzeyde THR analizi için iyi bir yöntem olduğunu göstermiştir (Jiaji ve ark., 2017).

Abid ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada sütteki THR ve disiyandiamidin (DCD) eşzamanlı ve hızlı tespiti için bimetalik çekirdek kabuklu nanoparçacıklara dayalı SERS kullanılmıştır. THR için 0,21 µg/mL TS ve R^2 0,9896, DCD için TS 14,88 µg/mL ve R^2 0,9956 değerleri bulunmuştur. Önerilen yöntem 34 dakika içinde sonuçlara ulaşabilir ve bu çevre dostu yöntem, sütteki diğer tesadüfi kirleticilerin eşzamanlı ve hızlı taranması için ayrıca kullanılabilir olduğu bulunmuştur (Abid ve ark., 2020).

Filipe O.M.S. ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada Cu (II) 'nin, sulu çözeltilerde THR'nin bozulması üzerindeki etkisini incelemişler, Cu (II) 'nin THR'nin bozunması üzerindeki etkisini sıvı kromatografisi-kütle/kütle spektrometresi (SK-KS/KS) yöntemini kullanarak ortaya çıkarmışlar (Filipe ve ark., 2014).

Pan L. ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada Çin'deki tipik bir tarım arazisinden farklı toprak örnekleri toplanmış, pestisitlerin ve antibiyotiklerin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Öncelikle 47 pestisit ekstrakte edilmiş ve SK-KS/KS ile analiz edilmiştir. Toprak açısından atrazin, klorpirifos, TEB, DİE, pmetrozin ve tiametoksandan dolayı ekolojik risk görülmüştür, çünkü örnek derişimlerinin %1'den fazlası 0,1 mg/kg'ı aşmıştır. Bu veriler, bu pestisitlerin ve

antibiyotiklerin belirlenmesinde yardımcı olmuş ve toprak kalitesi değerlendirmesi ve risk değerlendirmesi için değerli bilgiler sağlamıştır (Pan ve ark., 2019).

Zixi ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı bir çalışmada mantar ilaçları EPO ve piraclostrobin, buğday fusarium baş yanıklığını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, farklı iklim bölgelerinde dağılma davranışlarını araştırmak ve iki fungusitin maksimum kalıntı limitlerinin modifikasyonu için veri sağlamak için tasarlanmıştır. Çin'deki on iki farklı bölgede tarla alanlarından buğday örnekleri toplanmış ve buğdayda EPO ve piraclostrobin eş zamanlı tespiti için bir SK-KS/KS yöntemiyle analiz edilmiştir. Buğday matrisindeki ortalama EPO ve piraclostrobinin geri kazanımları sırasıyla %87-112 ve %85-102, göreceli standart sapmalar $\leq$ %8,1 olarak bulunmuştur. Tahıl ve samanda EPO ve piraclostrobin miktar tayini limitlerinin her ikisi de 0,01 mg/kg olarak bulunmuştur (Zixi ve ark., 2021).

Guang ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı bir çalışma tarımsal ürün matrislerinde düşük seviyelerde triazol fungusitlerinin tespiti son derece önemini göstermiştir. Bu çalışmada SK-KS/KS kullanılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında, analiz yöntemi, meyve ve sebze örneklerinde triazol mantar öldürücüler için 0,52–1,83 µg/L TS ve geniş doğrusal aralık 5–500 µg/L olduğu görülmüştür. Lahana, ıspanak, portakal suyu ve elma suyunda mantar öldürücüler (10, 50 ve 100 µg/L) için yöntem geri kazanımı %62,8 ile %94,2 arasında değiştiği görülmüştür. Oluşturulan analiz yöntemi, daha önce bildirilen yöntemlerden daha düşük bir TS değerine sahiptir ve karmaşık matrislerdeki triazol pestisit kalıntıları için daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur (Guang ve ark., 2021).

Qiu J. ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada 9 triazol fungusitin enantiyomerlerini karşılaştırmalı olarak ayırmak için YPSK kullanılmış ve bu yöntem ile HEX, tetrakonazol, myclobutanil, fenbuconazol, flutriafol, penkonazol, EPO, penkonazol iyantiyomerleri, triadimefon pestisitlerinin ayırımı başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışma iyi enantiyomerik ayırma elde etmek ve triazol fungusitleri için daha verimli analitik bir yöntem oluşturmak için çok yararlı olacağının kanısına varılmıştır (Qiu ve ark., 2011).

Sun M. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada, salatalık ve armut numunelerindeki bazı karbamatlar (metolcarb, karbaril, pirimikarb ve DİE), UV analiz ile YPSK ile analiz edilmiştir. Optimum koşullar altında, metolcarb, karbaril ve DİE için 0,5-100 ng/g derişim aralığında ve 0,9956 ila 0,9984 arasındaki korelasyon katsayıları ile pirimikarb için 1-100 ng/g derişim aralığında lineer bir yanıt elde edilmiştir. Yöntemin tayin alt sınırı (TAS)'ının 0,08 ile 0,2 ng/g arasında olduğu bulunmuştur. BSS ise % 2,4 ile % 5,8 arasında bulunmuştur (Sun ve ark., 2013).

Ditiyokarbamatlar mantar öldürücüler (DTC'ler) dünya çapında yaygın olarak kullanılan mantar öldürücülerdir. Zhou L. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, DTC kalıntıları bir C18 kolonunda elüt edilmiş ve YPSK tarafından 272 nm'de tespit edilmiştir. THR, mancozeb ve propineb'nin S-alkil türevleri farklı alıkonma sürelerinde ayrılmıştır. BSS % 0,6-13,7 olarak bulunmuş. TAS ve TS çeşitli yiyecek ve topraklar için 0,003-0,026 mg/kg ve 0,011-0,105 mg/kg arasında değiştiği görülmüştür. Bu yöntem aynı zamanda gerçek örneklerle de uygulanmıştır (Zhou ve ark., 2013).

Songqing ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada, ilk kez bir manyetik grafen oksit-ultra ince metal-organik kompoziti sentezlenmiş ve özütleyici olarak kullanılarak, YPSK yardımıyla pestisit EPO'ün ayrılması ve analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Adsorpsiyon mekanizmaları, adsorpsiyon kinetiği, termodinamik parametreler ve adsorpsiyon izotermi dahil olmak üzere incelenmiştir. TS değeri 0,001 µg/g, TAS değeri 0,004 µg/g ve BSS %3,6 olarak bulunmuştur. Deneysel sonuçlar, bu yöntemin gerçek numunelerde EPO'ün ekstraksiyonu ve tayini için uygun, uygulanabilir, etkili ve pratik olduğunu göstermiştir (Songqing ve ark., 2020).

Phuoc ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı bir çalışmada TEB için düşük maliyetle hızlı analizi için basit, hassas bir yöntem ile analiz yapılmıştır. Analiz tekniği, bir optik biyosensörün biyoreseptörü olarak pestisit spesifik bir DNA aptamerinden yararlanılmıştır. Geliştirilen yöntem pestisiti sensör yüzeyinde

yakalamaya çalışmak yerine, nanopartikülün yüzeyinde adsorbe edilen DNA aptamerlerinin pestisit ile etkileşime girdiğinde nanopartiküllerden ayrılmasını sağlamıştır. Pestisit tespiti için model analit olarak TEB ile tasarlanan aptasensör, 10 nM'lik bir TS ve 20 dakikalık cevap süresi ile yüksek bir hassasiyet ve seçicilik gösterdiği bulunmuştur. Çivili pirinç numunelerinde TEB tespiti durumunda, ortalama geri kazanımlar %89,9-110,86 aralığında ve %3,11-4,32'lik nispi standart sapmalar olmuştur. Bulunan bu sonuçlar, gerçek örneklerde pestisitlerin hızlı tespiti için kullanılabileceği görülmüştür (Phuoc ve ark., 2021).

Zhihaolin ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada ise çay içeceklerinde ve meyve sularında miklobutanil, flusilazol, HEX, penkonazol, EPO, paclobutrazol ve dinikonazolü YPSK ile tespit etmek için yeni, çevre dostu ve verimli bir şekilde ayrıştırılmış nanoakışkan dağıtıcı sıvı fazlı mikroekstraksiyon yaklaşımı geliştirilmiştir. Yeni yaklaşım, doğrusal aralık (10-10000 µg/L), bağıl geri kazanım (%70,03-107,14), TS (3,34-8,30 µg/L), TAS (10-25 µg/L), günler arası ve gün içi BSS (< %11,30 ve <%13,01) ile iyi performans gösterdiği bulunmuştur. Bu çevresel yaklaşım, gerçek çay içecekleri ve meyve sularında kalan triazol fungusitlerine uygulanabilir olduğu görülmüştür. (Zhihaolin ve ark., 2022).

TEB, Avrupa Birliği düzeyinde hububat ve asmalarda yaygın olarak kullanılan bir triazol mantar ilacıdır. Najoi ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada toprakta TEB 'ün yayılımı değerlendirilmiştir, gelişmiş analitik yöntem ve karbon-14 etiketli TEB kullanarak dönüşüm yolunu belirlenmiş ve toprak mikrobiyal toksisitesi değerlendirilmiştir. Karbon-14 -triazol-halka-etiketli TEB'ün mineralizasyonu ihmal edilebilir düzeyde olduğu bulunmuş, ancak karbon-14-penil-halka-etiketli TEB'ün %11'e kadarı inkübasyonun 150 günü içinde 14 CO₂ olarak gelişmiştir. TEB kalıcılığı, standart inkübasyon koşullarına kıyasla daha yüksek doz oranlarında ve kış simülasyonu koşullarında artmıştır. Hedef dışı şüpheli taraması, 17'si bilinmeyen 22 TEB dönüşüm ürünlerinin tespit edilmesini sağlamıştır. Topraktaki oluşumu ve çürümesi GK ve kütle spektrometresi ile belirlenen yeni bir TEB dönüşüm ürünü olan 1-(4-klorofenil) etanonun tanımlanmasına yol açmıştır. TEB ve dönüşüm ürünlerinin ekotoksikolojik etkisi, toplam bakteri bolluğu değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, etkinin yönü (olumlu veya olumsuz) değişmiştir ve bazı durumlarda kuluçka koşullarına göre değişkenlik gösterdiği bulunmuştur (Najoi ve ark., 2018).

Pankaj ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada toprak ve domateste TEB ve HEX'ün kalıcılığı üzerindeki etkisini belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Doğrusallık aralığı GK/elektron yakalama dedektörü ve GK/kütle spektrometrisi yöntemi kullanılarak, HEX 0,05-1 mg/kg ve TEB için 0,25-5 mg/kg olduğu bulunmuştur. Toprak ve domates meyveleri için ekstraksiyon prosedürü, HEX ve TEB'ün killi toprakta ve domates meyvelerinde geri kazanımı ve %BSS'nin sırasıyla %74,88 -112,98 ve %1,56-16 aralığında olduğundan doğru ve kesin olduğu görülmüştür. Analitik yöntemin TAS VE TS'nin, analiz edilen tüm matrisler için 0,1 mg/kg'dan az olduğu bulunmuştur. HEX'ün kalıcılığı, en yüksek 77 gün ile toprakta, ardından biyokompostta 68 gün olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, TEB'ün kalıcılığı biyokompostta 69 gün ve toprakta 66 gün olarak bulunmuştur. Toprakta ve domateste HEX ve TEB'ün terminal kalıntıları ilişkilendirildi, ancak toprakta HEX kalıntıları, domateste terminal kalıntılara göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (Pankaj ve ark., 2019).

Ashok ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada $\lambda = 254$ nm'de doğrudan UV absorbans ölçümü yapılarak borik asit tamponunda THR'ın ayrılması ve belirlenmesi için basit ve hassas kapiler elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. THR için TS 0,5 µg/ml olarak bulunmuştur. Yöntem, THR eklenmiş buğday numunelerinin analizine başarıyla uygulanmıştır (Ashok ve ark., 2008).

Peipei ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada sebze ve meyve numunelerinde TEB'ün seçici tespiti için bir prob ile sabitleştirilmiş moleküler baskılı elektrokimyasal sensör yapılmıştır. Tiol grafen, spesifik yüzey alanını arttırmak için altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş camsı karbon elektrot üzerine yerleştirilmiştir. Prusya mavisi, modifiye elektrot üzerine altın nanopartiküller ile birlikte biriktirilmiş ve sabitleştirilmiş prob olarak görev yapmıştır, ardından tanıma elemanı olarak moleküler baskılı polimer filmin elektro-polimerizasyonu gerçekleştirilmiş. Bu arada, modifiye elektrotun yüzey özellikleri, taramalı elektron

mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu, döngüsel voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Optimize edilmiş sensör, $1,25 \times 10^{-8}$ mol/L TS ile 5×10^{-8} mol/L ila 4×10^{-4} mol/L arasında geniş bir lineer aralık gösterdiği bulunmuştur. Önerilen sensör, seçicilik deneylerinde TEB'in özel olarak tanınmasına olanak sağladığı görülmüştür. Ayrıca sensörün, yüksek geri kazanımlarla gerçek numunelerde TEB tespiti için kullanılabilir olduğu görülmüştür (Peipei ve ark., 2018).

Wang ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmada, grafen/Fe₃O₄ ile hazırlanmış ve tarımda yaygın olarak kullanılan on triazol fungusitlerinin, (TEB, HEX, flutriafol, triadimenol, triazonon, EPO, penkonazol, miklobutanil, paclobutrazol ve metkonazolün) sulu ortamda uzaklaştırılması için bir adsorban olarak kullanılmıştır. On fungusit (20 µg/mL) için uzaklaştırma verimliliği, 50 mL su çözeltisine 20 mg grafen/Fe₃O₄ eklendiğinde %85,2 ile %96 arasında değişmiştir. Temas süresi, adsorban miktarı, çözelti pH'ı ve iyonik güç gibi adsorpsiyon kapasitesini etkileyebilecek faktörler araştırılmıştır. Adsorpsiyon kinetiği ve termodinamik üzerine yapılan çalışma, örnek olarak TEB alınarak yapılmıştır. Termodinamik veriler, adsorpsiyonun doğada kendiliğinden bir fiziksel adsorpsiyon süreci olduğunu ortaya çıkardığı görülmüştür (Wang ve ark., 2018).

Demircioğlu ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada, su ve toprakta bulunan patlayıcı kalıntılarından kaynaklanan kirlilikle mücadele etmek için, su ve toprakta bulunan eser miktarda patlayıcı tespiti için analitik teknikler seçici ve hasas bir şekilde geliştirilmiştir. Bu bağlamda, nitro patlayıcılar olarak TNT ve tetrilin belirlenmesi için altın nanopartiküller bazlı bir kolorimetrik prob geliştirilmiştir. Au-nanopartiküller sentezlenmiş ve yüzeyleri, THR ile modifiye edildi. Hazırlanan prob, THR'ın amin grubu ile patlayıcıların nitro grupları (TNT ve tetril) arasındaki donör-alıcı etkileşiminin bir sonucu olarak hızla toplandığı görülmüştür. TNT ve tetril için TS VE TAS sırasıyla 5 ve 15 µg L⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntem, TNT ve tetril ile kirlenmiş kumlu toprak örneklerine uygulanan referans SK-KS/KS yöntemine göre doğrulanmıştır (Demircioğlu ve ark., 2022).

Tássia ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada ise TEB bazlı ticari ürünün farklı konsantrasyonlarının zebra balığının yetişkinleri üzerindeki etkileri, yeni tank dalış testi ve mikronükleus ve kuyruklu yıldız testleri ile değerlendirilmiştir. Toplam 320 yetişkin zebra balığı sekiz tanka bölünmüştür. 100, 200 ve 300 µg/L konsantrasyona maruz bırakılmıştır, TEB bazlı ticari ürün, 24, 72 ve 96 saatte ilgili replikatları ile maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, zebra balığının davranışsal bir sapmasını ve maruz kalma süresinin ve negatif kontrole göre ticari ürünün farklı konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak DNA hasarında önemli bir ($p<0.05$) artış gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, tebukonazolün zebra balığının yetişkinleri üzerinde, genotoksisite ve mutajeniteyi indüklediği ve ayrıca yetişkinlerin davranışındaki değişikliklerle ilgili nörolojik fonksiyonları değiştirdiği sonucuna varılmıştır (Tássia ve ark., 2018).

THR, ekinleri ve tohumları korumak için yaygın olarak mantar ilacı olarak kullanılan bir ditiyokarbamat pestisittir. Özellikle Çin ve Hindistan'da yaygın olarak kullanılır. THR insanlar için nispeten güvenli kabul edilse de, kalıcı doğa uzun süreli maruz kalma durumunda insanlar ve hayvanlar için bir sağlık tehlikesi haline gelebilmektedir. Samreen ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı çalışmanın amacı, THR'ın oral yoldan 4 farklı dozajda (100, 250, 500, 750 mg/kg vücut ağırlığı) verilen erkek sıçanların böbreği ardışık günlerde incelenmiştir. Sonuç olarak, hücresel glutasyonu ve toplam sülfhidril içeriğini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Ancak protein karbonil ve hidrojen peroksit seviyelerini arttırmıştır. Ayrıca nefrotoksisiteyi gösteren plazma kreatinin ve üre seviyeleri yükseldiği görülmüştür. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri katalaz, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz ve glutasyon-S-transferaz anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. THR uygulaması ayrıca bağırsak duvarının inhibisyonuna yol açtığı görülmüştür. Glikoz metabolizması enzimlerinin aktiviteleri, sitrik asit döngüsü, pentoz fosfat yolu ve glukoneogenez de engellenmiştir. THR ile tedavi edilen sıçanlarda DNA zincir kırılmaları, parçalanma ve DNA-protein çapraz bağlanması da gözlenmiştir (Samreen ve ark., 2021).

Gregorio ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, polikontamine sulu çözeltilerden fungusitlerin uzaklaştırılması için adsorpsiyon odaklı bir işlem uygulanmıştır. Propiconazole, TEB, EPO, bromuconazole ve difenoconazole sulu karışımlarından triazol fungusitlerini ayırmak amaçlanmıştır. Beklendiği gibi, aktif karbonlar en yüksek triazol mantar ilacı giderme seviyelerini sergilediği görülmüştür. 1 g adsorban, her biri 1 mg beş triazol (toplamda 5 mg) içeren 1 L solüsyona yerleştirilmiş ve fungusit miktarının yarısından fazlasını (2,97 mg) çıkarabildiği görülmüştür. Bu, incelenen karışımda, bağlanma bölgeleri için fungusitler arasında güçlü bir rekabetin hüküm sürdüğü bulunmuştur (Gregorio ve ark., 2017).

Fang ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı bir çalışmada mikroplastik kirliliğinin analizine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, polietilen (PE) mikroplastiklerin sekiz pestisit (EPO, TEB, miklobutanil, azoksistrobin, simazin, terbutilazin, atrazin ve metolaklor) su ortamında kalıntı, bozunma ve dağılım davranışları üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, 2–50 g/L mikroplastik varlığının sudaki pestisit kalıntılarını azaltabileceğini göstermiştir. Desorpsiyon kinetiği verileri, desorpsiyon işleminin, çoğu durumda R^2 'nin 0,99'un üzerinde olduğu bulunmuştur. PE mikroplastiklerin varlığı, özellikle orta düzeyde bozunma yarı ömürleri ve yüksek TAS değerleri olanlar için, sudaki pestisitlerin bozunma yarı ömürlerini önemli ölçüde uzatabildiği bulunmuştur. Ayrıca, PE mikroplastiklerin su tortusu sistemindeki pestisitlerin davranışı üzerinde çok az etkisi olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları, PE'nin pestisitleri bölme yoluyla adsorbe edebileceğini ve böylece pestisitlerin sudaki kalıcılığını etkileyebileceğini göstermiştir (Fang ve ark., 2020).

Konazol grubu antifungal pestisitler günümüzde kayda değer kronik toksisite ve ekotoksisiteye sahip pestisitlerdendir. Kısa veya uzun vadeli kalıntılar oluşturarak toprağa girerler. Nikola ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada EPO ve TEB, Çek Cumhuriyeti'nden temin edilen 20 toprak numunesi ile test edilmiştir. Değişkenlerin çok değişkenli analizini yaptıktan sonra, her iki pestisit adsorpsiyonunun pH ile yüksek oranda ilişkili olduğu ve toprak organo-mineral kompleksi ve toprak organik maddesindeki karbon ve azot ile daha az ilişkili olduğu

görülmüştür. EPO adsorpsiyonu ve toprak organik madde parametreleri arasında bazı korelasyonlar ortaya çıktığı görülmüştür. Birkaç toprak mineralinden kaolinit, EPO ve TEB adsorpsiyonu gösterdiği görülmüştür. EPO adsorpsiyonu, TEB'e kıyasla pH değişikliklerinden çok fazla etkilenmediği görülmüştür. Moleküler geometriye sahip hidrojen bağlarının sayısı ve türleri, toprakta kalıntı bırakmalarını önemli ölçüde etkileyebilecek olan sorpsiyonu yönetir ve bu, aynı toprak için TEB'in EPO'dan daha fazla kalıntı bıraktığı bulunmuştur (Nikola ve ark., 2020).

Bu tez kapsamında tarımda mantarlara karşı kullanılan pestisitlerden THR, EPO, HEX, TEB ve DİE'in ilk kez eş zamanlı bir şekilde güvenilir, kolay, hızlı ve hassas analizi için TFSK yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin de validasyonu amaçlanmıştır ve ayrıca bu beş pestistin DNA ile etkileşimlerinin kromatografik olarak incelenmesi ve DNA hasarlarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez kapsamında analizleri gerçekleştirilen pestisitler ile ilgili genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Peptisitler

2.1.1. Tiram

Tiram (Şekil 2.1.A) en basit tiyuram disülfür ve oksidize dimetilditiokarbamat dimerdir. Tohum ve ekinlerde mantar hastalıklarını önlemek için mantar ilacı, ektoparazit öldürücü olarak ve meyve ağaçlarını ve süs bitkilerini tavşanların, kemirgenlerin ve geyiklerin zarar görmemesi için bir hayvan kovucu olarak kullanılır. Bu pestisit, yaprak delen ve monilya hastalıklarında şeftali için, kara leke hastalığında armut ve elmalarda, cep hastalığında erik için ve kök boğazı yanıklığında şekerpancarı için kullanılmaktadır.

Kimyasal Formül: $C_6H_{12}N_2S_4$

Molar kütle: 240,44 g/mol

2.1.2. Epoksikonazol

Epoksikonazol (Şekil 2.1.B), mahsulleri korumak için geliştirilen azol sınıfından bir fungusit aktif maddesidir. Özellikle, bu madde yararlı bitkileri istila eden mantar hücrelerinin metabolizmasını inhibe eder ve böylece miyelinin büyümesini önler. Epoxiconazole ayrıca conidia üretimini sınırlar.

Kimyasal Formül: $C_{17}H_{13}ClFN_3O$

Molar kütle: 329,76 g/mol

Yoğunluk: 1,37 g/cm³

Erime noktası: 134 °C

2.1.3. Hekzakonazol

Hekzakonazol (Şekil 2.1.C), özellikle *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* olmak üzere birçok mantarın kontrolünde kullanılan geniş spektrumlu bir sistemik triazol fungusittir. Bu etken madde ile geliştirilen formüllerle, kayısıda monilya hastalığı, elmada kara leke ve bağ, gül ve kabakgillerde külleme hastalığı ile mücadelede kullanım alanı bulur.

Kimyasal formül: $C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$

Erime noktası: 111°C (232°F; 384 K)

2.1.4. Tebukonazol

Tebukonazol (Şekil 2.1.D), bitki patojenik mantarlarını tedavi etmek için tarımsal olarak kullanılan bir triazol fungusittir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi bu fungusitin insanlar için güvenli olduğunu düşünüyor olsa da, yine de bir risk oluşturabilir. Bu pestisit, erken yaprak yanığı hastalığında domatesler için, külleme hastalığında elmalar için, monilya hastalığında kayısılar için, sarı pas hastalığında hububatlar için ve kara leke hastalığında armutlar için kullanılmaktadır.

Kimyasal Formül: $C_{16}H_{22}ClN_3O$

Molar kütle: 307,82 g/mol

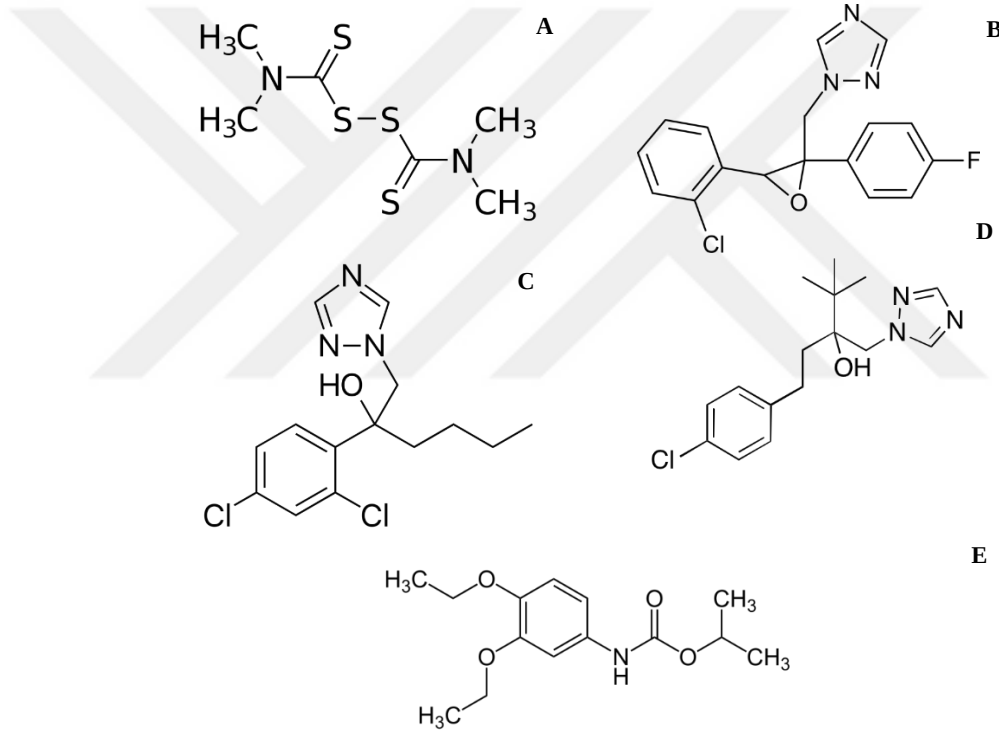
Yoğunluk: 1,25 g/cm³

2.1.5. Dietofenkarb

Dietofenkarb (Şekil 2.1.E), (3,4-dietoksifenil) karbamik asidin izopropil esteri olan bir karbamat esteridir. Botrytis cinerea ve benzimidazole dirençli hastalık türlerine karşı güçlü etkinliği olan bir mantar ilacıdır. Bir karbamat esteri, bir aromatik eter ve bir karbanilat fungusitidir. Bir anilinden türetilir.

Kimyasal Formül: $C_{14}H_{21}NO_4$

Molar kütle: 267,32 g/mol



Şekil 2.1. Tez kapsamında çalışılan pestisitlerin kimyasal yapıları A) THR, B) EPO, C) HEX, D) TEB ve E) DİE.

Tez kapsamında kullanmış olduğumuz cihazlar ve malzemeler aşağıda sunulmuştur.

- YPSK: Agilent 1100 (Santa - Clara, CA, A.B.D.)
- Agilent UV cihazı (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, A.B.D.)
- Hassas terazi (Shimadzu Libror AEG-220)

- Vorteks (İsolab laborgerate GmbH, 622.01.001)
- Ultrasonik su banyosu (Nüve, Türkiye), (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
- pH metre (Model 526) (WTW pH 330i, Avusturya)
- Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen[®], Interlab, Türkiye)
- Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
- Santrifüj (Thermo-Scientific, A.B.D.), (Hettich Rotina 90, Almanya)
- Hassas terazi (AS 220.R2 Polonya)
- Karbondioksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
- Sterilizatör (Sanyo MAC-235EX, Japonya)
- Derin Dondurucu (-20°C) ve (-80°C), (Scancool, Almanya)
- Fluoresan Mikroskop (Leica, Almanya, komet testi yazılım programı-Comet Assay IV)
- İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
- Hücre sayım cihazı (Bio - Rad TC20, Singapur)
- Farklı hacimlerde deney tüpleri, balon jojeler ve sarf malzemeleri

Tez kapsamında kullanmış olduğumuz sabit fazlar ve özellikleri Çizelge 2.1.'de ve tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Çalışmalar kapsamında kullandığımız kolonlar ve özellikleri.

Kolon İsmi	Uzunluk (mm)	İç Çap Boyutu (mm)	Partikül Çap Boyutu (µm)	Kimyasal Yapı	Firma
Luna C18	150	4.6	5	Saf silika	Phenomenex (Torrance, A.B.D.)
Thermo Hypersil C18	250	4.6	5	Saf silika	Waters (LiKrom, Türkiye)
Phenyl 112	250	4.6	5	Saf silika	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Inertsil C8	150	4.6	3.5	Saf silika	GL Sciences (Tokyo, Japonya)

Çizelge 2.2. Çalışmalarda kullandığımız kimyasal maddeler.

Kimyasal Maddeler	Firma
Asetonitril	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Metanol	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Amonyum Asetat	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Amonyum Format	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Sodyum Asetat	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Hidroklorik Asit	Merck-Millipore (Darmstadt, Almanya)
Sodyum Hidroksit	Merck-Millipore (Darmstadt, Almanya)
Hidrojen Peroksit	Merck-Millipore (Darmstadt, Almanya)
Dimetil sülfoksit	Merck-Millipore (Darmstadt, Almanya)
DNA (Buzağı timus bezinden)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)
Serum	Sigma-Aldrich (St.Louis, MA, A.B.D.)

2.2. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın eş zamanlı miktar tayini için geliştirilen YPSK yönteminde;

2.2.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez çalışmalarında kullanmış olduğumuz THR, EPO, HEX, TEB ve DİE eş zamanlı olarak eşit derişimlerde hazırlanmış ve hassas terazi yardımıyla 5 pestisit derişimi asetonitril ile çözölme işlemleri yapılarak 1000 µg/mL olarak hazırlanmıştır. 5 pestisit için 5 ayrı balon jojelere eşit miktarda olacak şekilde çözölücü ekleyip, çözölme işlemini tamamlamak için 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilme işlemleri

yapılmıştır. Daha sonrasında hacimleri tamamlanan çözeltiler vorteks yardımıyla tamamen karıştırma işlemi yapıldıktan sonra kalibrasyon numuneleri için gerekli olan seyreltme işlemi yapılmıştır ve enjeksiyon hacmi 10 µL'ye ayarlanarak YPSK sistemine verilmiştir.

2.2.2. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

İçilebilir su, atık su, çeşme suyu, elma, idrar, ticari olarak satılan serum ve tarım ilacı örneklerindeki katkı maddelerinin veya farklı maddelerin, pestisitlerin analiz işleminde herhangi bir girişimin etkili olup olmadığını tespit etmek için geri kazanım çalışmaları uygulanmıştır. Bu araştırmalar için insan idrarı, Ankara il sınırları içerisinde toplanmış olan toprak, çeşme suyu, atık su ve içme suyu numuneleri, marketlerden alınan elmalar, %2 TEB içeren SWARM 2 DS kuru tohum ilacı ve %80 THR içeren massTHİRAM ıslanabilir toz zirai ilaçları kullanılmıştır. Zirai ilaç numuneleri için standart ekleme yöntemiyle saf madde ilave edilmiştir, diğer örnekler için ise kör matriks ortamına analiz yapılacak maddelerin ilavesiyle gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Toprak Numunelerin Hazırlanması

10 mL 'lik ağzı kapaklı olan dört tane santrifüj tüplerine ince toz şekline getirilmiş 2 g toprak numuneleri koyulmuştur. Numunelerin üstüne, THR, EPO, HEX, TEB ve DİE'nin 1000 µg/mL'lik stok çözeltisinden toplamda hacimleri 150, 100, 50 ve 25 µg/mL'lik olmak üzere THR, EPO, HEX, TEB ve DİE ilave edilmiştir ve üzerine asetonitril ile hacimleri tamamlama işlemi yapılmıştır. Numuneler 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde karıştırıldıktan sonra 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj tamamlandıktan sonra üstte kalmış olan berrak çözelti tekrardan 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Berrak çözelti şırınga ucu filtre yardımıyla süzülme işlemi yapılmıştır ve sonrasında sisteme enjekte edilmiştir.

2.2.4. Elma Numunelerin Hazırlanması

10 mL 'lık ağzı kapaklı olan dört tane santrifüj tüplerine kabuklarıyla rendelenip sıvı hale getirilmiş olan elma örneklerinden 3,2 mL elma suyu koyulmuştur. Elma suyunun üstüne, THR, EPO, HEX, TEB ve DİE'nin 1000 µg/mL'lik stok çözeltisinden toplamda hacimleri 150, 100, 50 ve 25 µg/mL'lik olmak üzere THR, EPO, HEX, TEB ve DİE ilave edilmiştir ve üzerine asetonitril ile hacimleri tamamlama işlemi yapılmıştır. Elma suyunun çözeltiyle tamamen karışmasını ve etkileşime girmesine ortam yaratmak için 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırma işlemi yapılmıştır ve sonrasında 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Berrak çözelti şırınga ucu filtre yardımıyla süzülme işlemi yapılmıştır ve sonrasında sisteme enjekte edilmiştir.

2.2.5. İdrar Numunelerin Hazırlanması

10 mL 'lık ağzı kapaklı olan dört tane santrifüj tüplerine 3,2 mL insan idrarı koyulmuştur. İnsan idrarı üstüne, THR, EPO, HEX, TEB ve DİE'nin 1000 µg/mL'lik stok çözeltisinden toplamda hacimleri 150, 100, 50 ve 25 µg/mL'lik olmak üzere THR, EPO, HEX, TEB ve DİE ilave edilmiştir sonrasında üzerine asetonitril ilavesiyle idrar proteinlerinin çöktürme işlemi yapılmıştır. İdrar örneklerinin çözelti ile tamamen karışmasını ve etkileşime girmesine ortam yaratmak için 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırma işlemi yapılmıştır ve sonrasında 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Berrak çözelti şırınga ucu filtre yardımıyla süzülme işlemi yapılmıştır ve sonrasında sisteme enjekte edilmiştir.

Serum, çeşme suyu, kuyu suyu ve atık su numuneleri de idrar örneklerinde kullanılan aynı prosedür ile hazırlanmıştır.

2.3. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın DNA ile etkileşiminin incelenmesi için geliştirilen YPSK yönteminde;

İlk olarak hassas terazide 10 mg DNA tartılıp balon jojeye aktarılmıştır ve daha sonra 10 mL'ye saf su ile tamamlama yapılmıştır. Vorteks karıştırıcı ile homojen bir karışım haline getirilen çözelti bir gece +4°C'de bekletilmiştir. DNA'nın 260 nm'de absorbansı ölçülerek derişimi hesaplanmıştır.

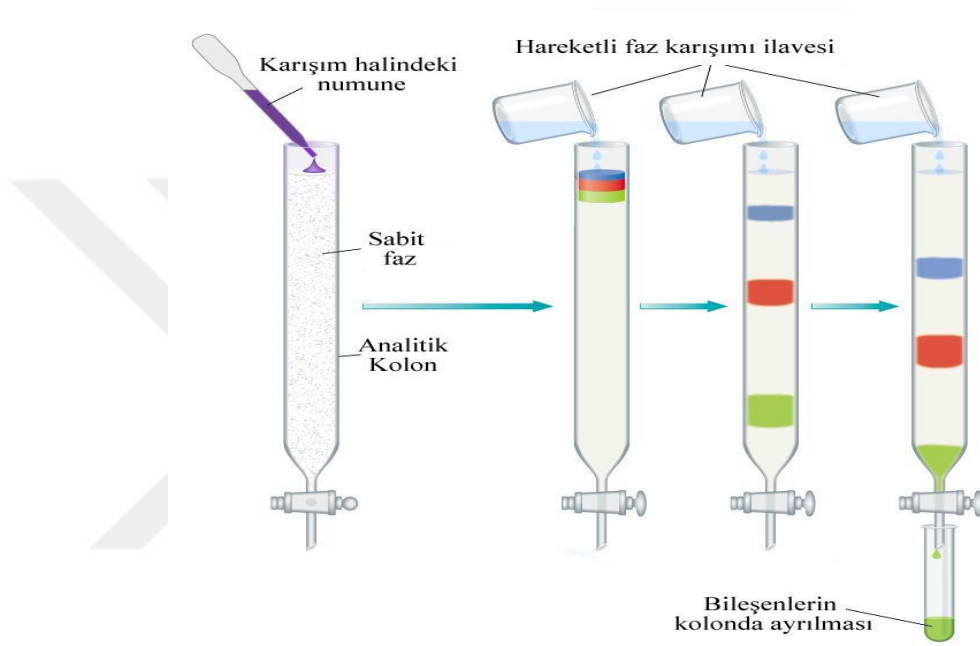
DNA-pestisit etkileşimlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik titrasyon yöntemleri baz alınarak benzer prosedür uygulanmıştır. Sabit derişimdeki pestisit çözeltilerinin üzerine artan derişimlerde DNA çözeltisi eklenmiştir ve bunlar YPSK sistemine enjekte edilmiştir. Her deney 5 defa tekrarlanmıştır. Pestisitlerin kromatogramlarının alan değerlerindeki değişmeler incelenmiştir. Bu alan değişimlerinden yola çıkarak, $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ elde edilen değerler grafiğe geçirilmiş ve Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak bağlanma sabitlerinin hesaplanması yapılmıştır (A_0 =Maddenin pik alanı, A = DNA-madde kompleksinin pik alanı)

2.4. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın eş zamanlı miktar tayini ve pestisit-DNA etkileşmesinin incelenmesi için kullanılan YPSK yöntemi;

2.4.1. Kromatografi

Kromatografi, karışımda bulunan her bir maddenin, hareketli ve sabit fazdan oluşan ve birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistem içerisinde ayrılması, saflaştırılması, teşhis ve tayin çalışmalarına verilmekte olan bir isimdir (Masoodi ve ark., 2021).

Rus botanikçi bilim adamı olan Mikhail Tswett, kromatografi yöntemini ilk bulan isimdir (Şekil 2.2.). Rus bilim adamı bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırma amacıyla kullanmış ve kolonda renkli bant oluşumlarını görmüştür. Oluşan renkli bantlardan esinlenerek renk anlamında olan ‘chroma’ ve yazma anlamında olan ‘graphein’ kelimelerini kullanarak kromatografi ismini vermiştir (High ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Kromatografik ayırmanın şematik gösterimi (Sagar 2022).

Bugün birbirinden farklı birçok kromatografik tekniği olmasına rağmen gün geçtikçe yeni kromatografik tekniklerin sayısının arttığı görülmektedir. Bundan dolayı tek tip sınıflandırma yöntemiyle kromatografik yöntemleri sınıflandırmak yetersizdir. Birçok kromatografi kitaplarında ya da çalışmalarda kromatografik yöntemler farklı şekilde sınıflandırılır. Sınıflandırma yöntemlerinde farklı kriterler temel alınmıştır ve bu kriterler aşağıda gösterilmiştir(Bajkacz ve ark., 2020 ve Sadiq ve ark., 2020).

- İki fazın fiziksel hali
- Kromatografik ayırım yönteminin mekanizması
- İki fazın polaritesi

- Numunenin kromatografik ortama verilme şekli
- Kromatografik ortamın fiziksel hali

2.4.2. Dağılma Kromatografisi

Hareketli fazın sıvı, sabit fazın katı yüzeydeki kolon dolgu maddelerinin üzerlerine tutturulmuş şekilde ince sıvı film tabakasını içeren kromatografi türüne dağılma kromatografisi denir. Maddelerin ayrımındaki ana temel esas, maddelerin birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz arasında dağılmasına dayanmaktadır. Karışım içersinde olan maddelerin sabit fazda az da olsa çözünme işlemi gerçekleşir. Dağılma kromatografisi yönteminde, maddelerin sabit fazda çözünürlükleri fazla olması istenir, hareketli fazda ise çözünürlükleri daha az olması istenir. Aksi halde maddeler tam olarak ayrılmaz ve hareketli faza duyulan ilginin neticesinde sabit fazdan dışarıya atılmaktadırlar ve hatta hareketli faz ve sabit faz farklı polaritelerde olduklarından dolayı numune moleküllerinin çözünürlüklerinde farklı olmasına olanak sağlamaktadır (Michalke ve ark., 2002).

2.4.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

TFSK, hareketli faz polaritelerinin sabit faz polaritelerine kıyasla daha polar olan kromatografi türüne denir. TFSK’nde kimyasal olarak bağlanmış olan fonksiyonel grup içeren sabit faz (ODS-18 karbon atomu zincir yapısından oluşmuş oktadesilsilan) yaygın olarak kullanılır ve ayrıca fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirden oluşan (C8, C2), siyano (CN) ve fenil bağlı sabit fazlar da kullanılabilmektedir.

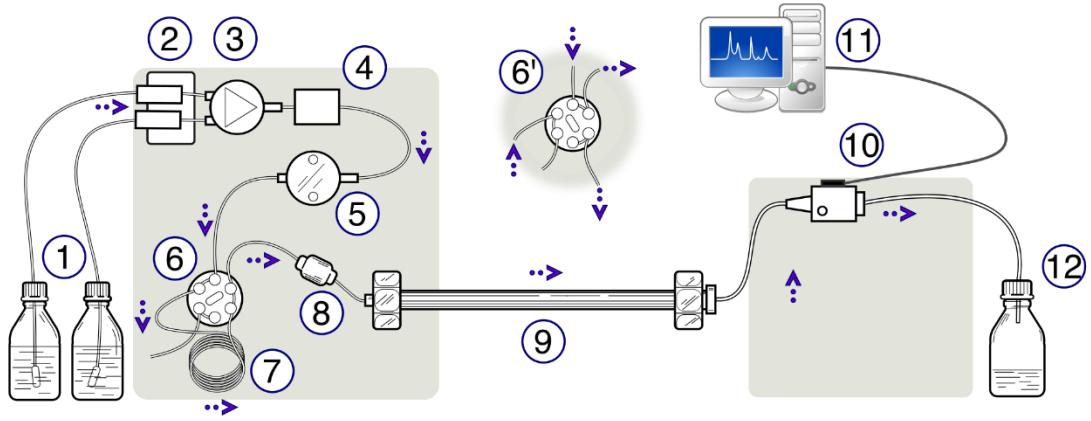
TFSK’nde, hareketli fazın bileşeni olan tampon çözelti ciddi anlamda önem taşımaktadır. Tampon çözeltileri hazırlarken kullanmış olduğumuz su yeterince saf olması gerekmektedir ve hareketli faz, su ile karışabilen organik çözücülerden

oluşmaktadır. Hareketli faz bileşimlerinde kullanılabilen organik çözücülere örnek olarak su, asetonitril veya metanol gibi çözücüler verilebilir.

TFSK sıklıkla apolar maddelerin ayrımı için kullanılır. Uzun alkil zincir yapısını içeren sabit fazlar (C18) daha apolar maddelerin ayrılması işleminde kullanılmakta iken, kısa alkil zincir yapısını içeren sabit fazlar (C8, C2) ise polar maddelerin ayrılması işleminde kullanılmaktadırlar. Yani polar yapıya sahip maddeler uzun alkil zincir yapısını içeren sabit faz içerisinde daha az tutunabiliyorken, apolar maddeler ise kısa alkil zincir yapısını içeren sabit faz içerisinde daha az tutunabilmektedirler (Sutton ve ark., 1997; Lucy ve ark., 2003 ve Jungbauer ve ark., 2009).

2.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Modern sıvı kromatografisi sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmakta olan ve 2-10 µm tanecik boyutuna sahip dolgu maddelerini içeren kolonların kullanılmasında ideal sıvı akış hızı elde etmek için, yüksek atm'lik pompa basıncına ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek basınçlardan dolayı gelişen YPSK için olması gereken donanımlar, diğer kromatografi yöntemleriyle karşılaştırma yapıldığında, daha ince işçilik gerekli olduğu için diğerlerine göre pahalı olmaktadır. Şekil 2.3. yüksek başarılı sıvı kromatografisinin önemli parçalarının şematize edilmiş halini göstermektedir (Nie ve ark., 2019 ve Lozano ve ark., 2018).



Şekil 2.3. YPSK cihazının şematik gösterimi (1) Solvent rezervuarları, (2) solvent gaz giderici, (3) gradyan valfi, (4) mobil fazın iletimi için karıştırma kabı, (5) yüksek basınç pompası, (6) anahtarlama valfi “enjeksiyon konumunda”, (6') anahtarlama valfi “yük konumunda”, (7) numune enjeksiyon döngüsü, (8) ön kolon (koruyucu kolon), (9) analitik kolon, (10) dedektör, (11) veri toplama, (12) atık veya fraksiyon toplayıcı (wikipedia).

2.4.5. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri

Modern YPSK aletinde, 200-1000 mL arasında çözücü koyulabilen çelikten veya camdan yapılan hazneleri içermektedir. Sıklıkla dedektörlerde, haznelerde ve kolonlarda gaz oluşumu ortaya çıkarak kolon ya da sistemde bozucu etkiye sebebiyet veren çözünmüş gazların (azot ve oksijen gibi) ortamdan uzaklaştırılması için bir sistem vardır. Gaz giderme sistemi olarak, vakum pompası düzeneği, damıtma düzeneği ve çözücüü ısıtıp karıştırabilen parçalardan oluşabilir ve bunun yanı sıra Şekil 2.2.'de olduğu gibi az çözünürlükte olan inert olan gazın küçük kabarcıklarıyla, çözünmüş gazları sürükleyebilen basit üfleyici sistemlerde olabilmektedir. Bu yöntemlerde, çözücü içinde bulunan partikül veya toz haldeki maddelerin enjeksiyon ve pompa sistemine zarar vermesini önlemek amacıyla ya da kolonun tıkanmasını önlemek amacıyla, toz veya partikül maddelerini süzme işleminin yapılabileceği bir sistem de bulunmaktadır (Grotti ve ark., 2014).

2.4.6. Pompalama Sistemleri

YPSK pompalama düzeneği için olması gereken şartlar ciddi anlamda katıdır ve bu şartlar aşağıda listelenmiştir (Horner ve ark., 2013):

- Puls içermeyen basınç çıkışının olması,
- Akış hızının 0,1-10 mL dakika⁻¹ olması,
- 400 atm'e kadar basınç üretmesi,
- Bağlı tekrarlanabilirliğin en yüksek % 0,5 oranı ile akış kontrolünün olması,
- Korozyona dayanabilen parçalardan oluşması (Teflon veya paslanmaz çelik).

2.4.7. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Genellikle sıvı kromatografisi yöntemlerinde ölçüm sonuçlarının kesinliğini belirleyen ana temel, örneğin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrar edilebilir olmasıdır. Aşırı örnek yüklemesi yapılan kolonlarda gözlemlenen bant genişlemesi ise kesinlik faktörünü etkileyebilmektedir. Bundan dolayı, numune enjeksiyonun hacminin küçük olması tercih edilmektedir ve hatta sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gerekmektedir (Montes ve ark., 2003).

2.4.8. Sıvı Kromatografi Kolonları

SK yöntemlerinde düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borudan yapılan ya da kalın cidarlı cam borulardan yapılmış kolonlar az da olsa kullanılmaktadır. YPSK'de genellikle kullanılan kolonların boyu 10 ile 30 cm arasındadır. Kolonların iç çapları ise 4 ile 10 mm arasındadır; sıklıkla kullanılmakta olan kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklükleri ise 5 ile 10 µm arasında değişmektedir. Şu an en çok tercih

edilen, iç çapı 4,6 mm olan, 25 cm uzunluğunda ve 5 µm tanecik büyüklüklerine sahip dolgu maddesiyle doldurulan kolonlar kullanılmaktadırlar ve 40000 ile 60000 arasında teorik plaka metre⁻¹ içermektedirler (Cruz ve ark., 2021).

2.4.9. Dedektörler

Elektromanyetik dalga formunda olan enerji akışlarını ölçülebilen niceliklere çeviren ve kaydeden cihazlara dedektör denir. Sıvı kromatografi yönteminde kullanılacak dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır (Muhammad ve ark., 2021):

- Yeteri derecede duyarlı olmalı
- Kararlılık ve tekrarlanabilirlik açısından uygun olmalı
- Geniş doğrusal çalışma aralığına sahip olmalı
- Akış hızlarından bağımsız küçük cevap zamanları verebilmeli
- Bant genişlemesini azaltabilmek için en küçük iç hacimde olmalı
- Yüksek güvenilirlik ve kullanımı kolay olmalıdır.

SK yöntemlerinde kullanılabilen dedektörler genel olarak iki tiptedir (Opuni ve ark., 2021).

- Yığın özelliğinde olan dedektörler, dielektrik sabiti, hareketli fazın yoğunluğu ya da kırma indisi benzeri olan analit tarafından değiştirilebilen yığın özelliklerine cevap verebilen dedektörlerden oluşmaktadır.
- Analit özelliğinde olan dedektörler, floresans şiddeti, analitin UV absorbansı ya da difüzyon akımı benzeri olan hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verebilen dedektörlerden oluşmaktadır.

Analit özelliğine yani maddelere yönelik olan dedektörler hareketli faz içerisindeki maddelerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır, sıklıkla kullanılanlar ise aşağıdaki gibidir:

- Ayrım sonrası tepkime dedektörler
- Fotometrik dedektörleri (Dizi diyot, Infrared, Floresans)
- Elektrokimyasal dedektörleri
- Kütle spektrometreler
- Radyoaktivite dedektörler

Yıgın özelliğine yani çözeltiye yönelik olan dedektörlerde ise numune özelliklerinin belirlenmesine olanak sağlayan dedektör tipidir ve sınıflandırılmaları aşağıdaki gibidir:

- Refraktif indeks dedektörü
- Dielektrik sabiti dedektörü
- İletkenlik dedektörü
- Yoğunluk dedektörü

Tez kapsamında yapılan çalışmalar Foto diyot dizi dedektörü kullanılarak yapılmıştır ve bundan dolayı bu dedektör hakkında detaylı bilgilere yer verilmiştir.

2.4.10. Foto Diyot Dizi Dedektör

Foto diyot dizi (FDD) dedektörler içerisinde polikromatik ışınlar yer almaktadır. Döteryum veya tungsten lambaları ışın kaynağı olarak kullanılır. Işık kaynağından çıkan polikromatik ışın akış hücresine ulaştıktan sonra optik ağına üzerine dağılmaktadır. Sayıca fazla diyottan oluşan FDD üzerine gelmektedir. FDD 200-700 nm arasındaki dalga boyları aralıklarını 0,1 saniye aralıklar ile belirleyebilir. Bundan dolayı analiz işlemlerinde FDD kullanarak birden fazla dalga boylarında okuma gerçekleştirilebilmektedir. FDD kullanarak cevap piklerinin safsızlıklarını veya pik girişimlerinin varlığı gözlemlenebilmektedir (Andruch ve ark., 2012).

2.5. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb pestisitlerinin DNA hasarlarının incelenmesi;

2.5.1. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar

Tez kapsamında komet testi ile DNA hasarı araştırılması bölümünde invitro olarak 3T3 (fare fibroblast hücresi) hücrelerinin çoğaltılması ve hücrelerin düzenli üremeleri sağlanmıştır. 3T3 hücrelerinin besi yeri ortamı olarak yüksek glukoz içeren DMEM (Dulbecco'nun modifiye edilmiş kartal ortamı) besi yerine %5 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin ilavesiyle kullanılmıştır.

Pasaj işlemleri:

- Flasktaki DMEM besi yeri aspire edilmiştir.
- 2 mL steril fosfat tamponlu tuzlu su (37 °C) ile yıkama yapıldıktan sonra, fosfat tamponlu tuzlu su aspire edilmiştir.
- 2 mL tripsin/EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (37 °C) ilave edildikten sonra 37 °C'de 4 dakika süre ile bekletilmiştir.
- 2 mL TNS (Tripsin nötralizasyon çözeltisi) eklenip daha sonra hafifçe çalkalama işlemi yapıldı (tripsinin çalışmasını durdurma amacıyla).
- Elde edilen 4 mL'lik hücre suspansiyonunu pastör pipet yardımıyla 15 mL tüpe aktarılmıştır.
- 1000 rpm oda sıcaklığında 7 dakika santrifüj edilmiştir.
- Tüpte üstte kalan kısmı pastör pipet yardımıyla atılmıştır.
- Pelletin üstüne yaklaşık 2 mL besi yeri eklenmiştir.
- Pastör pipet yardımıyla çek ve bırak şeklinde karıştırma işlemi yapıldı ve daha sonra hücre sayımı yapılmıştır.
- Yeni pasaj için 5 mL besi yeri içerisinde 100,000 hücre olacak şekilde flaska konulmuştur.

Hücrelerimizin düzenli üremeleri sağlandıktan sonra DNA hasarını araştırmak üzere komet testi uygulandı.

2.5.1.1. Genotoksisite Testi, Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Komet testi alkali şartlar altında yapılan ($\text{pH} > 13$) komet testi ile DNA hasarları olarak tek ve çift zincir kırılımları, alkali işaretli bölgelerde oksidatif DNA baz hasarları, DNA-protein/DNA-ilaç/DNA-DNA çapraz geçişlerini belirleyebilmektedir ve DNA onarımı ölçülebilmektedir. Nötral komet testi (pH : 7-10) kullanıldığında ise alkali işaretli bölgeler ve tek zincir kırıklarını tayin edemez, yalnızca DNA'daki çift zincir kırıklarını gözlemleyebilmektedir. Bundan dolayı alkali komet testi hassas ve DNA hasarını tayin etme imkanını daha fazla verir.

Prensibi: Hasarsız DNA, çekirdekteki matriks proteinler ile organize yapıdadır; ancak DNA molekülünde herhangi bir hasar ortaya çıktığında organize yapısı bozulmaktadır. Hasar görmüş DNA sarmalındaki zincirler kompakt yapılarını kaybedip, gevşer ve agar içindeki boşluklara yayılmaktadır. Elektroforezde akım uygulanmasıyla birlikte negatif yüklü DNA anot tarafına doğru harekete başlar. Hasarsız DNA büyük yapıdadır ve uygulanan akım ile birlikte kuyruk bırakmadan göç etmektedir. Hasardan dolayı parçalara ayrılan daha küçük kısımlar ise geride kalarak kuyruk oluşturur. Bundan dolayı DNA'daki kuyruk sayısı hücredeki hasarın ne boyutta olduğunu göstermektedir.

2.5.1.1.1. Komet testinin uygulanışı

Komet testi 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 200,000/2mL olacak şekilde uygulandı. Bir kontrol ve bir pozitif kontrol ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) 2 kuyucuğa uygulandı. Test edilecek pestisitlerin $30 \mu\text{g/mL}$ 'lik stok çözeltileri steril DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılarak hazırlandı. Daha sonra komet testinde kullanılmak üzere 5, 10, 20 ve $30 \mu\text{g/mL}$ 'lik derişimler hazırlandı. Çözücü olarak steril DMSO

kullanıldığı için komet testi ile %0,1 DMSO çözücü kontrol olarak kullanıldı. (Tiram test edilen 5 µg/mL derişimlerde oldukça fazla DNA hasarına neden olduğu, 10 µg/mL derişimde ghost hücreler nedeniyle mikroskopta sayım yapılamadığı, 20 ve 30 µg/mL derişimlerde ise sitotoksik etkili olduğu görüldüğünden; Tiram için 0,1, 0,3, 1 ve 3 µg/mL'lik çözeltiler hazırlanarak komet testi tekrar edilmiştir).

Hücreleri agara alma: Her bir lamda 10,000 ile 20,000 arasında hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak 50 µL hücre süspansiyonuyla 37°C'de eritilmiş 100 µL %0,5 'lik LMPA (düşük erime noktalı agaroz) , karıştırma işlemi yapıldıktan sonra önceden %1'lik NMPA (normal erime noktalı agaroz) çözeltisine batırılıp agar ile kaplama yapılmış lamlara yayılma işlemi yapıldı ve üzerini lamel ile kapattıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde 5 dakika bekletilip agarın katı hale gelmesi sağlanmıştır.

Lysing: Lamalar önceden hazır edilip buzdolabı içinde bekletilip soğuk lysing çözeltisine daldırılarak minumum 1 saat buzdolabı içinde bekletilme işlemi yapılmıştır.

Alkali uygulaması ve elektroforez: Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisiyle birlikte uygun miktarda doldurulmuştur (Bu tampon çözelti, lamaların üzerini 0,5 ile 1 cm kadar geçecek şekilde olması gerekmektedir). Lysing çözeltisinden çıkarılan lamalar agar yayılan kısımları üst tarafa gelecek biçimde elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiştir. Lamalar, 20 dakika akım uygulamaksızın çözelti içerisinde bekletildi ve daha sonra, 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika elektroforez uygulanmıştır.

Nötralizasyon: Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankından çıkarılan lamalar üç kez nötralizasyon çözeltisiyle yıkanmıştır. Hücreleri lamlara fiske etmek amacıyla alkol içerisine daldırılan lamalar okuma yapılınca dek nemli bir ortamda saklanmıştır.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme: Lamların üzerine 60 µL (20 µg/mL) etidium bromür çözeltisi ilave edilip ve minimum 10 dakika bekletilmiştir ve daha sonra mikroskop altında okuması yapılmıştır. Her lam içerisinde 100 hücre, floresan mikroskopuyla değerlendirilmiştir. Comet assay IV programı kullanılarak hücreler sayılmıştır.

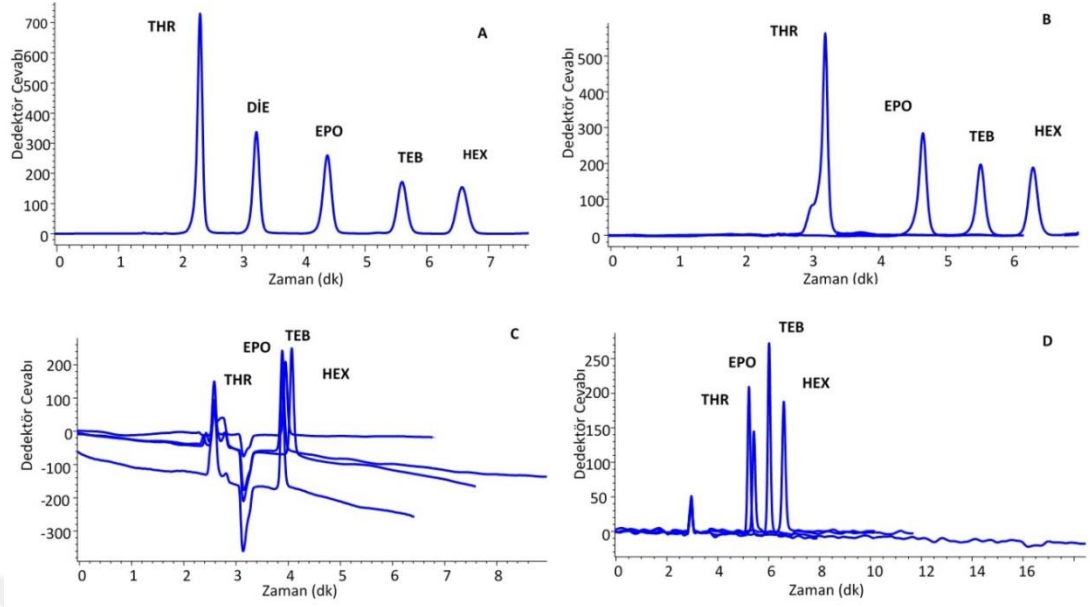


3. BULGULAR

YPSK yöntemiyle, seçilmiş olan pestisitlerin eş zamanlı analizi için ideal kromatografik koşulların belirlenmesinde, ilk olarak sabit fazın özellikleri; fonksiyonel grupları, silika türleri ve tanecik çapları değerlendirildi. Öncelikli olarak hareketli faz organik düzenleyicisinin seçilmesi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının yaptığı etki, dalga boyu, akış hızı ve sıcaklık etkileri incelendi. Bu incelemeler sonucunda Sistem Uygunluk Testi (SUT) parametreleri göz önüne alınarak en uygun sabit faz ve deneysel koşullar seçilmiş ve kromatografik analiz gerçekleştirilmiştir.

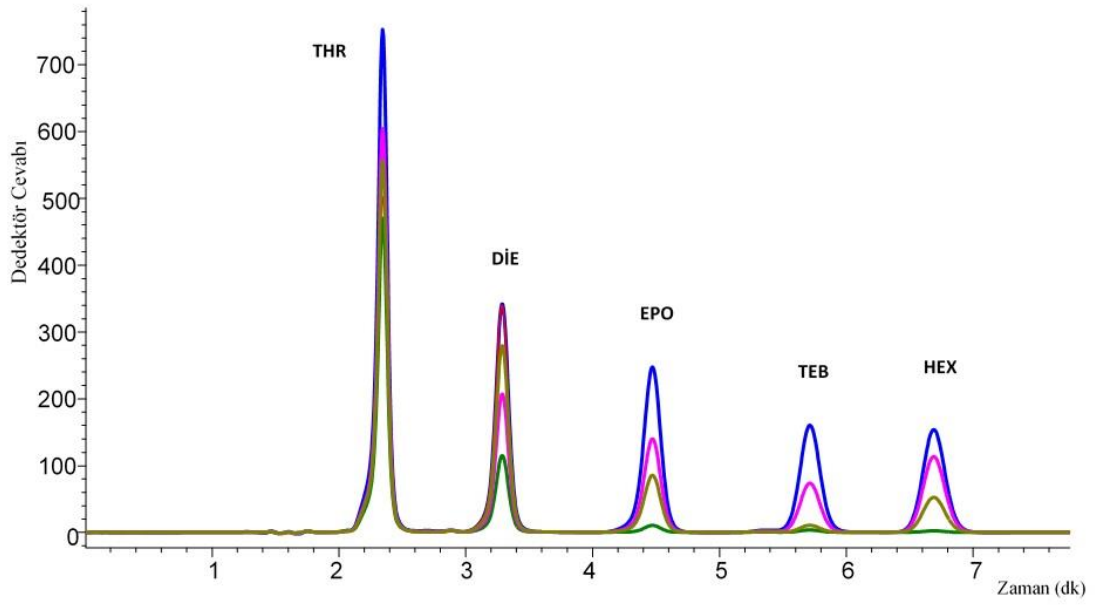
3.1. Optimizasyon Çalışmaları

İyi bir ayırım için en uygun sabit fazın belirlenmesi amacıyla 4 farklı sabit faz ile denemeler yapılmıştır. Bu çalışmalarda 1mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon hacmi, mobil faz olarak metanol: amonyum asetat (77,5/22,5; h/h) karışımı ve kolon sıcaklığı olarak 25 °C sabit tutulmuştur. Şekil 3.1.'de görüleceği gibi seçilen tüm pestisitlerin eş zamanlı analizi için en uygun sabit faz LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) bulunmuştur.



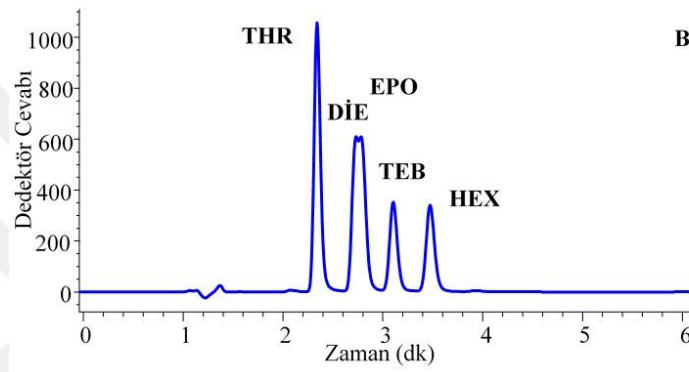
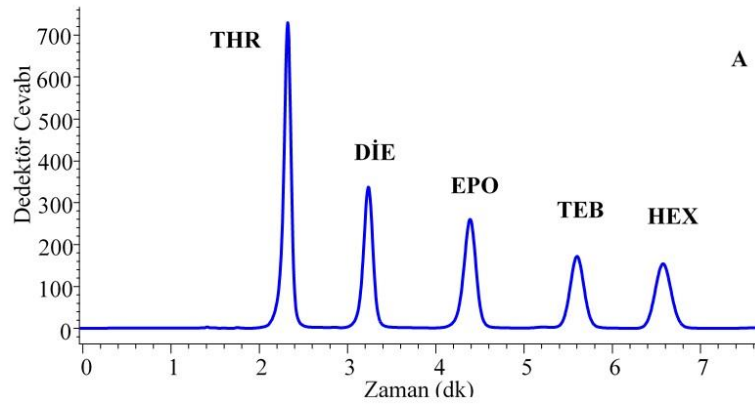
Şekil 3.1. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) (A), THERMO HYPERSIL C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (B), PHENYL112 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (C) ve INERTSIL C8 (150 x 4,6 mm, 5µm) (D) sabit fazların etkisini gösteren kromatogramlar.

En uygun sabit fazın belirlenmesinden sonra yöntem hassasiyeti göz önünde bulundurularak en yüksek pik alanlarının elde edilmesi için dalga boyu denemeleri yapılmıştır. 220, 250, 260 280 ve 300 nm’de pik alanları değerlendirilmiştir. Şekil 3.2.’de görüleceği gibi mavi renk ile belirtilen 220 nm dalga boyunda hem tüm pestisitlere ait kromatogramlar belirgin şekilde görülürken hem de en yüksek alan değerleri elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı dalga boyu denemelerine ait kromatogramlar.

Analizler sonucu atık olarak çıkan organik çözücülerin çevreye oldukça zararlı etkilerinin yanı sıra maliyet açısından da dezavantajları bulunmaktadır. Optimizasyon çalışmalarında organik çözücü olarak asetonitril ve metanol sisteme verilmiştir. Şekil 3.3’de görüleceği gibi mobil faz bileşeni olarak asetonitril kullanıldığında DiE ve EPO pestisitleri birbirlerine girişim yaptıkları için istenilen ölçüde ayırım elde edilememiştir.



Şekil 3.3. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/ dk, 10 μ L enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol (A) ve asetonyitril (B): 5 mM amonyum asetat (pH: 6,3); (77,5/22,5; h/h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar.

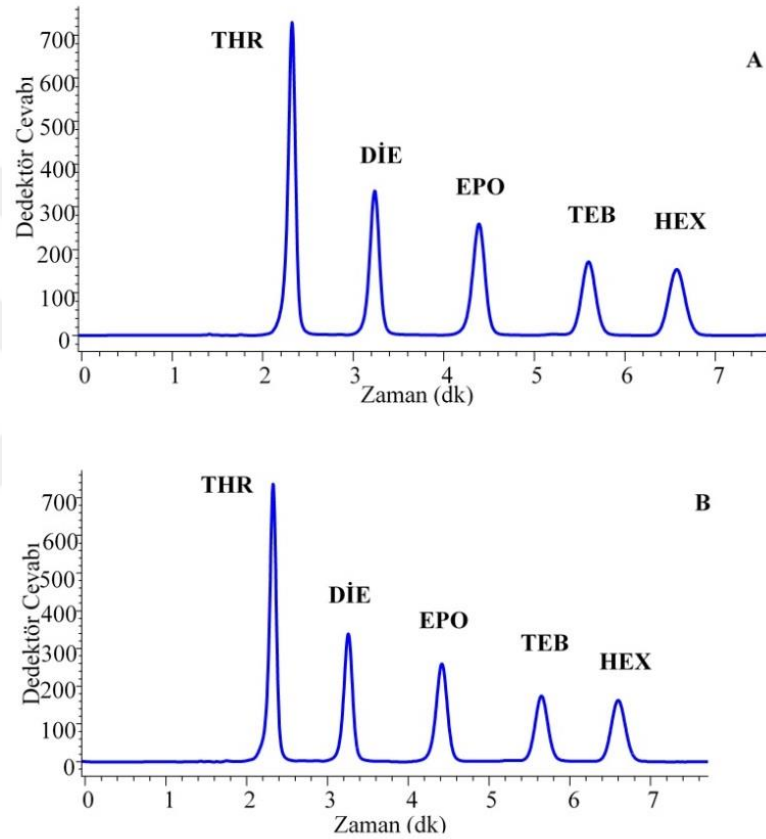
Organik çözücü olarak metanol kullanıldığı zaman pestisitlere ait sistem uygunluk parametreleri sonuçları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. SUT parametrelerine göre organik çözücü etkisi.

Organik çözücü	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
Metanol	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233

Önceden yapılan çalışmalarda, amonyum asetat tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. SK çalışmalarında maddelerin iyi şekilde iyonlaşmasını sağlamak amacıyla amonyum format, amonyum asetat ve formik asit gibi uçucu özellikleri

taşıyan reaktiflerin kullanılması gerekmektedir. Optimum şartların belirlenmesi için tampon çözeltilerinin analiz sonucuna etkilerini araştırmak amacıyla bütün deneysel parametreler sabitlenerek amonyum format tampon çözeltisi kullanılarak da analizler yapılmıştır (Şekil 3.4.). Sistem uygunluk parametreleri değerlendirildiğinde (Çizelge 3.2.) her iki tampon çözeltide yakın sonuçlar sunsa da kimyasal özellikleri düşünüldüğünde amonyum asetat tampon çözeltisi ile çalışmalara devam edilmiştir.

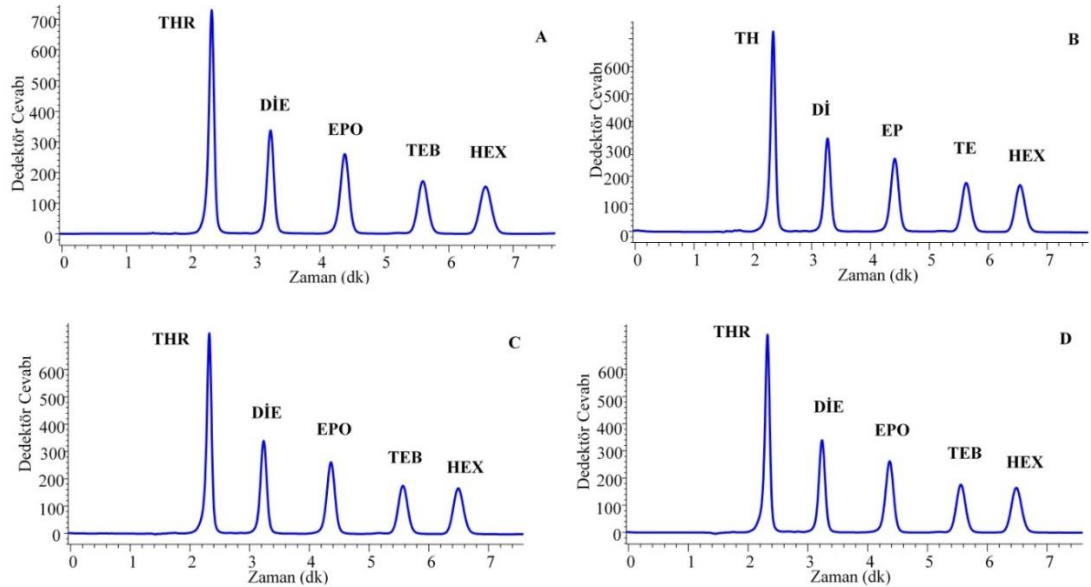


Şekil 3.4. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/ dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5mM amonyum asetat (A), 5mM amonyum format (B) (pH: 6,3); (77,5/22,5; h/h) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.2. SUT parametrelerine göre tampon çözeltilerinin türlerinin kıyaslanması.

Tampon çözelti	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
Amonyum asetat	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
Amonyum format	THR	2,33	0,59	3690	-	-
	DİE	3,26	1,23	4172	5,232	2,072
	EPO	4,42	2,02	4695	5,035	1,644
	TEB	5,65	2,87	5733	4,425	1,416
	HEX	6,60	3,52	6305	3,007	1,226

Tampon çözeltisinin belirlenmesinin ardından pestisitlerin analizleriyle ilgili olarak tampon çözeltisinin molaritesinin etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla, kolon, akış hızı, kolon sıcaklığı ve mobil faz bileşimi parametreleri sabitlenmiş ve amonyum asetat tampon çözeltisi derişimi artan miktarlarda (5-40 mM) kullanılarak çalışılmıştır. Sistem uygunluk parametreleri incelendiğinde (Çizelge 3.3.) yüksek derişimlerde tuzların çökmesi ve kolona zarar vermesi ihtimalleri göz önüne alınarak amonyum asetat tampon çözeltisinin molaritesi 5 mM olarak seçilmiştir.

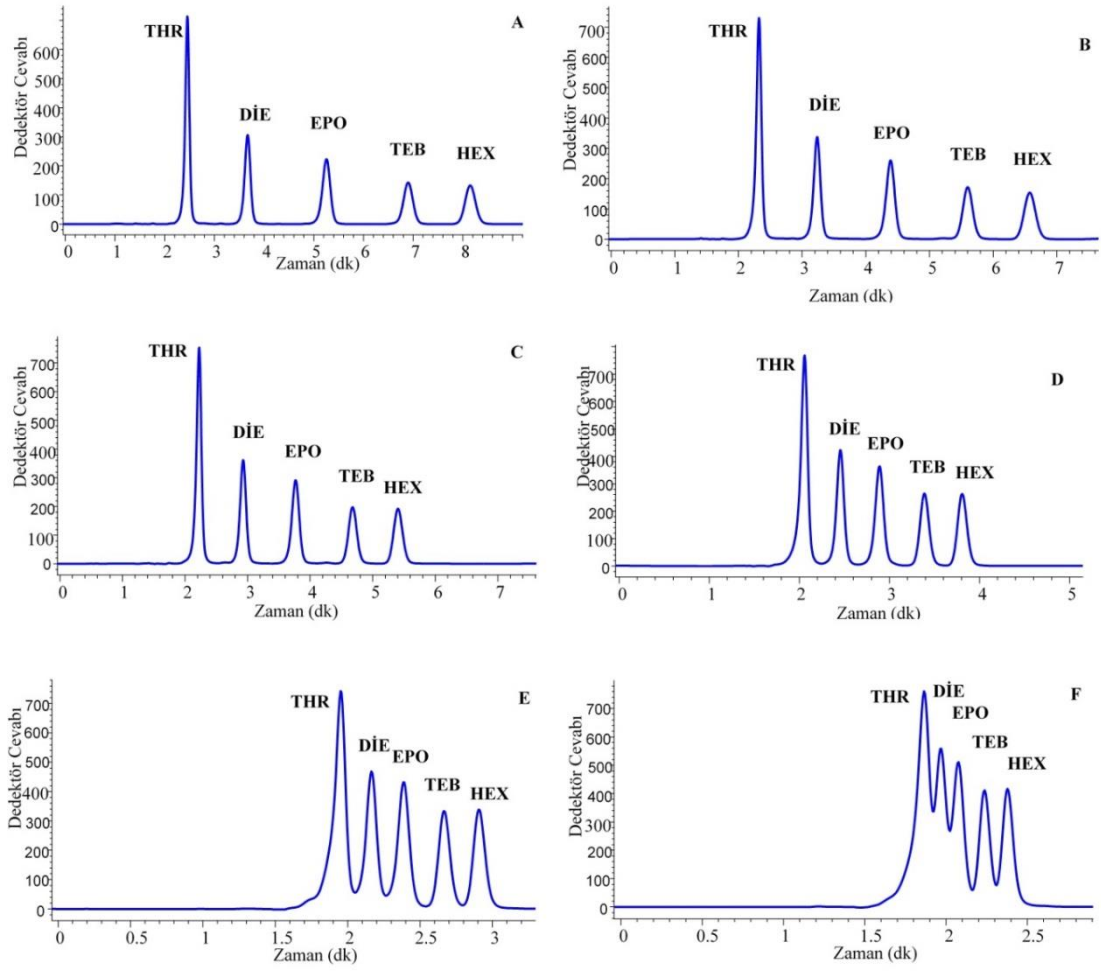


Şekil 3.5. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1 mL/dk, 10 μ L enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM (A), 10 mM (B), 20 mM (C), ve 40 mM (D) amonyum asetat (pH: 6.3); (77.5/22.5; h/h) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.3. SUT parametrelerine göre tampon çözelti molaritesinin kıyaslanması.

Molarite	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
5 mM	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
10 mM	THR	2,34	0,53	3812	-	-
	DİE	3,27	1,14	4316	5,262	2,136
	EPO	4,41	1,88	4791	5,029	1,657
	TEB	5,62	2,68	5964	4,435	1,421
	HEX	6,54	3,27	6938	3,017	1,223
20 mM	THR	2,32	0,58	3791	-	-
	DİE	3,23	1,20	4175	5,178	2,067
	EPO	4,36	1,97	4666	4,943	1,639
	TEB	5,57	2,79	5678	4,371	1,417
	HEX	6,49	3,42	6547	3,002	1,226
40 mM	THR	2,32	0,59	3771	-	-
	DİE	3,24	1,22	4327	5,232	2,055
	EPO	4,37	1,99	4709	5,001	1,636
	TEB	5,56	2,81	5694	4,330	1,409
	HEX	6,48	3,44	6314	2,981	1,226

SK tekniğinde, SUT parametrelerine göre iyi ayırım için su yüzdesi ve organik çözücü çok önemli birer parametrelerdir. İdeal metanol oranını bulabilmek amacıyla hareketli fazın organik çözücü yüzdesi %75, %77,5, %80, %85, %90 ve %95 olacak şekilde çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) kolonunda, 25 °C kolon sıcaklığı, 1 mL/dk akış hızıyla, 10 µL enjeksiyon hacmiyle, 220 nm dalga boyunda, 5 mM amonyum asetat çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6.). SUT parametreleri (Çizelge 3.4.) ve ilerleyen çalışmalarda farklı matrikslerden gelebilecek safsızlıklar göz önüne alındığından hareketli faz içeriğinde %77,5 metanol oranı optimum olarak seçilmiştir.



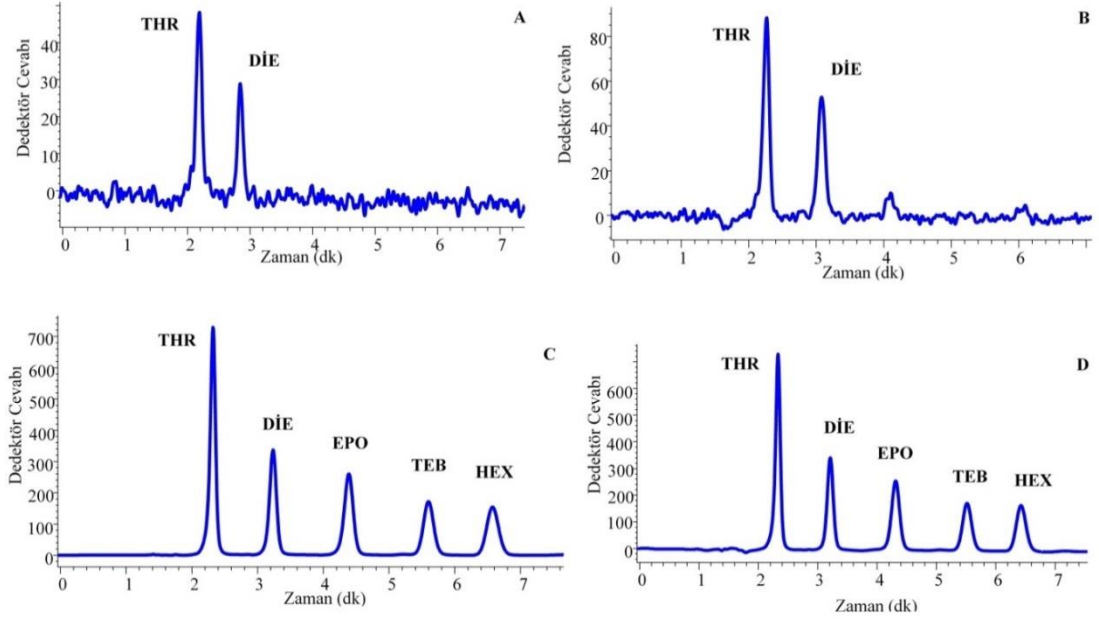
Şekil 3.6. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol (75/25; h/h) (A), (77,5/22,5; h/h) (B), (80/20; h/h) (C), (85/15; h/h) (D), (90/10; h/h) (E) ve (95/5; h/h) (F): 5 mM amonyum asetat (pH: 6.3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.4. SUT parametrelerine göre hareketli faz bileşimlerinin kıyaslanması.

Metanol: Amonyum asetat (h:h)	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
75:25	THR	2,46	0,71	3905	-	-
	DİE	3,67	1,55	4359	6,374	2,19
	EPO	5,26	2,65	4967	6,084	1,711
	TEB	6,90	3,79	5917	4,991	1,43
	HEX	8,15	4,66	6752	3,296	1,228
77,5:22,5	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
80:20	THR	2,22	0,56	3678	-	-
	DİE	2,93	1,05	4087	4,257	1,884
	EPO	3,77	1,64	4530	4,111	1,559
	TEB	4,68	2,27	5397	3,797	1,389
	HEX	5,40	2,78	6231	2,74	1,223
85:15	THR	2,06	0,48	3467	-	-
	DİE	2,46	0,77	4022	2,697	1596
	EPO	2,89	1,08	4388	2,635	1,408
	TEB	3,39	1,44	5191	2,743	1,332
	HEX	3,81	1,74	5852	2,159	1,209
90:10	THR	1,95	0,40	3628	-	-
	DİE	2,16	0,56	4415	1,628	1,376
	EPO	2,39	0,72	4454	1,622	1,286
	TEB	2,67	0,92	5240	1,917	1,279
	HEX	2,91	1,09	5777	1,603	1,188
95:5	THR	1,87	0,33	6215	-	-
	DİE	1,97	0,41	4595	0,997	1,226
	EPO	2,08	0,48	4043	0,862	1,186
	TEB	2,24	0,60	6418	1,307	1,233
	HEX	2,38	0,70	6746	1,24	1,168

Kolon, organik çözücü, tampon çözelti ve yüzdeleri belirlendikten sonra tampon çözeltisinin pH'ının analiz üzerinde yaptığı etkiyi görmek için tampon çözeltisinin pH'ı 2,5, 4,0, 6,3 ve 8,0'e ayarlanmış ve incelenmiştir (Şekil 3.7.). Analiz sonuçları değerlendirildiğinde (Çizelge 3.5.), asidik koşulların pestisitlerin

alıkonması uygun olmadığı görülmüştür. Bazık koşullar ise kolonun ömrünü kısalttığı için tampon çözeltinin pH'sı 6,3 olarak belirlenmiştir.

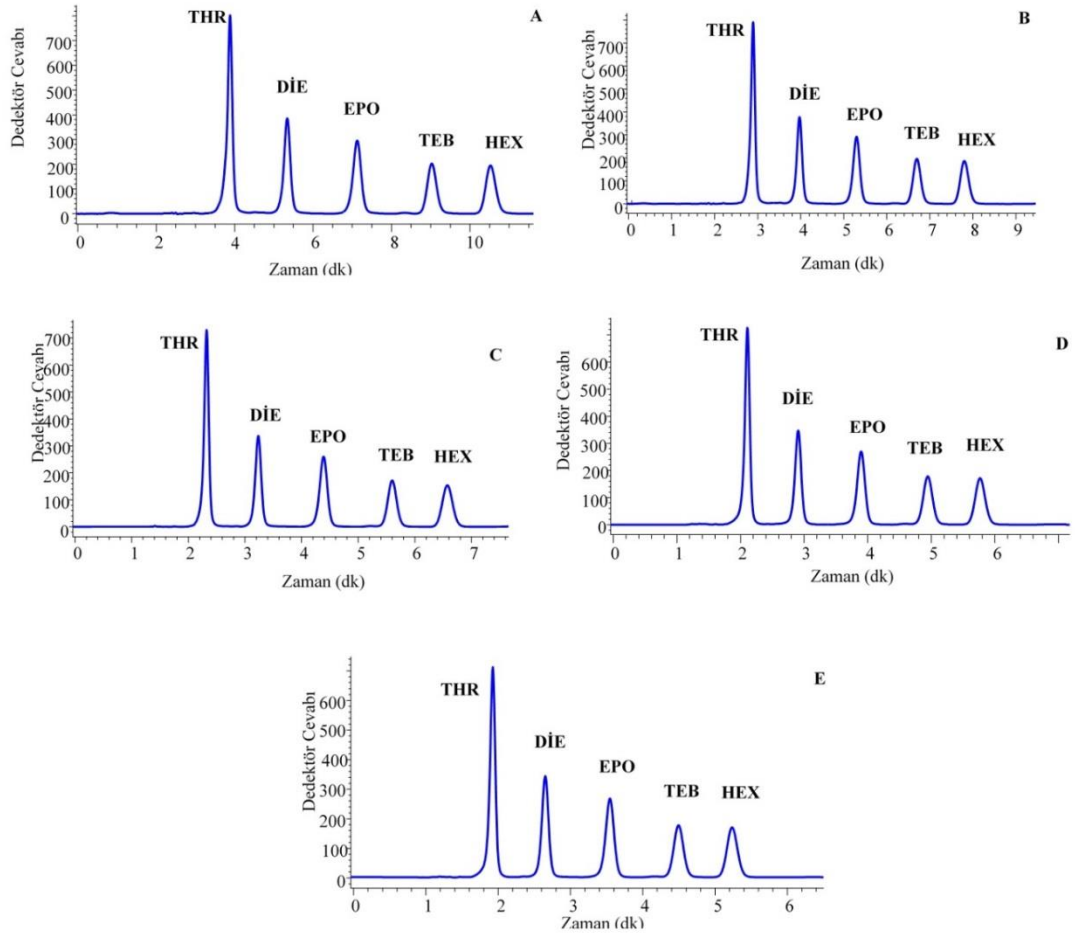


Şekil 3.7. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), kolon sıcaklığı: 25 °C, akış hızı: 1mL/dk, 10 µL enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h), pH: 2,0 (A), pH: 4,0 (B), pH: 6,3 (C) ve pH: 8,0 (D) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.5. SUT parametrelerine göre tampon çözelti pH'sının kıyaslanması.

pH	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
6,3	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
8	THR	2,33	0,52	3887	-	-
	DİE	3,21	1,10	4496	5,147	2,097
	EPO	4,31	1,82	4576	4,924	1,655
	TEB	5,51	2,60	6064	4,463	1,432
	HEX	6,42	3,20	6719	3,043	1,228

Sabit faz ve hareketli faz seçim optimizasyonlarının ardında kolonun basınç değeri dikkate alınarak akış hızı denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla, akış hızı 0,6-1,2 mL/dk (Şekil 3.8.) arasında değiştirilerek SUT parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.6.). Farklı matrikslerden gelebilecek safsızlıklar ve 1,0 mL/dk akış hızından yüksek akış hızlarında artan basınç kolonun kullanım ömrünü kısaltacağı için 1,0 mL/dk akış hızı optimum olarak seçilmiştir.

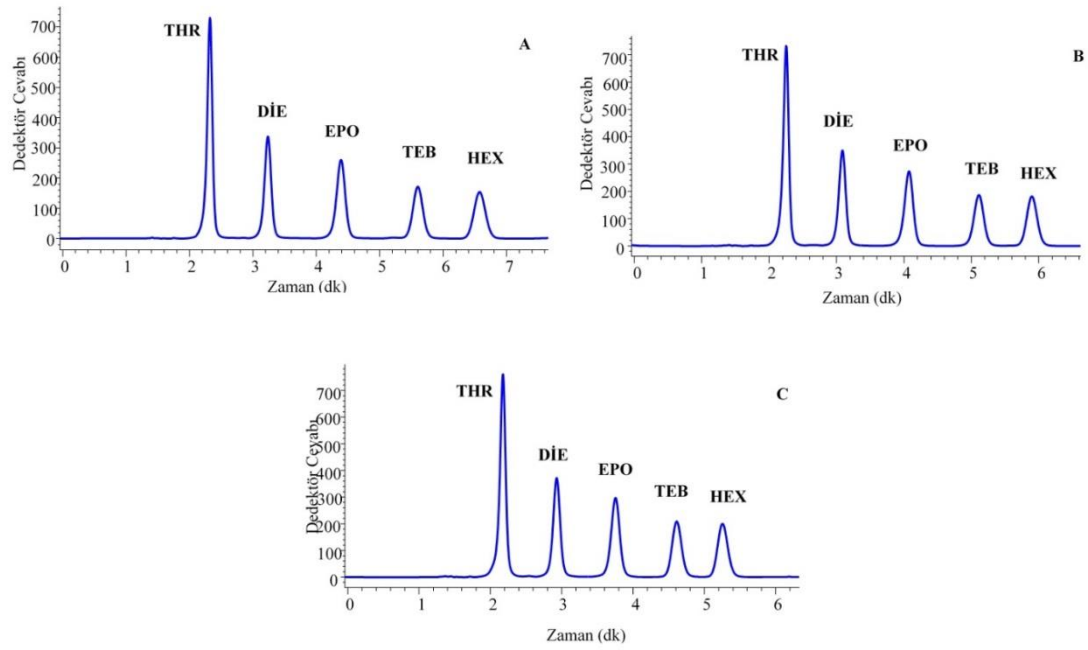


Şekil 3.8. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), kolon sıcaklığı: 25 °C, 0,6 mL/ dk (A), 0,8 mL/ dk (B), 1 mL/ dk (C), 1,1 mL/ dk (D) ve 1,2 mL/ dk (E), 10 μ L enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h) (pH: 6,3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.6. SUT parametrelerine göre akış hızının kıyaslanması.

Akış Hızı	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
0,6 mL/dk	THR	3,88	0,64	4752	-	-
	DİE	5,34	1,25	4998	5,517	1,963
	EPO	7,12	2,01	5471	5,182	1,6
	TEB	9,03	2,81	6548	4,568	1,4
	HEX	10,52	3,44	7468	3,203	1,224
0,8 mL/dk	THR	2,89	0,63	4286	-	-
	DİE	3,97	1,24	4573	5,229	1,959
	EPO	5,30	1,99	5156	4,995	1,602
	TEB	6,70	2,78	6129	4,388	1,397
	HEX	7,80	3,41	7105	3,089	1,223
1 mL/dk	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
1,1 mL/dk	THR	2,11	0,65	3440	-	-
	DİE	2,91	1,27	3867	4,814	1,962
	EPO	3,90	2,04	4454	4,7	1,608
	TEB	4,94	2,86	5181	4,118	1,4
	HEX	5,77	3,50	6130	2,882	1,224
1,2 mL/dk	THR	1,93	0,63	3171	-	-
	DİE	2,65	1,25	3694	4,656	1,973
	EPO	3,55	2,01	4230	4,552	1,608
	TEB	4,49	2,81	4865	3,98	1,4
	HEX	5,24	3,44	5809	2,776	1,223

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında optimum kolon sıcaklığın belirlenmesi için kolon sıcaklığı 25 °C, 35 °C ve 45 °C aralığında değiştirilmiştir (Şekil 3.9.). Farklı sıcaklıklardaki analiz sonuçları karşılaştırıldığında (Çizelge 3.7.) sıcaklık arttıkça 5 pestisit için toplam analiz süresi sadece 1 dakika kadar kısalmıştır. Ayrım gücü, seçicilik ve kolon etkinlikleri arasında fark olmadığı için daha fazla enerji harcamamak için kolon sıcaklığı 25 °C olarak seçilmiştir.



Şekil 3.9. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C) kolon sıcaklığı, 1 mL/ dk, 10 μ L enjeksiyon hacmi, 220 nm dalga boyu, metanol: 5 mM amonyum asetat (77,5/22,5; h/h) (pH: 6,3) ile yapılmış çalışmaların sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.7. SUT parametrelerine göre kolon sıcaklığının kıyaslanması.

Kolon sıcaklığı	Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
25 °C	THR	2,32	0,62	3791	-	-
	DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
	EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
	TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
	HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233
35 °C	THR	2,25	0,58	3525	-	-
	DİE	3,09	1,16	4030	4,81	2,013
	EPO	4,08	1,85	4503	4,509	1,595
	TEB	5,11	2,57	5538	3,994	1,391
	HEX	5,90	3,12	6580	2,774	1,213
45 °C	THR	2,18	0,54	3611	-	-
	DİE	2,93	1,08	4061	4,573	1,982
	EPO	3,75	1,66	4395	4,015	1,543
	TEB	4,61	2,27	5387	3,585	1,365
	HEX	5,25	2,73	6067	2,458	1,2

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

Parametreler	Optimize Edilen Koşullar
Kolon tipi	LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm)
Hareketli faz bileşimi	Metanol: Tampon- 5 mM Amonyum asetat (77,5/22,5; h/h)
pH	6,3
Sıcaklık (°C)	25
Akış hızı (mL/dk)	1,0
Enjeksiyon hacmi (µL)	10
Dalga boyu (nm)	220

Geliştirilen YPSK yönteminde optimize edilmiş koşullar altında hesaplanan SUT parametreleri Çizelge 3.9.'de gösterilmiştir. Teorik tabaka sayısı, ayırım gücü, seçicilik faktörü, alıkonma zamanları ve kapasite faktörü parametrelerine bakıldığında geliştirilen yöntemin uygun olduğu görülmüştür.

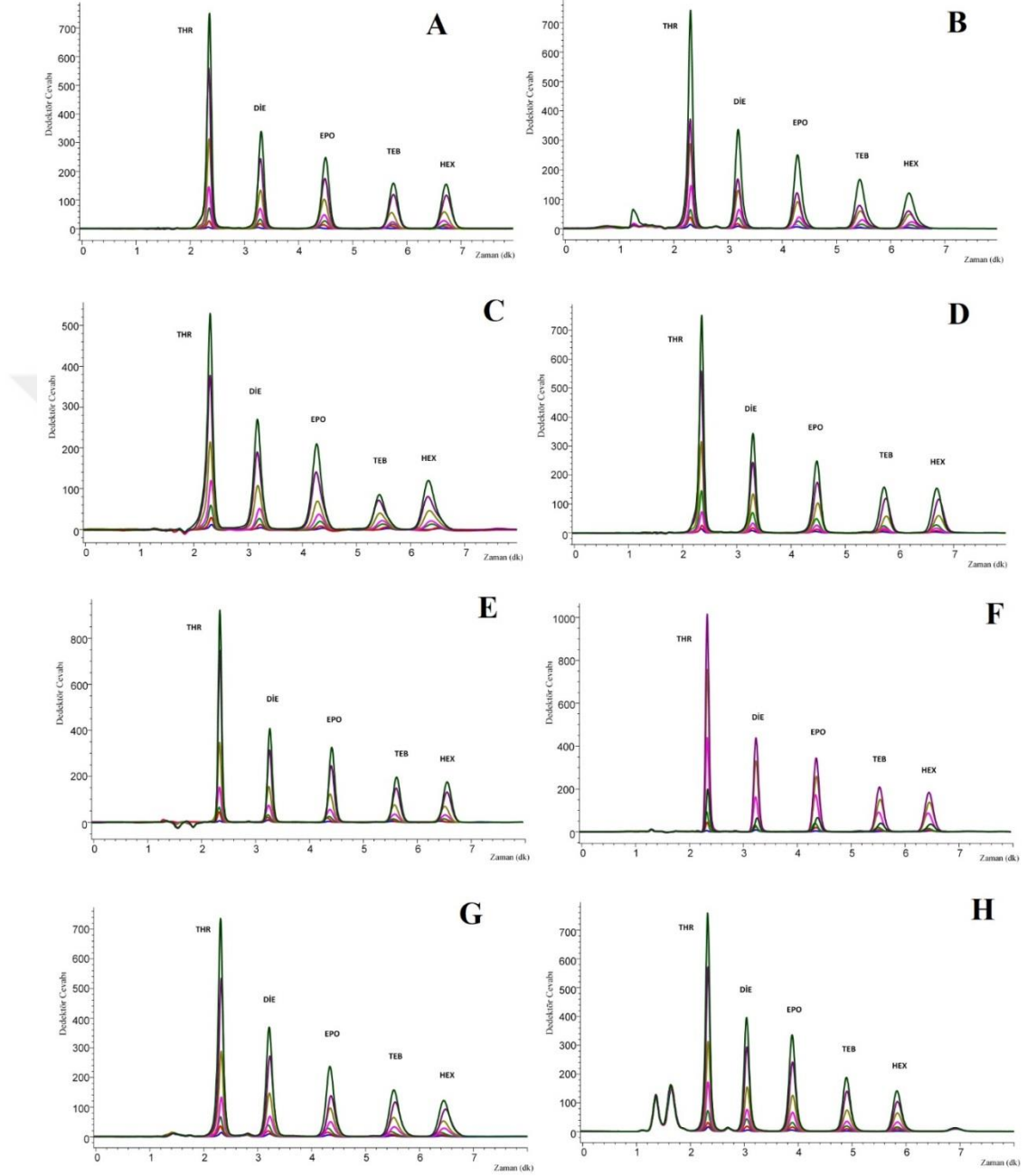
Çizelge 3.9. Pestisitlere ait sistem uygunluk testi parametreleri.

Pestisitler	t_r (dk)	k'	N	R_s	α
THR	2,32	0,62	3791	-	-
DİE	3,24	1,26	4213	5,207	2,023
EPO	4,39	2,07	4741	5,065	1,638
TEB	5,60	2,92	5647	4,373	1,409
HEX	6,57	3,60	5726	3,012	1,233

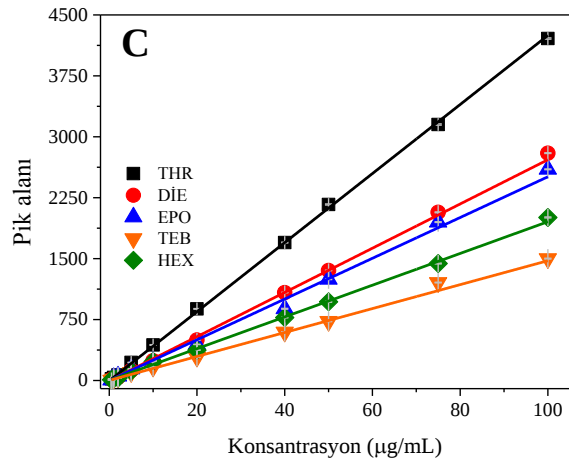
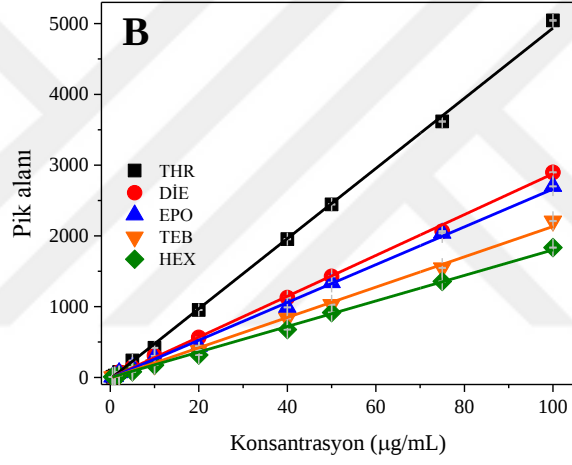
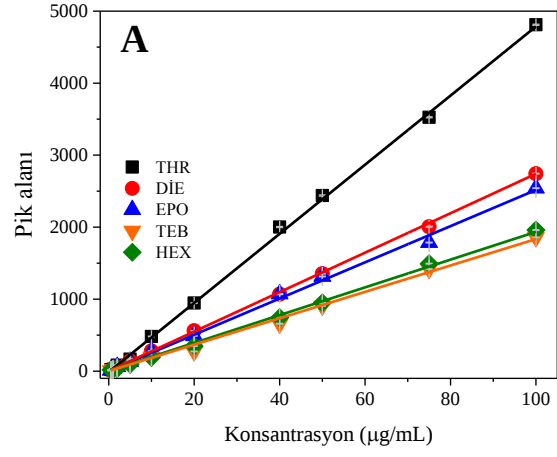
3.2. Kalibrasyon ve Validasyon Çalışmaları

Tez çalışmalarının bu aşamasında her bir pestisit artan derişimlerde hazırlanarak (Şekil 3.10.) ve 5 tekrarlı olacak şekilde optimum koşullarda çalışılmıştır. Derişime karşılık tekrar edilen sonuçlardan çıkan pik alanlarının ortalaması grafiğe geçirilip tüm maddeler için çözücü, elma suyu, toprak, içme suyu, kuyu suyu, atık su, serum ve idrar numunelerinde kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş

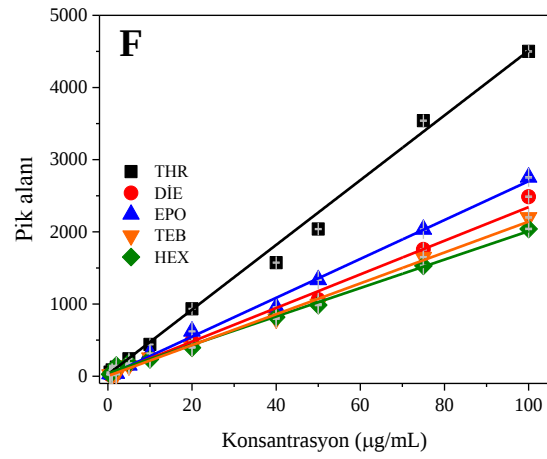
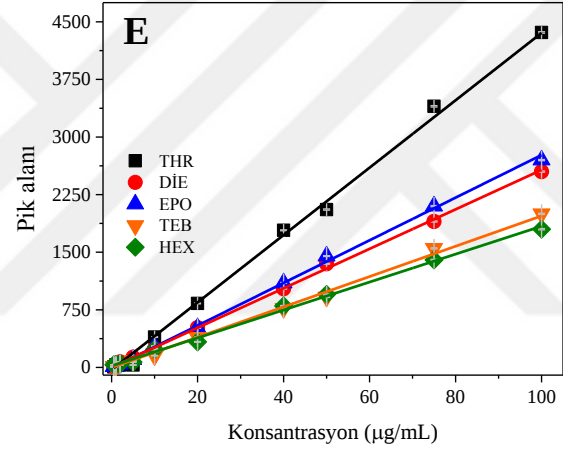
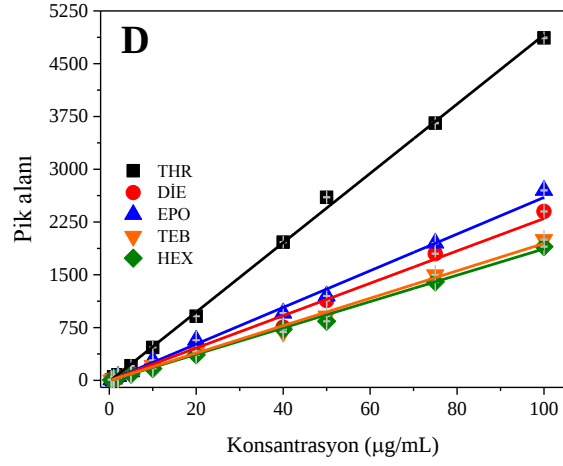
(Şekil 3.11.) ve her matris için validasyon parametreleri hesaplanarak Çizelge 3.10., 3.11. ve 3.12.' de sunulmuştur.



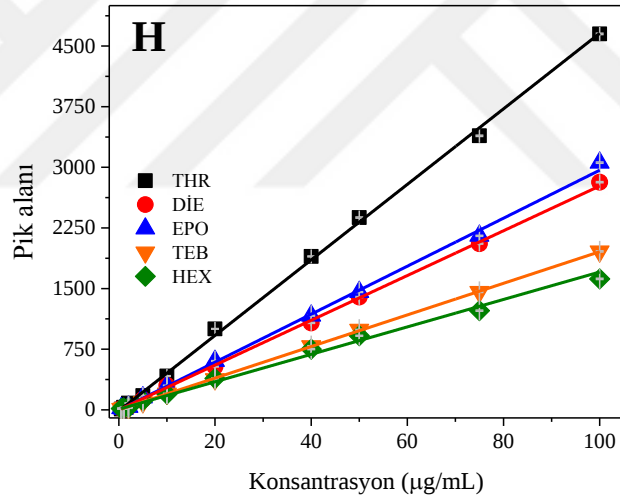
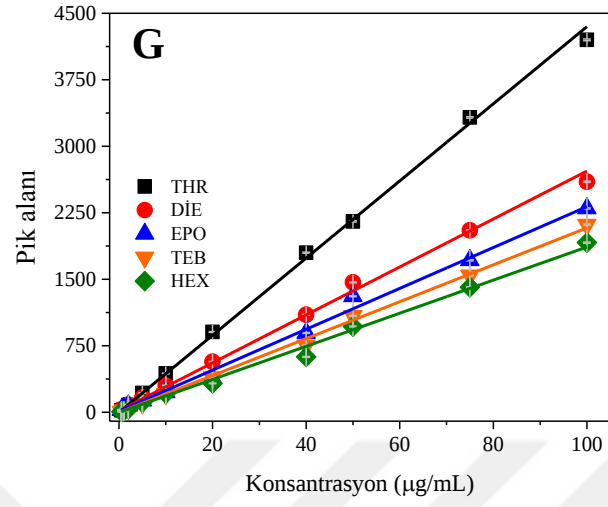
Şekil 3.10. Optimum koşullarda kalibrasyon kromatogramları; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.



Şekil 3.11. Optimum koşullarda kalibrasyon eğrileri; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.



Şekil 3.11. Devam Optimum koşullarda kalibrasyon eğrileri; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.



Şekil 3.11. Devam Optimum koşullarda kalibrasyon eğrileri; A) çözücü, B) elma suyu, C) toprak, D) içme Suyu, E) kuyu suyu, F) atık su, G) serum, H) idrar numuneleri.

Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan çözücü, elma suyu ve toprak örneklerinde validasyon parametreleri.

Validasyon Parametresi	Çözücü					Elma suyu					Toprak				
	THR	DİE	EPO	TEB	HEX	THR	DİE	EPO	TEB	HEX	THR	DİE	EPO	TEB	HEX
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,5-100					0,5-100					0,5-100				
Eğim	47,98	27,39	25,13	18,30	19,27	49,57	28,85	26,70	21,42	18,05	42,50	27,22	25,08	14,73	19,53
Kesişim	-11,54	2,20	3,89	1,43	7,24	-20,58	-7,50	-8,80	-9,40	-2,19	-2,40	-4,66	-0,46	1,55	1,66
Korelasyon katsayısı	0,997	0,999	0,997	0,995	0,998	0,999	0,995	0,995	0,998	0,998	0,999	0,997	0,995	0,994	0,997
Teşhis sınırı (µg/mL)	0,04	0,07	0,08	0,07	0,09	0,02	0,06	0,08	0,06	0,11	0,05	0,08	0,09	0,16	0,09
Tayin alt sınırı (µg/mL)	0,10	0,20	0,24	0,20	0,26	0,07	0,17	0,24	0,18	0,33	0,16	0,25	0,28	0,47	0,28
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,21	0,47	0,98	1,11	1,15	0,22	0,54	0,87	0,99	1,27	0,22	0,50	0,86	1,27	1,38
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,40	0,68	1,12	1,20	1,35	0,43	0,73	0,99	1,13	1,67	0,38	0,76	0,98	1,59	1,68

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.11. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan içme suyu, kuyu suyu ve atık su örneklerinde validasyon parametreleri.

Validasyon Parametresi	İçme suyu					Kuyu suyu					Atık su				
	THR	DİE	EPO	TEB	HEX	THR	DİE	EPO	TEB	HEX	THR	DİE	EPO	TEB	HEX
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,5-100					0,5-100					0,5-100				
Eğim	49,29	23,00	26,04	19,48	18,73	43,86	25,70	27,75	19,74	18,18	44,84	23,30	26,93	21,40	19,70
Kesişim	-13,62	-0,50	-5,29	-2,14	-4,25	-30,59	2,43	-9,57	-1,65	20,42	25,45	13,32	9,26	2,97	40,15
Korelasyon katsayısı	0,998	0,994	0,996	0,996	0,996	0,992	0,999	0,998	0,997	0,996	0,994	0,994	0,996	0,995	0,993
Teşhis sınırı (µg/mL)	0,04	0,10	0,07	0,08	0,11	0,03	0,08	0,08	0,12	0,13	0,03	0,11	0,08	0,10	0,11
Tayin alt sınırı (µg/mL)	0,11	0,30	0,20	0,25	0,34	0,10	0,25	0,26	0,35	0,40	0,10	0,33	0,25	0,29	0,32
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,19	1,06	0,94	1,17	1,37	0,21	0,96	0,89	1,29	1,43	0,27	1,19	0,99	1,07	1,11
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,25	1,57	1,28	1,43	1,67	0,28	1,36	1,13	1,52	1,73	0,33	1,63	1,28	1,50	1,46

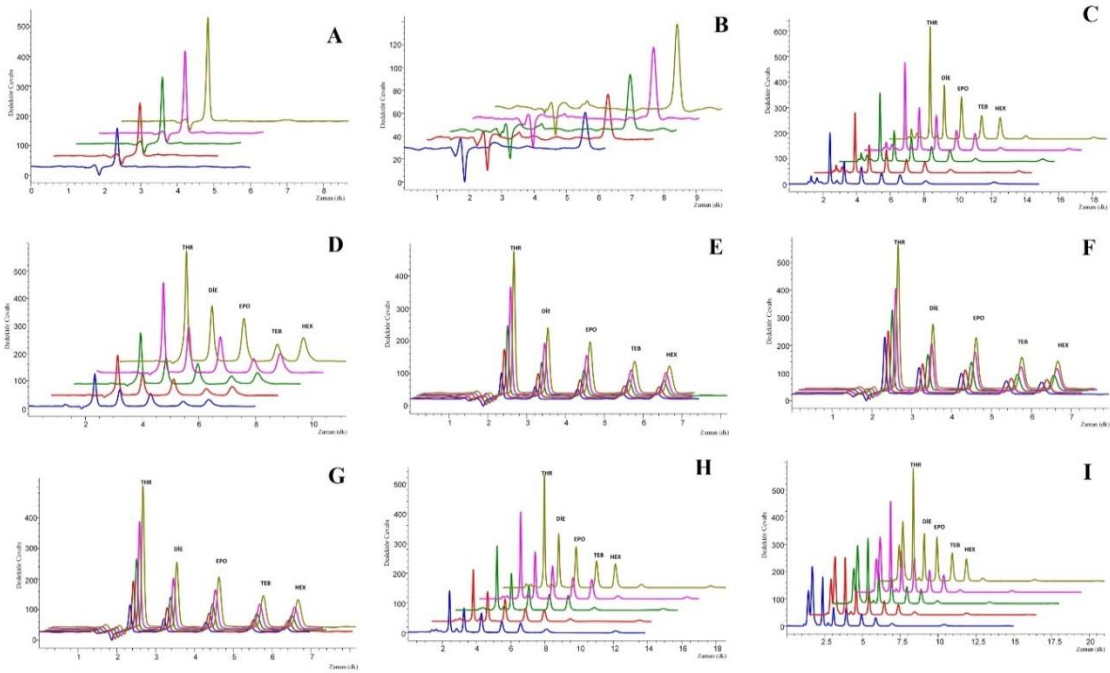
*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.12. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan insan serumu ve insan idrarı örneklerinde validasyon parametreleri.

Validasyon Parametresi	Serum					İdrar				
	THR	DİE	EPO	TEB	HEX	THR	DİE	EPO	TEB	HEX
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,5-100					0,5-100				
Eğim	43,48	27,03	23,04	20,81	18,66	46,71	29,68	27,69	19,55	16,97
Kesişim	-0,64	17,24	14,61	-1,43	-2,35	-13,86	-4,35	-0,50	1,31	7,24
Korelasyon katsayısı	0,998	0,997	0,993	0,998	0,994	0,998	0,997	0,999	0,999	0,994
Teşhis sınırı (µg/mL)	0,03	0,07	0,12	0,12	0,08	0,01	0,08	0,07	0,12	0,12
Tayin alt sınırı (µg/mL)	0,07	0,21	0,36	0,35	0,24	0,04	0,25	0,22	0,36	0,37
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,33	0,99	1,28	1,68	1,99	0,34	0,91	1,27	1,73	1,99
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS) *	0,43	1,24	1,97	1,99	2,15	0,53	1,37	1,43	2,18	2,38

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Yöntem optimizasyon ve validasyon çalışmaları yaptıktan sonra yöntemin doğruluğunu ve biyolojik matriks, su, toprak, elma ve ticari satılan tarım ilacı örneklerindeki katkı maddelerinin ya da farklı maddelerin, pestisitlerin analizlerinde girişim etkilerini tespit etmek amacıyla geri kazanım yöntemleri çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, THR ve TEB içeren ticari satılan tarım ilacı numuneleri, elma suyu, toprak, içme suyu, kuyu suyu, atık su, serum ve idrar numuneleri ile geri kazanım çalışmaları kör matriks ortamına analizi yapılacak maddelerin ilave edilmesi ile yapılmıştır (Şekil 3.12.). Geri kazanım çalışmalarının sonucunda standart maddelerin kalibrasyon denkleminde yerlerine yerleştirmek suretiyle % geri kazanım cinsinden hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 3.13-3.20.).



Şekil 3.12. Optimize edilen koşullarda THR içeren zirai ilaç (A), TEB içeren zirai ilaç (B), elma suyu (C), toprak (D), içme suyu (E), kuyu suyu (F), atık su (G) serum (H) ve idrar (I) numuneleri ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonucunda kaydedilen kromatogramlar.

Çizelge 3.13. Ticari satılan tarım ilacı için geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	THR				TEB			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	18,23				19,92			
BSS (%) *	0,48				2,51			
Bağlı hata (BH) (%)	8,82				0,39			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,25	9,54	19,09	29,77	4,76	9,87	18,71	29,17
Geri kazanım (%)	104,55	95,45	95,44	99,22	95,26	98,70	95,25	97,25
Geri kazanıma ait BSS (%) *	1,09	1,06	0,69	0,64	0,96	1,27	1,01	0,18
Geri kazanıma ait BH (%)	-5,15	4,55	4,56	0,78	4,74	1,30	6,41	2,75

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.14. Elma suyuyla yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	Elma suyu																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	21,67				21,94				21,67				21,55				21,64			
BSS (%) *	0,79				1,22				0,64				2,04				0,91			
BH (%)	-8,35				-9,70				-8,35				-7,75				-8,2			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,33	10,77	19,5	29,4	5,20	9,97	21,28	29,7	5,18	10,42	21,18	29,9	5,09	10,25	20,89	29,7	4,91	10,20	20,86	31,02
Geri kazanım (%)	104,5	104,7	97,7	98,3	104,0	99,7	104,7	99,0	103,6	104,2	104,88	99,80	101,90	102,52	104,46	99,10	98,21	102,0	104,3	103,3
Geri kazanıma ait BSS (%) *	0,24	0,41	0,14	1,17	0,43	0,17	0,40	1,40	0,22	0,19	0,15	1,53	0,69	0,26	0,22	0,51	0,67	0,37	0,33	0,59
Geri kazanıma ait BH (%)	-6,51	-7,75	2,30	1,70	-4,07	0,30	-6,41	0,96	-3,69	-4,27	-5,91	0,20	-1,90	-2,52	-4,46	0,90	1,79	-2,05	-4,30	-3,39

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.15. Toprak ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	Toprak																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	20,94				20,52				21,80				19,77				20,69			
BSS (%) *	1,09				1,37				0,66				0,94				1,36			
BH (%)	-4,7				-2,6				-9,0				1,15				-3,45			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,08	9,97	20,7	31,17	5,23	10,0	20,26	30,6	4,99	10,4	20,9	30,71	5,24	10,3	20,5	31,4	5,03	10,2	20,7	30,4
Geri kazanım (%)	101,5	99,7	103,5	103,9	104,5	100,2	101,3	102,2	99,7	104,4	104,8	102,36	104,7	103,3	102,5	104,7	100,61	102,4	103,7	101,5
Geri kazanıma ait BSS (%) *	0,39	0,27	0,45	0,12	0,56	0,30	0,49	0,43	0,82	0,33	0,29	0,22	1,34	0,67	0,91	0,37	1,71	0,81	0,48	0,37
Geri kazanıma ait BH (%)	-1,52	0,27	-3,59	-3,90	-4,52	-0,29	-1,31	-2,20	0,26	-4,44	-4,81	-2,36	-4,76	-3,33	-2,53	-4,79	-0,61	-2,41	-3,72	-1,55

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.16. İçme suyu ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	İçme Suyu																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	18,50				19,35				19,82				20,86				18,85			
BSS (%) *	0,35				0,55				1,05				0,91				1,18			
BH (%)	7,50				3,25				0,9				-4,3				5,75			
İlave edilen miktar (µg mL ⁻¹)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,29	10,06	19,6	30,67	5,12	10,42	19,1	30,41	5,12	10,3	19,8	29,7	4,95	10,14	20,14	29,4	4,94	10,55	21,57	29,4
Geri kazanım (%)	104,8	100,6	98,4	102,2	102,3	104,2	95,5	101,3	102,3	102,9	99,3	98,9	99,05	101,42	100,72	98,30	98,76	104,7	104,9	98,1
Geri kazanıma ait BSS (%) *	1,10	0,53	1,24	0,27	1,78	1,28	1,37	0,58	1,39	0,52	0,46	0,55	1,81	0,24	0,58	0,33	1,76	0,71	0,61	0,62
Geri kazanıma ait BH (%)	-5,80	-0,64	1,58	-2,25	-2,39	-4,21	4,48	-1,37	-2,36	-2,96	0,64	1,01	0,95	-1,42	-0,72	1,70	1,24	-5,53	-7,85	1,85

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.17. Kuyu suyuyla yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	Kuyu Suyu																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	21,95				21,71				21,94				21,98				21,37			
BSS (%) *	0,24				0,65				0,38				0,63				2,51			
BH (%)	-9,75				-8,55				-9,70				-9,9				-6,85			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	4,98	10,49	19,3	30,69	5,00	10,55	20,62	28,5	5,07	10,72	21,09	30,27	4,91	9,94	20,21	31,63	5,15	10,20	19,3	30,94
Geri kazanım (%)	99,6	104,9	96,8	102,3	100,08	105,5	103,11	95,2	101,44	104,5	104,7	100,8	98,2	99,4	101,07	104,5	102,95	101,9	96,68	103,1
Geri kazanıma ait BSS (%) *	0,76	0,89	0,11	0,12	0,75	0,89	1,33	0,40	0,73	0,93	1,79	0,19	0,98	1,08	1,62	0,16	0,82	1,12	0,63	0,71
Geri kazanıma ait BH (%)	0,34	-4,92	3,19	-2,30	-0,08	-5,52	-3,11	4,74	-1,44	-7,18	-5,43	-0,89	1,71	0,60	-1,07	-5,42	-2,95	-1,98	3,32	-3,14

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.18. Atık su ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	Atık Su																			
	THR				DiE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	19,70				17,98				21,13				18,53				19,17			
BSS (%) *	0,72				1,65				0,88				1,78				6,11			
BH (%)	1,5				10,1				-5,65				7,35				4,15			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,13	9,45	18,8	29,8	4,99	10,23	19,9	30,54	4,89	9,64	18,8	30,08	4,84	10,26	20,37	29,3	4,86	10,05	20,31	29,2
Geri kazanım (%)	102,6	95,7	95,9	99,37	99,8	102,33	99,7	101,79	97,7	96,40	95,5	100,28	96,8	102,63	101,8	97,65	97,13	100,48	101,56	97,37
Geri kazanıma ait BSS (%) *	1,26	0,99	0,67	0,32	1,85	0,49	0,47	0,31	1,63	0,31	0,41	0,29	0,80	0,61	0,09	0,32	1,93	0,53	0,64	0,81
Geri kazanıma ait BH (%)	-2,67	5,52	5,54	0,63	0,20	-2,33	0,26	-1,79	2,26	3,60	5,82	-0,28	3,12	-2,63	-1,86	2,35	2,87	-0,48	-1,56	2,63

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.19. Serum ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Parametre	Serum																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	19,29				20,21				21,61				19,26				21,49			
BSS (%) *	0,29				0,92				0,46				1,00				0,99			
BH (%)	3,55				-1,05				-8,05				3,7				-7,45			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	4,84	10,31	20,58	31,44	5,19	10,36	19,9	29,2	5,24	9,96	20,61	28,7	4,78	9,73	20,18	28,8	4,96	10,50	20,66	29,0
Geri kazanım (%)	96,7	103,12	102,9	104,79	103,8	103,60	99,7	97,39	104,8	99,63	103,0	95,69	95,5	97,31	100,9	96,25	99,1	104,97	103,2	96,97
Geri kazanıma ait BSS (%) *	1,13	0,73	0,11	0,20	0,38	0,89	0,54	0,43	1,45	0,77	0,09	0,45	1,19	1,59	0,68	0,26	0,35	0,87	0,12	0,54
Geri kazanıma ait BH (%)	3,29	-3,12	-2,90	-4,79	-3,82	-3,60	0,27	2,61	-4,80	0,37	-3,04	4,31	4,44	2,69	-0,91	3,75	0,90	-4,97	-3,28	3,03

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Çizelge 3.20. İdrar ile yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

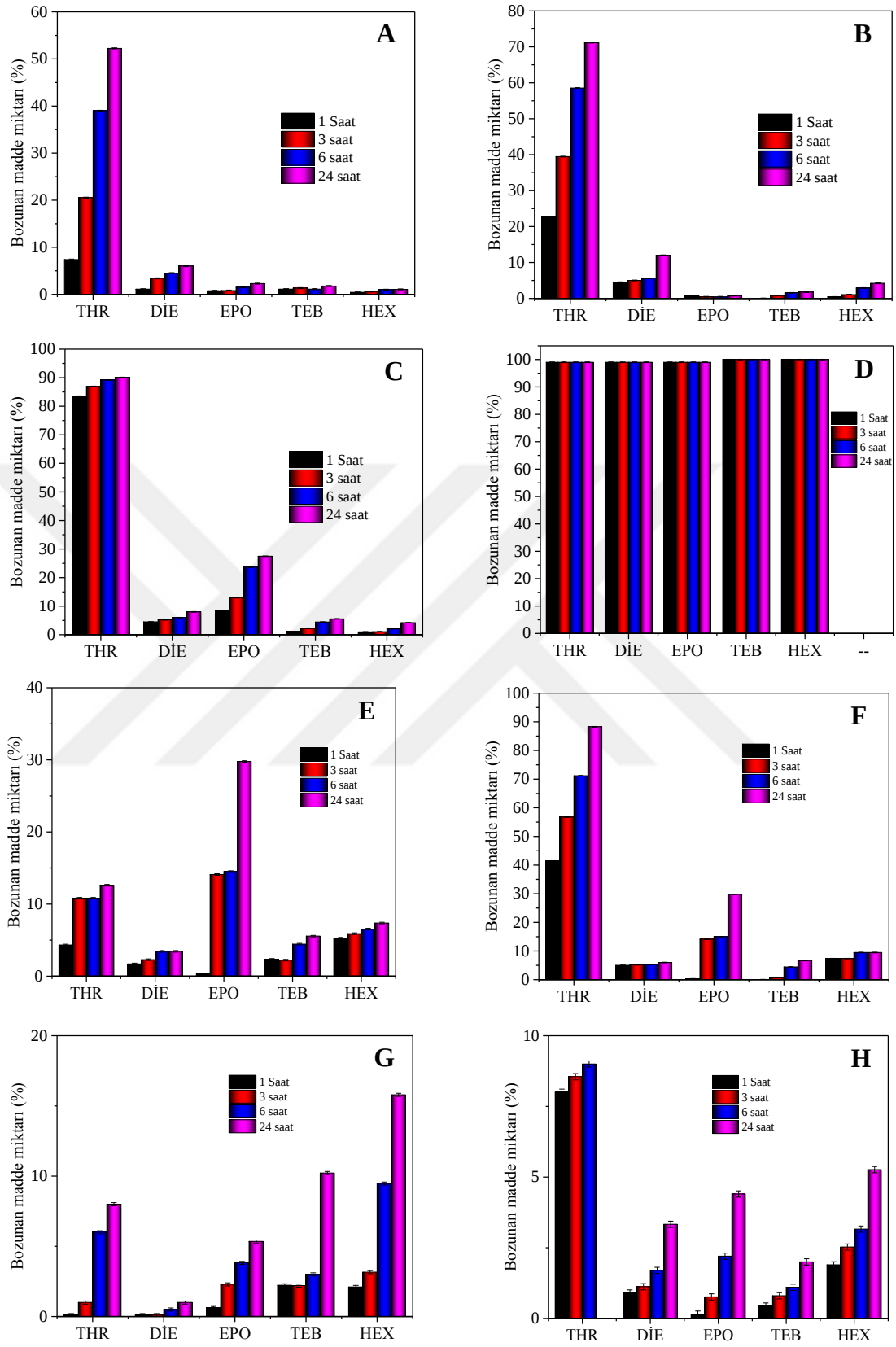
Parametre	İdrar																			
	THR				DİE				EPO				TEB				HEX			
Bilinen miktar (µg/mL)	20				20				20				20				20			
Bulunan miktar (µg/mL)	21,78				18,75				20,57				21,28				20,19			
BSS (%) *	0,31				1,64				0,35				0,88				0,90			
BH (%)	-8,9				6,25				-2,85				-6,4				-0,95			
İlave edilen miktar (µg/mL)	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Bulunan miktar (µg/mL)	5,06	9,89	21,2	30,99	5,31	9,44	20,1	29,6	4,9	9,43	19,0	29,3	5,14	10,59	19,8	30,28	5,13	10,62	21,7	32,2
Geri kazanım (%)	101,2	98,92	104,8	103,31	104,5	95,8	100,5	98,71	98,5	95,7	95,0	97,77	102,8	104,5	99,3	100,92	102,5	104,7	104,8	104,1
Geri kazanıma ait BSS (%) *	0,79	1,49	0,53	0,46	1,79	1,19	0,43	0,21	1,20	0,70	0,62	0,36	1,58	0,67	0,88	0,32	1,52	1,16	0,60	0,69
Geri kazanıma ait BH (%)	-1,26	1,08	-6,29	-3,31	-6,11	5,61	-0,55	1,29	1,45	5,74	4,91	2,23	-2,88	-5,95	0,66	-0,92	-2,54	-6,24	-8,56	-7,44

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır.

Korelasyon katsayılarının 1'e yakın olması, % geri kazanımların % 100 e yakın olması ve % BSS nin %2 civarında olması yöntemin valide edildiğini göstermiştir.

3.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmaları

Kalibrasyon çalışmalarından sonra yöntem seçiciliğinin ortaya çıkması amacıyla hızlandırılmış bozundurma deneylerine geçilmiştir. Bozundurma deneyleri esnasında pestisitler belirli koşullara tabi tutulmuştur. Bu şartlar her biri 1, 3, 6 ve 24 saat olmak üzere; %0,3 ve %3' lük H₂O₂ ile oksidasyonu, 0,1 M ve 1 M NaOH ile baz hidrolizi, 0,1 M ve 1 M HCl ile asit hidrolizi, 254 nm UV ışık altında bekletilmesi ve etüv içerisinde 100 °C' de bekletilmesini kapsamaktadır. Sonuçlar bozundurulmamış pestisitler ile kıyaslanarak yüzde bozunmaları hesaplanmıştır. Çalışmaların sonucu olarak olası bozunma ürünleri 1 M NaOH şartı altında bozulduğu için pestisitlerin analizi mümkün değildir. Ayrıca 0.1 M HCl, 1 M HCl, % 3 H₂O₂ ve 0.1 M NaOH şartları altında ise sadece THR bozunmuştur, THR haricindeki diğer pestisitlerin analizinin mümkün olduğu görülmüştür. UV ve etüv şartları altında ise herhangi bir pestisit bozunmamış ve pestisitlerin analizinin mümkün olduğu görülmüştür.



Şekil 3.13. Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait sonuçlar; 0.1 M HCl (A), 1 M HCl (B), 0.1 M NaOH (C), 1 M NaOH (D), % 0.3 H₂O₂ (E), % 3 H₂O₂ (F), UV (G), Etüv (H).

3.4. Pestisitlerin DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

Bilindiği üzere tüm ülkelerde pestisitlerin kullanımı oldukça yaygın bir hal almış durumda ve yanlış pestisit kullanımları sonucunda maalesef ülkemizde ve diğer ülkelerde ölüm vakaları ciddi oranda artmıştır. Yanlış pestisit kullanılması, pestisit kullanıldıktan sonra yeterli süre beklemeden hasat yapılması ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda DNA'ya ciddi oranda hasar vermekte ve hatta ölümler gözükmemektedir, bu yüzden pestisit DNA etkileşimi günümüzde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Pestisitler hem yenilen meyve ve sebzenin üzerinde kalıntı şeklinde kalabileceği gibi hem de toprağa karışıp, topraktan da su vasıtasıyla insan vücuduna geçebilmektedir. Pestisitlerin analizinden sonra, pestisitlerin komet testi ile DNA'da meydana getirdikleri hasarlar araştırılmıştır. DNA-pestisit kompleksine ait alıkonma zamanı ve pik alanlarının zamana göre herhangi bir değişimin olup olmadığını belirlemek için fosfat tamponu ortamında her bir pestisit için üzerlerine artan derişimlerde DNA eklemesi yapılmıştır. Ekleme sırasında ve sonrasında 2., 4., 6., 8. ve 10. dakikalarda yapılan ölçümlerde pik alanlarında herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. DNA-pestisit kompleksinin oluşumu için gerekli derişim aralığının belirlenmesi için toplam hacim sabit bırakılarak pestisitlerin ve DNA'nın birbirlerine göre derişimleri değiştirilmiş ve bütün durumlar için uygun kromatografik koşullar altında 5 tekrarlı olmak üzere sisteme enjekte edilmiştir. DNA-pestisit etkileşimlerinin incelenmesi için kromatografik şartlar ise aşağıda sunulmuştur. Luna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) kolon, hareketli faz: 50 mM, pH 7 asetat tamponu (A) ve asetonitril (B) içermekte ve zamana bağlı gradiyent elüsyon:

0-2 dk: %10 B

2-3 dk: %20 B

3-5 dk: %20-%50 B

5-10 dk: %50-%90 B

10-15 dk: %90-%10 B

Akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 25 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir.

Pestisitlerin DNA ile etkileşim derecesini gösteren bağlanma sabiti (K) değeri, Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G}} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G}} \times \frac{1}{K[DNA]}$$

K=Bağlanma/birleşme sabiti

A₀=Maddenin pik alanı

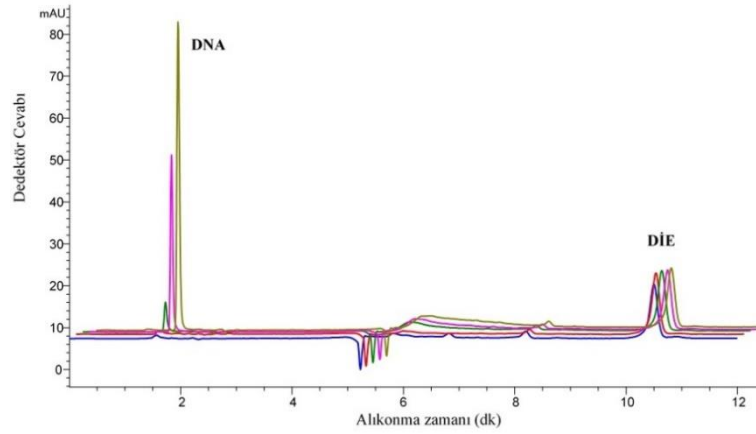
A=DNA-madde kompleksinin pik alanı

ε_G=Maddenin absorpsiyon katsayısı

ε_{H-G}=DNA-madde kompleksinin absorpsiyon katsayısı

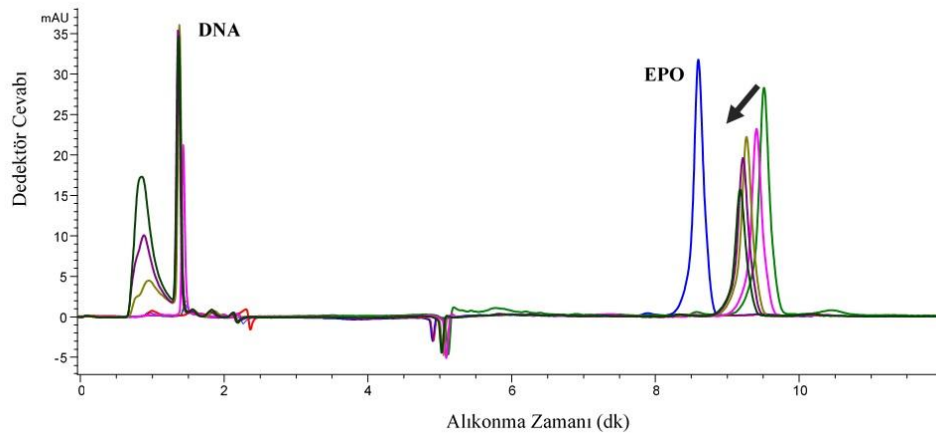
K değerinin hesaplama işleminin yapılması için DNA-pestisit kompleksinin artan DNA derişimine karşı pik alanları ölçülmüştür. 1 / [DNA] değerine karşı A₀/(A₀ -A) değerleri grafiğe geçirilmiştir. Çizilen doğrusal grafiğin y eksenini kestiği nokta ε_G/(ε_{H-G}-ε_G) değerini, eğimi ise [ε_G/(ε_{H-G})]/K değerini vermektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen K değeri pestisit DNA'ya bağlanma sabitini vermektedir. Bu eşitlikte DNA derişimi molar olarak kullanılmaktadır.

DNA-DİE kompleksinin oluşumunu saptamak amacıyla 30 µg/mL DİE çözeltisi üzerine artan derişimlerde (20-60 µg/mL) DNA eklenmesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 3.14. 'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, DİE üzerine DNA eklenmesiyle DİE'ye ait pik alanlarında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu durum DNA ve DİE arasında kompleks oluşumunun olmadığını göstermektedir.



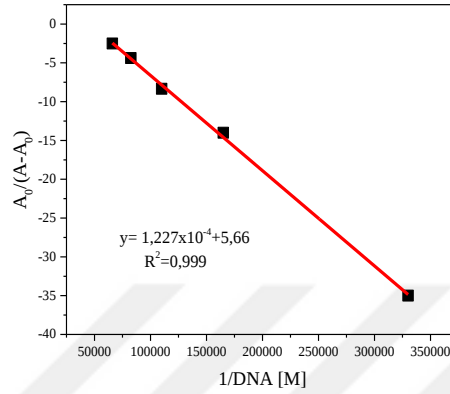
Şekil 3.14. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 µg/mL DİE üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.

DNA-EPO kompleksinin oluşumunu belirlemek için 30 µg/mL EPO çözeltisi üzerine artan derişimlerde (10-50 µg/mL) DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar Şekil 3.15. 'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, EPO'nun alıkonma zamanı DNA ilavesi ile değişirken artan DNA derişimlerinde pik alanı hem azalmış hem de alıkonma zamanı değişmiştir. Bu durum DNA ve EPO arasında kompleks oluşumunun olduğunu göstermektedir.



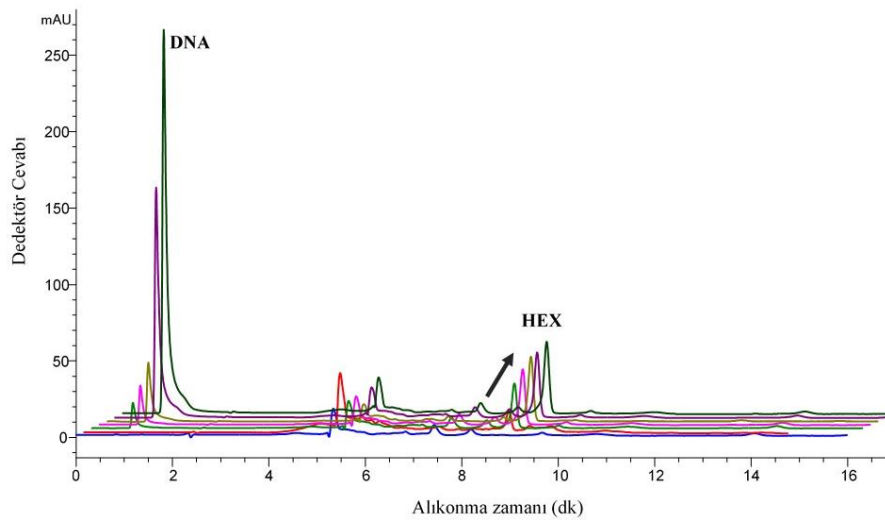
Şekil 3.15. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 µg/mL EPO üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.

pH 7,4 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan yararlanarak, EPO'nun pik alanındaki değişimden $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.16.) ve sonrasında Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak EPO'nun DNA'ya bağlanma sabiti $5,66 \times 10^4$ olarak hesaplanmıştır.



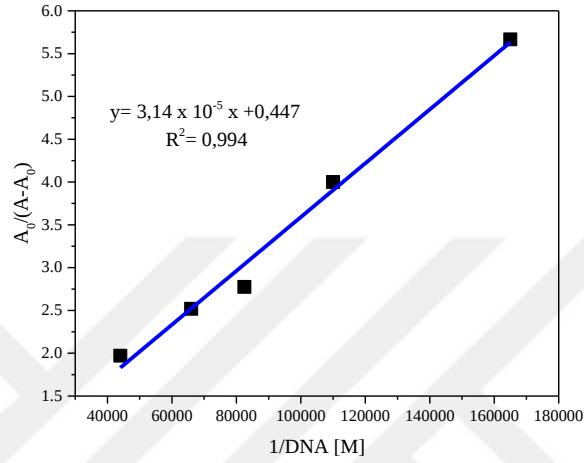
Şekil 3.16. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-EPO etkileşimi için $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ grafiği.

DNA-HEX kompleksinin oluşumunu belirlemek için 30 $\mu\text{g/mL}$ HEX çözeltisi üzerine artan derişimlerde (10-50 $\mu\text{g/mL}$) DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar Şekil 3.17. 'da sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, HEX'in pik alanı artan DNA derişimlerinde artmıştır. Bu durum DNA ve HEX arasında kompleks oluşumunun olduğunu göstermektedir.



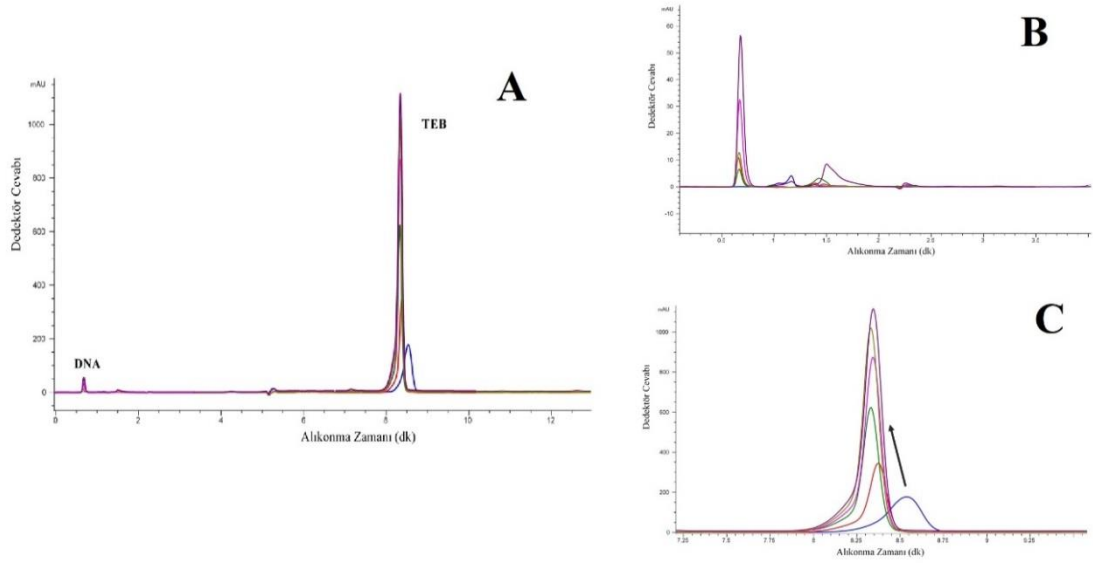
Şekil 3.17. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 30 $\mu\text{g/mL}$ HEX üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar.

pH 7,4 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan yararlanarak, HEX'in pik alanındaki değişimden $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.18.) ve sonrasında Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak HEX'in DNA'ya bağlanma sabiti $1,50 \times 10^4$ olarak hesaplanmıştır.



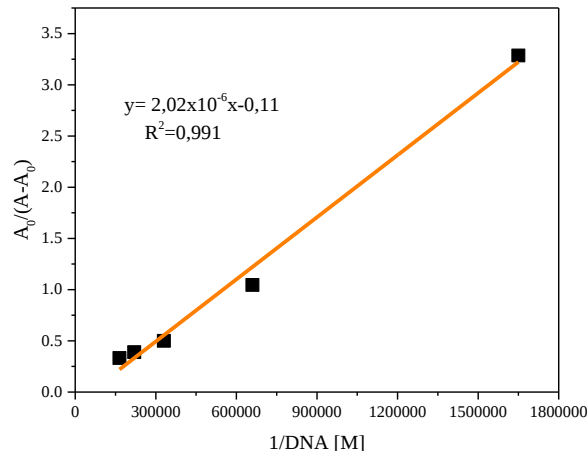
Şekil 3.18. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-HEX etkileşimi için $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ grafiği.

DNA-TEB kompleksinin oluşumunu belirlemek için 20 $\mu\text{g/mL}$ TEB çözeltisi üzerine artan derişimlerde (2,5-20 $\mu\text{g/mL}$) DNA eklenmesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 3.19. 'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, TEB'in pik alanı artan DNA derişimlerinde artmıştır. Bu durum DNA ve TEB arasında kompleks oluşumunun olduğunu göstermektedir.



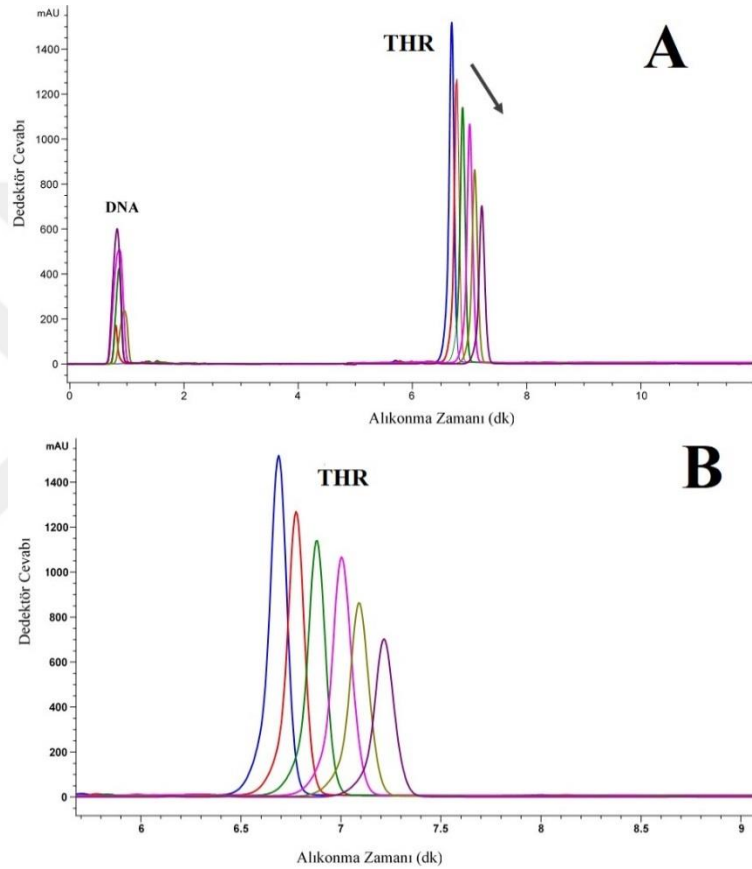
Şekil 3.19. A) pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 20 µg/mL TEB üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar, B) DNA'ya ait kromatogramların yakından görünümü, C) TEB'e ait kromatogramların yakından görünümü.

pH 7,4 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan yararlanarak, TEB'in pik alanındaki değişimden $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.20.) ve sonrasında Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak TEB'in DNA'ya bağlanma sabiti $5,62 \times 10^4$ olarak hesaplanmıştır.



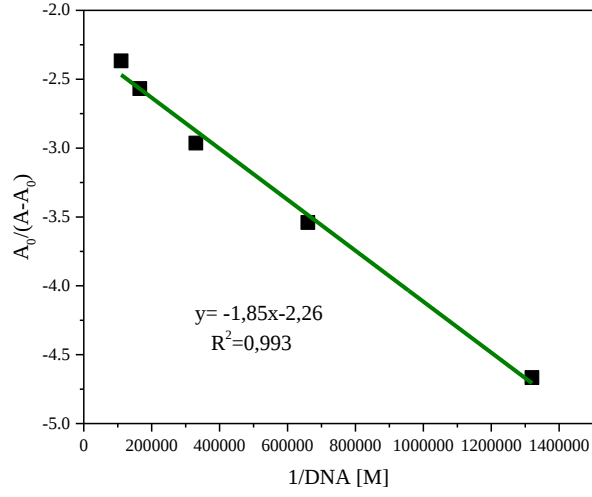
Şekil 3.20. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-TEB etkileşimi için $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ grafiği.

DNA-THR kompleksinin oluşumunu belirlemek için 5 µg/mL THR çözeltisi üzerine artan derişimlerde (2,5-30 µg/mL) DNA eklenmesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 3.21. 'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların karşılaştırılması sonucunda, THR'nin pik alanı artan DNA derişimlerinde azalmış ve alıkonma zamanı değişmiştir. Bu durum DNA ve THR arasında kompleks oluşumunun olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.21. A) pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 5 µg/mL THR üzerine artan derişimlerde DNA ilave edilmesiyle oluşan kromatogramlar, B) THR'ye ait kromatogramların yakından görünümü.

pH 7,4 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan yararlanarak, THR'nin pik alanındaki değişimden $1/[DNA]$ 'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 3.22.) ve sonrasında Benesi-Hildebrand eşitliği kullanılarak THR'nin DNA'ya bağlanma sabiti $1,10 \times 10^6$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.22. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içerisinde DNA-THR etkileşimi için 1/[DNA]'ya karşı $A_0/(A-A_0)$ grafiği.

3.5. Pestisitlerin DNA Hasarının İncelenmesi ve Komet Testi Sonuçları

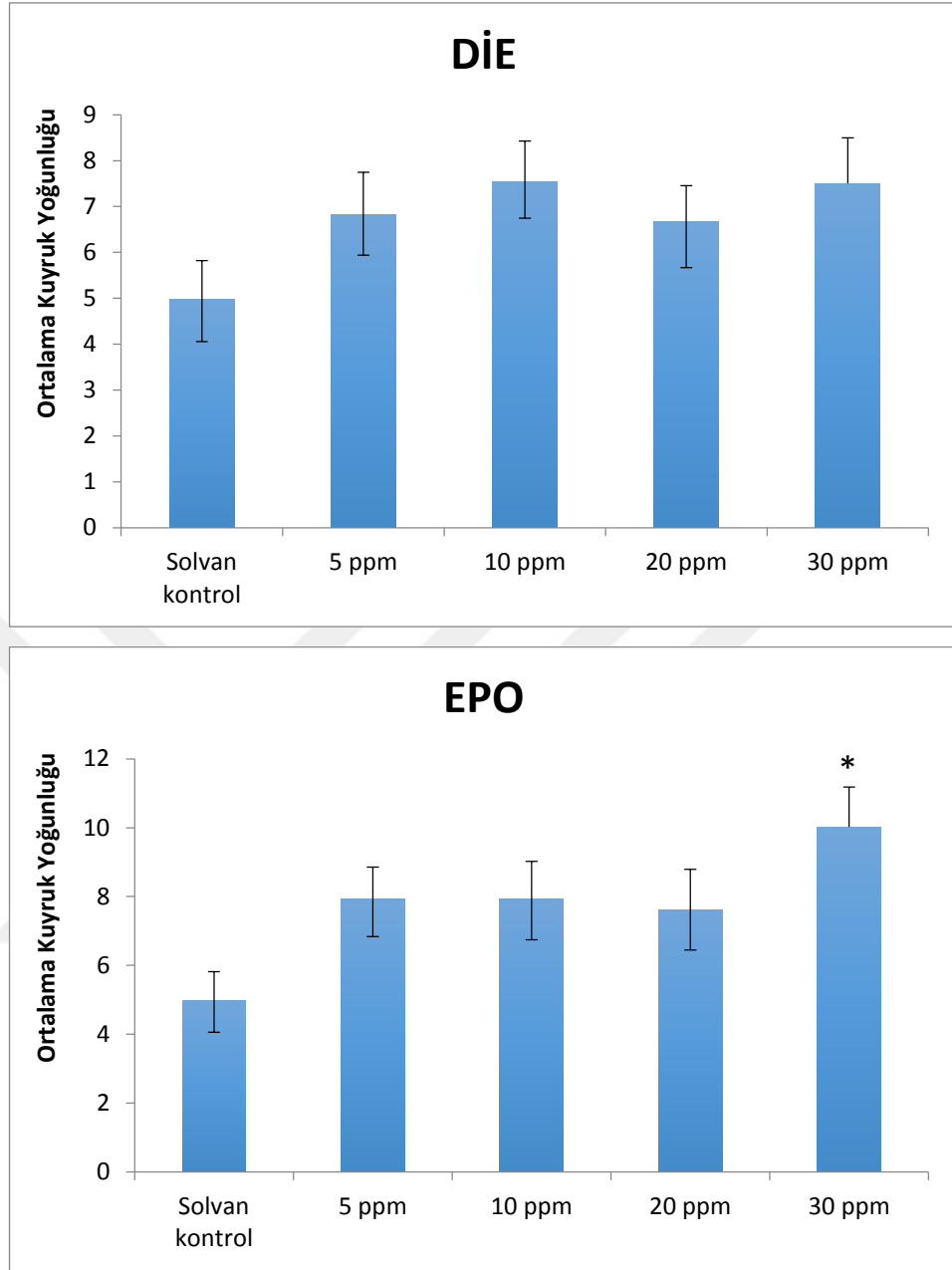
Tüm örneklerle ait dublike çalışılan 2 lamdan toplam 100 adet hücre sayılarak Ortalama Kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri standart hata ile Çizelge 3.21.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.21. Ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.

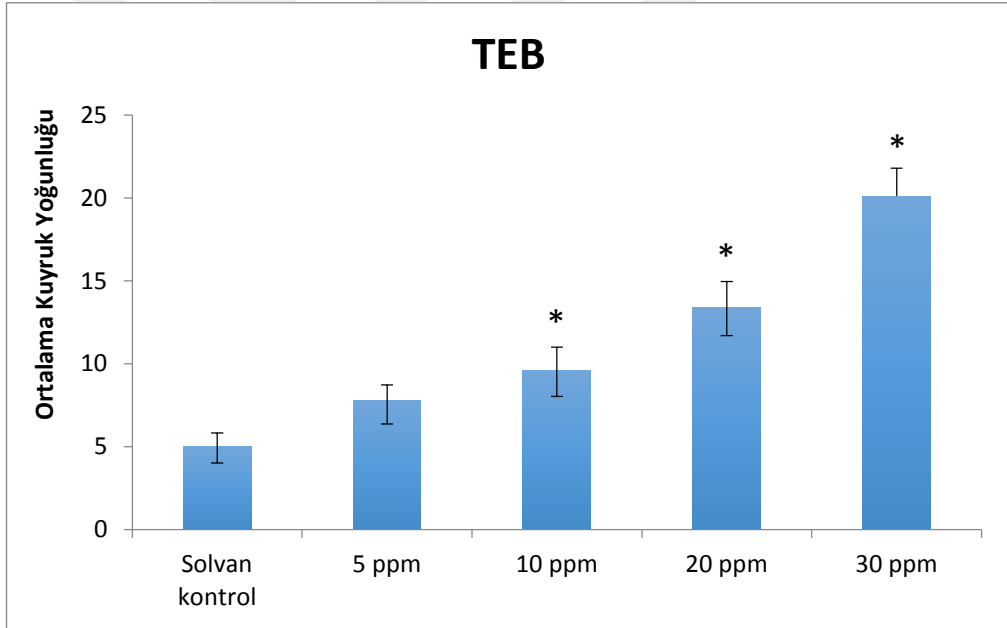
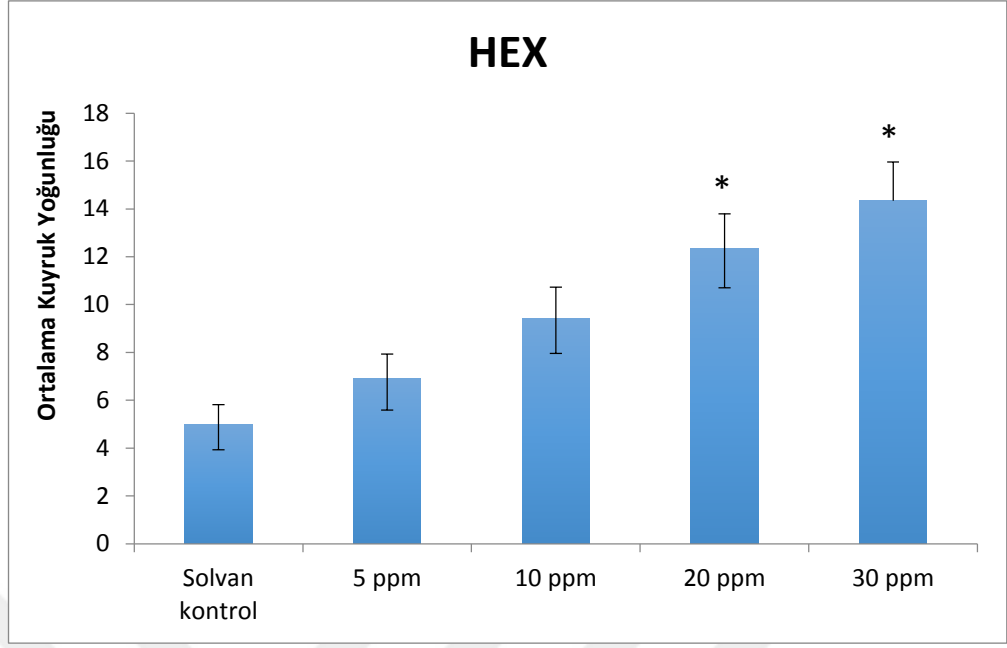
		Ortalama Kuyruk Yoğunluğu $\pm$ Standart hata (SEM)
Çözücü Kontrol (%0,1 DMSO)		4,984319 $\pm$ 0,8342
Kontrol		5,960952 $\pm$ 0,6997
Pozitif kontrol (50 μM H₂O₂)		37,76435 $\pm$ 2,1253*
DİE	5 μ g/mL	6,825532 $\pm$ 0,9243
	10 μ g/mL	7,53588 $\pm$ 0,8884
	20 μ g/mL	6,666767 $\pm$ 0,7889
	30 μ g/mL	7,503403 $\pm$ 0,9955
EPO	5 μ g/mL	7,924911 $\pm$ 0,9309
	10 μ g/mL	7,931495 $\pm$ 1,0932
	20 μ g/mL	7,603637 $\pm$ 1,1856
	30 μ g/mL	10,023 $\pm$ 1,1538*
HEX	5 μ g/mL	6,889824 $\pm$ 1,0467
	10 μ g/mL	9,434132 $\pm$ 1,2938
	20 μ g/mL	12,32297 $\pm$ 1,4739*
	30 μ g/mL	14,33909 $\pm$ 1,6246*
TEB	5 μ g/mL	7,758927 $\pm$ 0,9668
	10 μ g/mL	9,605769 $\pm$ 1,3985*
	20 μ g/mL	13,37552 $\pm$ 1,5770*
	30 μ g/mL	20,10524 $\pm$ 1,6835*
THR	0.1 μ g/mL	5,695415 $\pm$ 0,7129
	0.3 μ g/mL	7,85767 $\pm$ 1,057
	1 μ g/mL	9,046317 $\pm$ 1,2676
	3 μ g/mL	18,62996 $\pm$ 1,8849*
	5 μ g/mL	40,54712 $\pm$ 2,0908*

* Kontrol ve çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$, tek yönlü Anova

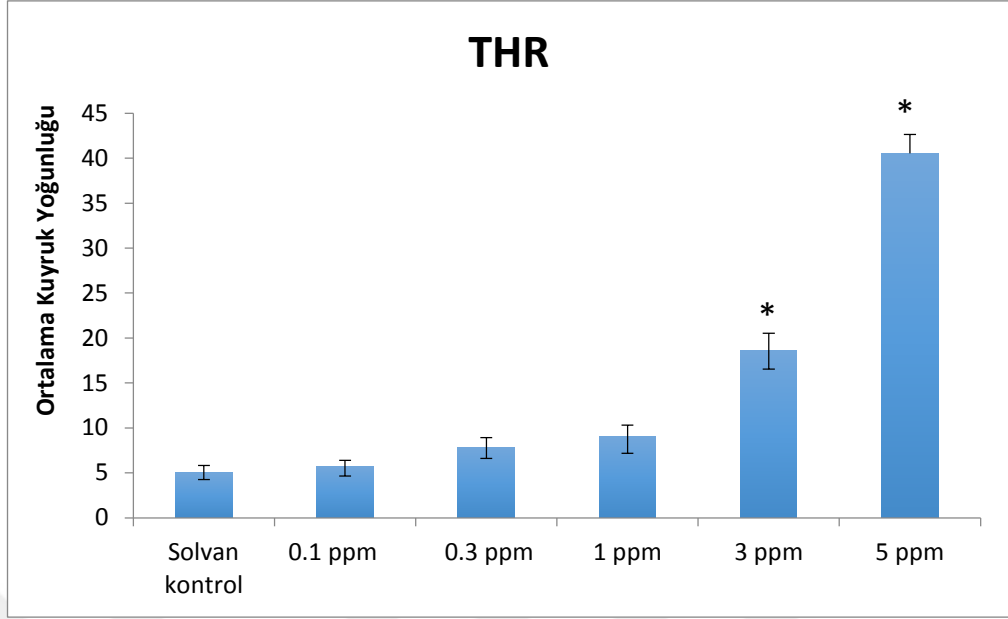
Komet testi ile bulunan ortalama kuyruk yoğunluğu değerlerine göre test edilen pestisitlerin neden oldukları DNA hasarları Şekil 3.23'deki grafiklerde sunulmuştur.



Şekil 3.23. Pestisitlerin neden oldukları DNA hasarlarına ait sonuçlar.



Şekil 3.23.Devam Pestisitlerin neden oldukları DNA hasarlarına ait sonuçlar.



Şekil 3.23.Devam Pesticitlerin neden oldukları DNA hasarlarına ait sonuçlar.

Komet testinden elde edilecek sonuçlarda DNA'daki kuyruk yoğunluğunu, kontrol ve test kimyasalları gruplarında tek yönlü anova kullanılarak yapılmıştır. Post-hoc analizler (gruplar arasındaki fark) Fischer LSD (Fisher's Least Significant Difference test. En az önemli fark testi) testi ile yapıldı. İstatiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alındı. Her bir örnek için dublike çalışılarak tüm 100 sayıma ait değerler istatistiksel (SPSS Windows Release 20,0 kullanılarak) olarak değerlendirilmiştir.

3T3 hücrelerine 5, 10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde uygulanan THR, DiE, TEB, HEX ve EPO komet testi ile DNA hasarını indükleyip indüklemedikleri araştırılmıştır. İlk çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda THR test edilen 5 $\mu\text{g/mL}$ derişimde oldukça fazla DNA hasarına neden olmuştur, 10 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde ghost hücreler (DNA'nın dağılıp tamamen bulut şeklinde gözlenmesi) nedeniyle mikroskopta software ile sayım yapılamadığı, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde ise sitotoksik etkili olduğu görüldüğünden; THR için 0,1, 0,3, 1 ve 3 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözelti hazırlanarak komet testi tekrar edilmiştir.

Elde edilen verilere bakılarak, THR'nin 0,1 ve 0,3 µg/mL'de DNA hasarını artırmadığı, 1 µg/mL derişimde DNA hasarını artırdığı ama bu artış miktarının istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulundu. 3 ve 5 µg/mL'lik derişimlerde ise THR DNA hasarını anlamlı ($p<0,05$) olarak artırmaktadır. Hatta 5 µg/mL derişimde pozitif kontrol olarak kullanılan 50 µM H₂O₂'den daha fazla kuyruk yoğunluğu olduğu bulundu fakat istatistiksel olarak anlamsızdır ($P>0,05$). DİE test edilen 5, 10, 20 ve µg/mL derişimlerde kuyruk yoğunluğu değerlerini artırmamış, kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarını indüklememiştir. TEB 10, 20 ve 30 µg/mL derişimlerinde DNA hasarını anlamlı olarak artırmaktadır ($p<0,05$). HEX 20 ve 30 µg/mL derişimlerinde DNA hasarını anlamlı olarak artırmaktadır ($p<0,05$). EPO ise test edilen 5, 10, 20 ve 30 µg/mL derişimlerinden sadece 30 µg/mL'de DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür ($p<0,05$).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada mantarlara karşı kullanılan pestisitlerden Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın ters faz sıvı kromatografisi yöntemi ile eş zamanlı analizleri için gerekli parametreler belirlenmiş ve belirlenen parametreler kullanılarak eş zamanlı analizler yapıldı. Bu analizler sonucunda farklı kolon, farklı hareketli faz kompozisyonları, değişik molaritelerde tampon çözelti, akış hızı ve sıcaklık parametreleri kullanılarak en iyi şartlar saptanmıştır.

Alışılmış kolonlar ile yeni nesil kolonlar kıyas edildiğinde yeni nesil kolonlar daha kısa sürede daha keskin pik şekilleri verir, hareketli faz pH değişimlerinden sonra daha hızlı kolon şartlanmasını sağlar, çözücü sarfiyatını azaltıp çevreye daha duyarlıdır ve daha hassas tayinlere olanak sağlarlar. Luna C18 kolon, ligandların silika yüzeyine bağlı olduğu bir oktadesil silan olup, büyük metilen seçiciliği sunan çok hidrofobik durağan fazlı bir C18 ters faz kolonudur. Luna C18 kolon fazının polar olmayan uç kaplaması, silanol etkileşimlerini neredeyse ortadan kaldırır. Böylece, daha istikrarlı bir akış sağlarlar, daha az gürültü, daha fazla kararlı alıkonma zamanı ve daha fazla tekrar edilebilen sonuçları ortaya çıkarabilmektedirler. Bu sayede ayırım gücünde herhangi bir kayıp olmaksızın yüksek hızlı analizler gerçekleştirilebilir.

Yaptığımız çalışmalarda, daha önce yapılmış olan çalışmalara göre analiz süresi oldukça kısalmıştır. 5 farklı pestisit 6,5 dakika gibi kısa bir sürede herhangi bir girişim etkisi olmadan analiz edilebilmesi, geliştirilen yöntemin üstünlüğü olarak öne çıkmaktadır. Ayırım gücü bakımından incelendiğinde ise önceden yapılan çalışmalara göre çok daha iyi bir ayırım yapıldığını görmekteyiz, seçicilik açısından bakıldığında ise çok iyi bir seçicilik ile çalışmamızı sürdürdüğümüz görülmüştür ve hatta çözücü sarfiyatını azalttığımızdan dolayı yaptığımız bu çalışmamız yeşil kimya alanında da ciddi anlamda öne çıkmaktadır.

Elde edilen veriler doğrultusunda, Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın aynı anda analizi için kesin, duyarlı, hızlı, doğru ve kolay analiz yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem zirai ilaç, insan biyolojik örnekleri, elma, toprak ve farklı su numunelerine başarıyla uygulanmıştır.

İnsan sağlığına doğrudan etkileri bulunan Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın DNA ile etkileşimlerinin ilk kez kromatografik olarak incelenmesi ve DNA hasarının araştırılması da bu tez çalışmasının literatüre katkısıdır. Yanlış pestisit kullanılması, pestisit kullanıldıktan sonra yeterli süre beklemeden hasat yapılması ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda DNA'ya ciddi oranda hasar vermekte ve hatta ölümler gözükmemektedir, bu yüzden pestisit DNA etkileşimi günümüzde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde, DNA-madde etkileşimleri için çoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılsa da geliştirilen kromatografik yöntemin sunmuş olduğu doğal özgüllük ve duyarlılığı, kromatografik yöntemlerin bu alanda kullanılabileceğinin bir göstergesidir.

Bu pestisitlerin DNA ile etkileşimleri ve DNA hasarları incelendiğinde, Dietofenkarb'ın DNA'ya afinitesinin en az olduğu, Tiram'ın ise DNA'ya en yüksek oranda bağlanan ve en fazla zarar veren pestisit olduğu bulunmuştur. Epoksikonazol, Hekzakonazol ve Tebukonazol ise DNA'ya 10^4 mertebesinde bağlanmaktadır. Sonuç olarak, çalışılan 5 pestisit kimyasal yapıları da değerlendirildiğinde, kükürt ve azot türevi içeren farklı bileşiklerin de DNA'ya karşı afinite ve hasarlarının yüksek olabileceği söylenebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kromatografik yöntemler, eczacılık, gıda, tarım ve klinik çalışmalarda bileşiklerin düşük derişimlerde analizlerinin yapılabilir olması, numunelerin kısa sürede ve kolay hazırlanabilir olması, analiz süresinin kısa olması, bileşiklerde bulunan katkı maddelerinin analiz sonucunu etkilememesi nedeni ile sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca pahalı ve az miktardaki pestisitlerin analizinde de çok az miktarda numunenin yeterli olması kromatografik yöntemlerin önemli bir avantajıdır. Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb pestisitlerinin eş zamanlı olarak zirai ilaç, çeşme suyu, atık su, kuyu suyu, elma, insan idrar ve ticari olarak satılan serum numunelerinden miktar tayinine yönelik gerçekleştirilen ilk defa geliştirilen bu yöntem ve bu pestisitlerin DNA ile bağlanmasının kromatografik yöntemlerle incelenmesi ayrıca DNA hasarlarının açıklanması tez çalışmalarının literatüre katkısıdır.

5 farklı pestisitın 6,5 dakika gibi kısa bir sürede herhangi bir girişim olmadan analiz edilmesi ayrıca DNA-pestisit etkileşimlerini araştırmak için genellikle spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılıyor olsada, hassasiyetleri sayesinde kromatografik yöntemlerin de kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

ÖZET

Bazı Pestisitlerin Ayırma Yöntemleri ile Analizi, Pestisit-DNA Etkileşimin İncelenmesi ve DNA Hasarının Araştırılması

Bu tezin amacı mantarlara karşı kullanılan pestisitlerden Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın ters faz sıvı kromatografisi tekniği ile ilk kez eş zamanlı bir şekilde tayin edebilmektir. Bunun için, bir çok sabit faz deneyerek maddelerin ayrımları için ideal olan sabit faz bulunmuştur. Ayrıca, akış hızı etkileri, farklı derişimlerde tampon çözeltileri, sıcaklıkların etkileri, çeşitli hareketli faz kompozisyonları gibi çalışma koşulları da optimize edilmiştir. LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) kolon ve metanol: tampon çözelti (5 mM, amonyum asetat), 77,5:22,5 (h/h) hareketli faz kompozisyonunu kullanarak ideal kromatografik ayırım yapılmıştır. Analizler 220 nm dalga boyunda, 1mL/dk akış hızında ve 25 °C sıcaklıkta yapılmıştır. Validasyon çalışmaları neticesinde çalışılan tüm pestisitler çözücü, elma suyu, toprak, içme suyu, kuyu suyu, atık su, sentetik serum, idrar numunelerinde 0,5-100 µg/mL aralığında ($R^2 \geq 0,990$) doğrusallık sergilemiştir. Her matriksde elde edilen tayin alt sınırları yöntemin hassasiyetini gösterirken, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları sonucunda %2'den daha düşük bulunan bağıl standart sapma değerleri de yöntemin kesinliğini göstermiştir. Ayrıca geri kazanım çalışmaları sonunda %93-107 arasında değişen geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunu göstermiştir. Önerilen hızlı ve duyarlı ters faz sıvı kromatografisi yöntemi Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın eş zamanlı miktar tayinleri için oldukça basit numune hazırlama prosedürü ile çevre ve gıda kalite kontrol laboratuvarlarında kolaylıkla uygulama imkanı sunmaktadır.

Tezin ikinci bölümünde ise Tiram, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Tebukonazol ve Dietofenkarb'ın DNA ile etkileşimlerinin kromatografik olarak incelenmesi ve DNA hasarı araştırılmıştır. Yanlış pestisit kullanılması, pestisit kullanıldıktan sonra yeterli süre beklemeden hasat yapılması ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda DNA'ya ciddi oranda hasar vermekte ve hatta ölümler gözükmemektedir, bu yüzden pestisit DNA etkileşimi günümüzde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla, pestisitlerin derişimleri sabit tutularak her birine artan derişimlerde DNA ilavesi yapılmış ve pestisitlere ait pik alan değerleri incelenerek bağlanma katsayıları hesaplanmıştır. Dietofenkarb ile DNA arasında herhangi bir etkileşim gözlenmezken, Epoksikonazol, Hekzakonazol ve Tebukonazol için bağlanma katsayıları sırasıyla, $5,66 \times 10^4$, $1,50 \times 10^4$ ve $5,62 \times 10^4$ olarak bulunmuştur. İncelenen pestisitlerden Tiram, $1,10 \times 10^6$ bağlanma katsayısı ile DNA'ya karşı en yüksek afiniteyi sergilemiştir. Bu pestisitlerin DNA hasarları incelendiği zaman, Tiram 3 ve 5 µg/mL'lik derişimlerde DNA hasarını anlamlı olarak artırmaktadır. Dietofenkarb test edilen 5, 10, 20 ve

30 µg/mL derişimlerde kuyruk yoğunluğu değerlerini artırmamış, kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarını indüklememiştir. Tebukonazol, 10, 20 ve 30 µg/mL derişimlerde DNA hasarını anlamlı olarak artırmaktadır. Hekzakonazol, 20 ve 30 µg/mL derişimlerde DNA hasarını anlamlı olarak artırmaktadır. Son olarak, Epoksikonazol ise, sadece 30 µg/mL'de DNA hasarını kontrole göre anlamlı olarak artırmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Dietofenkarb, Epoksikonazol, Hekzakonazol, Pestisit, Tebukonazol, Tiram, YPSK.

SUMMARY

Analysis of Some Pesticides by Separation Methods, Investigation of Pesticide-DNA Interaction and Investigation of DNA Damage

The aim of this thesis is to determine the pesticides used against fungi such as Tiram, Epoxiconazole, Hexaconazole, Tebuconazole and Dietofencarb simultaneously for the first time with the reverse phase liquid chromatography technique. For this, by trying many stationary phases, the ideal stationary phase for the separation of substances has been found. In addition, operating conditions such as flow rate effects, buffer solutions at different concentrations, effects of temperatures, various mobile phase compositions are also optimized. Ideal chromatographic separation was made using a LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) column and methanol: buffer solution (5 mM, ammonium acetate), 77,5:22,5 (v/v) mobile phase composition. Analyzes were performed at a wavelength of 220 nm, a flow rate of 1 mL/min, and a temperature of 25 °C. As a result of validation studies, all pesticides studied showed linearity in the range of 0,5-100 μ g/mL ($R^2 \geq 0,990$) in solvent, apple juice, soil, drinking water, well water, waste water, synthetic serum, urine samples. While the lower limits of determination obtained in each matrix showed the sensitivity of the method, the relative standard deviation values found to be less than 2% as a result of intra-day and inter-day repeatability studies also showed the precision of the method. In addition, recovery values varying between 93-107% at the end of the recovery studies showed the accuracy of the method. The proposed fast and sensitive reversed phase liquid chromatography method offers easy application in environmental and food quality control laboratories with a very simple sample preparation procedure for the simultaneous determination of Tiram, Epoxiconazole, Hexaconazole, Tebuconazole and Dietofencarb.

In the second part of the thesis, chromatographic examination of the interactions of Thiram, Epoxiconazole, Hexaconazole, Tebuconazole and Dietofencarb with DNA and DNA damage were investigated. The use of wrong pesticides, harvesting without waiting for a sufficient time after pesticide use and unconscious pesticide use cause serious damage to DNA and even deaths appear, so pesticide-DNA interaction has a very important place today. For this purpose, increasing concentrations of DNA were added to each of the pesticides by keeping the concentrations constant, and the binding coefficients were calculated by examining the peak area values of the pesticides. While no interaction was observed between dietofencarb and DNA, the binding coefficients for Epoxiconazole, Hexaconazole and Tebuconazole were found to be 5.66×10^4 , 1.50×10^4 and 5.62×10^4 , respectively. Among the pesticides examined, Tiram exhibited the highest affinity for DNA with a binding coefficient of 1.10×10^6 . When DNA damage of these pesticides is examined, Tiram significantly increases DNA damage at 3 and 5 μ g/mL concentrations. Dietofencarb did not increase tail density values at the 5, 10, 20 and μ g/mL concentrations tested and did not induce DNA damage compared to control. Tebuconazole significantly increases DNA damage at 10, 20 and 30 μ g/mL concentrations. Hexaconazole significantly increases DNA damage at 20 and 30 μ g/mL concentrations. Finally, Epoxiconazole significantly increases DNA damage at only 30 μ g/mL compared to control.

Keywords: Dietofencarb, Epoxiconazole, Hexaconazole, HPLC, Pesticides, Tebuconazole, Tiram.

KAYNAKLAR

- ABID H, DA-WEN S, HONGBIN P (2020). Bimetallic core shelled nanoparticles (Au@AgNPs) for rapid detection of thiram and dicyandiamide contaminants in liquid milk using SERS. *Food Chem.* **317**: 126429
- ABUBAKAR Y, TIJJANI H, EGBUNA C, ADETUNJI CO, KALA S, KRYEZIU TL, PATRICK-IWUANYANWU KC (2019). Pesticides, history, and classification. *Nat. Remedies Pest, Dis. Weed Control* **2019**: 29–42.
- ANDRUCH V, KOCUROVA L, BALOGH IS, ŠKRLIKOVA J (2012). Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid-liquid microextraction with UV-vis spectrophotometry and related detection techniques. *Microchem. J.* **102**: 1–10.
- ASHOK KM, WERNER F (2008). Capillary Electrophoretic Determination of Tetramethylthiuram Disulphide (Thiram). *Analytical letters* **33**: 2055-2064.
- BAJKACZ S (2020). Liquid chromatography in food analysis. *Chemical Analysis of Food* **2020**: 391-455.
- CAMPANALE C, MASSARELLI C, LOSACCO D, BISACCIA D, TRIOZZI M, URICCHIO VF (2021). The monitoring of Pesticides in water matrices and the analytical criticalities: a review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **144**: 116423.
- CASTILLA-FERNANDEZ D, MORENO-GONZALEZ D, GILBERT-LOPEZ B, GARCIA-REYES JF, MOLINA-DIAZ A (2021). Worldwide survey of pesticide residues in citrus-flavored soft drinks. *Food Chem.* **365**: 130-486.
- CHAVOSHANI A, HASHEMI M, MEHDI AMIN M, AMETA SC (2020). Risks and challenges of pesticides in aquatic environments. *Micropollutants and Challenges. INC.* **2020**: 179-213.
- CRUZ JC, DE SOUZA ID, GRECCO CF, FIGUEIREDO EC, QUEIROZ MEC (2021). Recent advances in column switching high-performance liquid chromatography for bioanalysis. *Sustain. Chem. Pharm.* **21**: 100431.
- ČUŠ F, ČESNIK HB, BOLTA ŠV (2021). Pesticide residues, copper and biogenic amines in conventional and organic wines. *Food Control* **132**: 108534.
- DELINSKA K, YAVIR K, KLOSKOWSKI A (2021). Ionic liquids in extraction techniques: Determination of pesticides in food and environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **143**: 116396.

- DEMIRCIOGLU T, KAPLAN M, TEZGIN E, KOÇ OK, DURMAZEL S, UZER A, APAK R (2022). A sensitive colorimetric nanoprobe based on gold nanoparticles functionalized with thiram fungicide for determination of TNT and tetryl. *Microchemical Journal* **176**: 107251.
- DINDAR ÇK, ERKMEN C, YILDIRIM S, BOZAL-PALABIYIK B, USLU B (2021). Interaction of citalopram and escitalopram with calf Thymus DNA: A spectrofluorometric, voltammetric, and liquid chromatographic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **195**: 113891.
- ERKMEN C, KURBANOGU S, USLU B (2020). Fabrication of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-iridium oxide nanocomposite based Tyrosinase biosensor for the dual detection of catechol and azinphos methyl. *Sensors Actuators, B Chem.* **316**: 128121.
- FAN H, SMUTS J, WALSH P, HARRISON D, SCHUG KA (2015). Gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy for multiclass pesticide identification. *J. Chromatogr. A* **1389**: 120–127.
- FANG W, JING G, WANGJING Z, DONGHUI L, ZHIQIANG Z, PENG W (2020). The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *Journal of Hazardous* **394**: 122517.
- FILIBE OMS, SANTOS SAO, DOMINGUES MRM, SILVESTRE AJD, SANTOS EBH (2014). *Journal of Hazardous Materials* **279**: 125-132.
- FU Y, WANG Q, ZHANG L, LING S, JIA H, WU Y (2021). Dissipation, occurrence, and risk assessment of 12 pesticides in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **222**: 112487.
- GIACINTI G, RAYNAUD C, CAPBLANCQ S, SIMON V (2017). Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1483**: 8–19.
- GOMEZ-RAMOS MM, FERRER C, MALATO O, AGUERA A, FERNANDEZ-ALBA AR (2013). Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *J. Chromatogr. A* **1287**: 24–37.
- GREGORIO C, ADELINE ES, STEFFI R, MARC F, AUDREY J, LAURENCE M, NADIA M-C (2017). Simultaneous removal of five triazole fungicides from synthetic solutions on activated carbons and cyclodextrin-based adsorbents. *Heliyon* **3**: e00380.

- GROTTI M, TEROL A, TODOLI JL (2014). Speciation analysis by small-bore HPLC coupled to ICP-MS. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **61**: 92–106.
- GUANGYANG L, MINGSHUO T, MENG L, WEIYE S, LINGYUN L, YUHANG G, TENGFEI L, DONGHUI X (2021). Preparation of magnetic MOFs for use as a solid-phase extraction absorbent for rapid adsorption of triazole pesticide residues in fruits juices and vegetables. *Journal of Chromatography* **1166**: 122500.
- HIGH POF, Thomas EC (2020). High-performance liquid chromatography. *Purification Characterization of Secondary Metabolites* **2020**: 49–58.
- HORNER NS, BEAUCHEMIN D (2013). The effect of cooking and washing rice on the bio-accessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method. *Anal. Chim. Acta* **758**, 28–35.
- ISLAM AKMM, NOH HH, RO JH, KIM D, OH MS, SON K, KWON H (2021). Optimization and validation of a method for the determination of acidic pesticides in cabbage and spinach by modifying QuEChERS procedure and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1173**: 122667.
- JIAJI Z, QUANSHENG C, FELIX YHK, MINGXIU Y, QIN O, HUI J (2017). Highly sensitive and label-free determination of thiram residue using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) coupled with paper-based microfluidic. *Analytical Methods* **9**: 6186-6193.
- JUNGBAUER A, HAHN R (2009). Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography, 1st ed, *Methods in Enzymology* **463**: 1-851.
- KAMBOH MA, ARAIN SS, JATOI AH, SHERINO B, ALGARNI TS, AL-ONAZI WA, AL-MOHAIMEED AM, REZANIA S (2021). Green sporopollenin supported cyanocalixarene based magnetic adsorbent for pesticides removal from water: Kinetic and equilibrium studies. *Environ. Res.* **201**: 111588.
- KAPKA-SKRZYPCZAK L, CZAJKA M, SAWICKI K, MATYSIAK-KUCHAREK M, GABELOVA A, SRAMKOVA M, BARTYZEL-LECHFOROWICZ H, KRUSZEWSKI M (2019). Assessment of DNA damage in Polish children environmentally exposed to pesticides. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **843**: 52–56.
- KAUR K, KAUR R (2021). Modulation of DNA damage by XPF, XPG and ERCC1 gene polymorphisms in pesticide-exposed agricultural workers of Punjab, North-West India. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **861–862**: 503302.

- LOZANO-SANCHEZ J, BORRAS-LINARES I, SASS-KISS A, SEGURA-CARRETERO A (2018). Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Modern Techniques for Food Authentication* 2nd Ed. 459-529.
- LUCY CA (2003). Evolution of ion-exchange: From Moses to the Manhattan Project to Modern Times. *J. Chromatogr. A* **1000**: 711–724.
- MAGGI F, TANG FHM, BLACK AJ, MARKS GB, MCBRATNEY A (2021). The pesticide health risk index- An application to the world's countries. *Sci. Total Environ.* **801**: 149731.
- MARÇAL R, PACHECO M, GUILHERME S (2020). DNA of crayfish spermatozoa as a target of waterborne pesticides – An ex vivo approach as a tool to short-term spermotoxicity screening. *J. Hazard. Mater.* **400**: 123300.
- MASIA A, BLASCO C, PICO Y (2014). Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2**: 11–24.
- MASODI KZ, LONE SM, RASOOL RS (2021). Study of principle of chromatography. *Adv. Methods Mol. Biol. Biotechnol.* **2021**: 139–141.
- MICHALKE B (2002). The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **21**: 142–153.
- MOLDOVEANU S, DAVID V (2021). Chromatography as a core step for an analytical procedure, *Modern Sample Preparation for Chromatography*. 2nd Ed. **2021**: 79-127.
- MONTES-BAYON M, DENICOLA K, CARUSO JA (2003). Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1000**: 457–476.
- MUHAMMAD N, ZIA-UL-HAQ M, ALI A, NAEEM S, INTISAR A, HAN D, CUI H, ZHU Y, ZHONG JL, RAHMAN A, WEI B (2021). Ion chromatography coupled with fluorescence/UV detector: A comprehensive review of its applications in pesticides and pharmaceutical drug analysis. *Arab. J. Chem.* **14**: 102972.
- NAJOI EL A, EFTYCHIA D, ROMAIN LB, VERONIKA S., MARIA T, JEREMIE B, PANAGIOTIS AK, LUIGI L, NADINE R, LUCIO B, FEDERICO F, MARCO T, DIMITRIOS GK, FABRICE M-L (2018). The dissipation and microbial ecotoxicity of tebuconazole and its transformation products in soil

- under standard laboratory and simulated winter conditions. *Science of the Total Environment* **637-638**: 892-906.
- NIE Q, NIE S (2019). High-performance liquid chromatography for food quality evaluation, *Evaluation Technologies for Food Quality* **2019**: 267-299.
- NIKOLA B, KERSTIN B-S, PETR S, ZUZANA B, LUCIE B, JAKUB H (2020). Adsorption of epoxiconazole and tebuconazole in twenty different agricultural soils in relation to their properties. *Chemosphere* **261**: 127637.
- NISHIYAMA A, NAKANISHI M (2021). Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet.* **2021**: 1–16.
- NOVAK RJ, LAMPMAN RL (2010). Public Health Pesticides, Third Edition. ed, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. **2010**: 231-256.
- OCHOA V, MAESTRONI B (2018). Pesticides in water, soil, and sediments. *Integr. Anal. Approaches Pestic. Manag.* **2018**: 133–147.
- OPUNI KFM, BOADU JA, AMPONSAH SK, OKAI CA (2021). High performance liquid chromatography: A versatile tool for assaying antiepileptic drugs in biological matrices. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1179**: 122750.
- PAN L, FENG X, CAO M, JING J, ZHANG H (2019). DEtermination and distribution of pesticides and antibiotics in agricultural soils from northern China. *RSC Advances* **28**: 15686-15693.
- PANKAJKUMAR R R, SUSHEEL S, LOKESH K S, VANRAJSINH H S, KG P (2019). Effect of soil amendments on persistence of hexaconazole and tebuconazole in soil and its residues in tomato. *International Journal of Chemical Studies* **8**: 1.
- PARWEEN T, JAN S (2019). Pesticides and environmental ecology, *Ecophysiology of Pesticides* **2019**: 1-38.
- PARWEEN T, JAN S (2019). Pesticide consumption and risk assessment, *Ecophysiology of Pesticides*. **2019**: 153-187.
- PEIPEI Q, JIAO W, ZHIWEI W, XUE W, XIANGYUN W, XIAHONG X, HAO X, SHANSHAN D, HU Z, QIANG W, XINQUAN W (2018). Construction of a probe-immobilized molecularly imprinted electrochemical sensor with dual signal amplification of thiol graphene and gold nanoparticles for selective detection of tebuconazole in vegetable and fruit samples. *Electrochimica Acta* **274**: 406-414.

- PHUOC L T, VO TCD, VO VT (2021). Rapid Detection of Tebuconazole Based on Aptasensor and Aggregation of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* **2021**: 5532477.
- QIU J, DAI S, ZHENG C, CHAI T, BIE M (2011). Enantiomeric separation of triazole fungicides of 3 μm – 5 μm particle chiral columns by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chirality* **23**: 479-486
- RAHNAMEY FARNOOD P, DANESH PAZHOOH R, ASEMI Z, YOUSEFI B (2021). DNA damage response and repair in pancreatic cancer development and therapy. *DNA Repair (Amst)*. **103**: 103116.
- SADIQ NW, BEAUCHEMIN D (2020). Chapter 4 - Liquid chromatography, *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*. **2020**: 213-254.
- SAGAR A Column Chromatography- Definition, Principle, Parts, Steps, Uses
Erişim Adresi: [<https://microbenotes.com/column-chromatography/>]
- SAMREEN S, AMIN A, AIJAZ AK, RIAZ M (2021). Effect of thiram on rat kidney: inhibition of brush border membrane and antioxidant enzymes, diminution of antioxidant capacity, enhanced DNA damage and DNA-protein cross-linking. *Biochemistry* **44**: 5660-5671.
- SARKER S, AKBOR MA, NAHAR A, HASAN M, ISLAM ARMT, SIDDIQUE MAB (2021). Level of pesticides contamination in the major river systems: A review on South Asian countries perspective. *Heliyon* **7**: e07270.
- SARKER A, NANDI R, KIM JE, ISLAM T (2021). Remediation of chemical pesticides from contaminated sites through potential microorganisms and their functional enzymes: Prospects and challenges. *Environ. Technol. Innov.* **23**: 101777.
- SHAH ZU, PARVEEN S (2021). Pesticides pollution and risk assessment of river Ganga: A review. *Heliyon* **7**: e07726.
- SONGQING C, SUYU W, QINGCHUN L, YAN Z, XIASHI Z (2020). Magnetic graphene oxide-ultrathin nickel-organic framework composite for the extraction and determination of epoxiconazole in food sample. *RSC Advances* **73**: 44793-44797.
- SUN M, MA X, WANG J, WANG C, WANG Z (2013). Graphene grafted silica-coated Fe_3O_4 nanocomposite as absorbent for enrichment of carbamates from cucumbers and pears prior to HPLC. *Journal of Separation Science* **36**: 1478-1485.

- SUTTON K, SUTTON RMC, CARUSO JA (1997). Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **789**: 85–126.
- TAJDAR-ORANJ B, PEIVASTEHR-ROUDSARI L, MAHDAVI V, KEIKAVOUSHI BEHBAHAN A, MOUSAVI KHANEGHAH A (2021). Simultaneous multi-determination of pesticide residues in pistachio from Iran's market: A probabilistic health risk assessment study. *J. Food Compos. Anal.* **103**: 104085.
- TASSIA F, DIAS C, JOSE GSS, ALINE FSC, ISADORA DE LA, MARCEL JP, LARISSA FAV, SILVANA M, MONICA RFM, LUIS DSM (2018). Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **62**: 140-146.
- TREMI I, NOWSHEEN S, AZIZ K, SIVA S, VENTURA J, HATZI VI, MARTIN OA, GEORGAKILAS AG (2021). Inflammation and oxidatively induced DNA damage: A synergy leading to cancer development. *Cancer* 2nd ed. **2021**: 131-147.
- VAİHAYASI PD (2016). India had never seen anything like Bhopal. Erişim Adresi: [https://www.rediff.com/news/special/india-had-never-seen-anything-like-Bhopal/20141203.htm]
- WIKİPEDIA Erişim Adresi: [https://en.m.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography]
- WANG Y, ZHU YC, LI W, YAO J, REDDY GVP, LV L (2021). Binary and ternary toxicological interactions of clothianidin and eight commonly used pesticides on honey bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**: 223.
- WANG Z, ZHANG J, HU B, YU J, WANG J, GUO X (2019). Graphene/Fe₃O₄ nanocomposite for effective removal of ten triazole fungicides from water solution: Tebuconazole as an example for investigation of the adsorption mechanism by experimental and molecular docking study. *Arabian Journal of Chemistry* **13**: 7695-7706.
- WANG W, XU M, GUO Q, GU R, YAO J (2015). Zinc induced polyelectrolyte coacervate bioadhesive and its transition to a self-healing hydrogel. *RSC Advances* **59**: 47640-47646.
- ZHANG Q, FANG L, JIA B, LONG N, SHI L, ZHOU L, ZHAO H, KONG W (2021). Optical lateral flow test strip biosensors for pesticides: Recent advances and future trends. *TrAC Trends Anal. Chem.* **21**: 116427.

ZHANG X, LIAO X, HOU Y, JIA B, FU L, JIA M, ZHOU L, LU J, KONG W (2022). Recent advances in synthesis and modification of carbon dots for optical sensing of pesticides. *J. Hazard. Mater.* **422**: 126881.

ZHIHAOLIN L, YAOHAI Z, QIYANG Z, YONGLIANG C, AIHUA C, BINING J (2022). In-situ decomposed nanofluids dispersive liquid-phase microextraction for detection of seven triazole fungicides in fruit juices and tea drinks. *Analytical Chemistry* **68**: 2236-2240.

ZHOU L, XU J, LUAN L, QIN D, PAN C (2013). Optimization and validation of a method based on derivatization with methylating agent followed by HPLC-DAD for determining dithiocarbamates residues. *Acta Chromatographica* **25**: 613-625.

ZIXI Z, RUNXIA S, YUE S, JIYE H, XIAOLU L (2021). Fate, residues and dietary risk assessment of the fungicides epoxiconazole and pyraclostrobin in wheat in twelve different regions, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **207**: 111236.