

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL

**CYPERMETHRİNİN TOPRAK
ÖRNEKLERİNDEN HPTLC YÖNTEMİ İLE
TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevcan ŞEMEN
Biyolog

İSTANBUL-2009

Bu tez çalışması, İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 3059

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarı'nda yapmama olanak tanıyan Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. İmdat ELMAS' a ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Salih CENGİZ' e,

Çalışmayı büyük ilgi ile yöneten, derin bilgilerinden her zaman faydalandığım ve her koşulda desteğini arkamda hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL' a,

Tez çalışmalarımda büyük emeği geçen ve beni yürekten desteklediklerine inandığım Arş. Gör. Zeynep TÜRKMEN ve Selda MERCAN'a,

Laboratuar çalışmalarında bana yardımcı olan laborant Murat YAYLA'ya,

Tez süresince her türlü desteklerini esirgemeyen tüm İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü mensuplarına,

Örneklerimin toplanmasında emeği geçen Nihat ONAYDAR'a ve DİN ailesine,

Verdikleri insaniüstü destekle, beni meleklerin yeryüzündeki varlığına inandıran sevgili arkadaşlarım Elif ÖZTÜRK ve Besim ERALP'e,

Sonsuz sevgi ve sabırlarıyla bana devam etme gücü veren, desteklerini her zaman arkamda hissettiğim AİLEME, sevgi ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Biyolog Sevcan ŞEMEN

KISALTMALAR

°C; santigrat derece

2,4-D; 2,4-Diklorofenoksiasetik asit

AMD; Otomatik çoklu geliştirme

cm; santimetre

DCCA; dimetil siklopropan karboksilik asit

DDT; dikloro difenol trikloroethan

dk; dakika

ECD; Elektron yakalama dedektörü

EXTOXNET; Extension Toxicology Network

FID; Alev iyonizasyon dedektörü

g; gram

GC; Gaz kromatografisi

HPLC; Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

HPTLC; Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi

ICH; International Conference on Harmonisation

kg; kilogram

LOD; Tayin limiti

LOQ; Ölçüm limiti

ml; mililitre

mm; milimetre

MS; Kütle spektrometrisi

NCI; Negatif kimyasal iyonlaşma

ng; nanogram

nm; nanometre

ppb; milyarda bir

ppm; milyonda bir

R²; Korelasyon katsayısı

rpm; dakikadaki devir sayısı

RSD; Bağıl standart sapma

s; saniye

TLC; İnce tabaka kromatografisi

U.S. EPA; Amerikan Çevre Koruma Kurumu

UV; Ultraviyole

W; watt

µg; mikrogram

µl; mikrolitre

µm; mikrometre

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pestisitler	3
2.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması	4
2.1.1.1. Sentetik Piretroidler	7
2.1.1.1.1. Cypermethrin	11
2.2. Kromatografi	15
2.2.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	17
2.2.2. Gaz Kromatografisi (GC)	17
2.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC / İTK)	18
2.2.3.1. Örneğin Plakaya Uygulanması	19
2.2.3.2. Plakanın Yürütülmesi	19
2.2.3.3. Kromatogramın Görüntülenmesi	20
2.2.3.4. R _f Değeri (Alıkonulma Faktörü)	20
2.2.3.5. Kalitatif Analiz	21
2.2.3.6. Kantitatif Analiz	21
2.2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC / YPİTK)	22
2.3. Absorpsiyometri	24
2.3.1. Densitometri	27
2.4. Örnek Hazırlama	32
2.4.1. Toprak Analizi	32
2.4.2. Ekstraksiyon	35
2.4.2.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon	35
2.4.2.2. Ultrasonik Ekstraksiyon	36
2.4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	38
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.3.1. Standart Çözeltiler	39
3.3.2. Çözücü Sistemleri	40
3.3.2.1. Hareketli Fazın Hazırlanması	40
3.3.2.2. Ekstraksiyon Çözücülerinin Hazırlanması	40
3.4. Örnek Hazırlama	41
3.4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması	41
3.4.2. Toprak Örneklerinin Hazırlanması	41
3.4.2.1. Ön İşlemler	41
3.4.2.2. Katım Örneklerinin Hazırlanması	41
3.5. Ekstraksiyon	42
3.5.1. Sıvı-katı Ekstraksiyon	42
3.5.2. Ultrasonik Ekstraksiyon	42
3.5.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu	43
3.6. HPTLC Analizi	43
3.7. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	44
3.7.1. Ekstraksiyon Yöntemleri İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	44
3.8. Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limitlerinin (LOQ) Belirlenmesi	44
3.9. Geri Kazanım Çalışmaları	45
3.10. Gerçek Toprak Örneklerinin Analizi	45
4. BULGULAR	46
4.1. Doğrudan Standart Madde Çözeltileri ile Yapılan Çalışmalar	48
4.1.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon	48
4.1.2. Ultrasonik Ekstraksiyon	49
4.1.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu	50
4.2. Katım Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar	52
4.2.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon	52
4.2.2. Ultrasonik Ekstraksiyon	53
4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu	54
4.3. Kontrol Grubu	56
4.4. Tarla Örnekleri	57

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
6. ÖZET	64
7. SUMMARY	65
8. KAYNAKLAR	66
9. ÖZGEÇMİŞ	78

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pestisit, herhangi bir zararlıyı yok etmek, kaçırmak, uzaklaştırmak veya kontrol etmek amacıyla kullanılan madde veya maddeler karışımı olarak tanımlanır. Pestisitler çoğunlukla hedef aldıkları organizmalara göre sınıflandırılmaktadır. Böceklerle karşı etkili olan grup “**insektisit**”lerdir (Ecobichon, 2001).

Dünyanın bazı bölgelerinde tarım ürününün %80’den fazlasının böcekler tarafından mahvedildiği görülmüştür. Başta sıtma olmak üzere böceklerin yaydığı hastalıklar hala ilk sıralarda bulunmaktadır. Bu bakımdan pestisitler, gerek dünyanın gittikçe artan nüfusunun beslenmesini sağlamak gerekse de hastalıklardan korunmak için vazgeçilmez ilaçlar olarak kabul edilmektedir.

Zararlılar aleminin çok taraflı ve zengin oluşu, sıcakkanlıklar için az zehirli ve seçici etkili ilaçlara olan gereksinim ve bazı zararlı türlerinde dayanıklılık oluşması gibi nedenlerle günümüzde pestisit ilaçlarının adedi oldukça artmıştır. Farklı kimyasal yapıda olan çok sayıda insektisit üretilmiştir (İmre, 1988).

“**Sentetik piretroidler**” başlıca insektisit sınıflarındandır ve sinir sistemi üzerine etki etmektedirler. Son yıllarda kuşlara ve memelilere olan düşük toksisitesinden dolayı tarımda yoğun olarak kullanılan ve organik klorlu, organik fosforlu ve karbamat insektisitlerin yerini alan “**cypermethrin**” sentetik piretroid bir insektisittir (Cox, 1996; Borges ve ark., 2007).

Pestisitler, ekolojik denge ve insan sağlığı açısından oluşturdukları tehlike nedeniyle çağımızın en güncel araştırma konuları arasına girmiştir. Ülkemizde ve dünyada yaygın olarak kullanılan cypermethrinin yetiştirilen ürün, yiyecek ve çevresel materyallerdeki kalıntıları önem taşımaktadır. Bu nedenle söz konusu cypermethrinin biyolojik materyallerden (Schettgen ve ark., 2002; Heudorf ve ark., 2004) analizleri yanında; besin maddelerindeki (Zawiyah ve ark., 2007; González-Rodríguez ve ark., 2008), sudaki (Legrand ve ark., 1991; Xue ve ark., 2005) ve topraktaki (Yasin ve ark.,

1996; Babić ve ark., 1998) kalıntılarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen birçok çalışma mevcuttur.

Toprağın yıkanma payını ve birikim seviyesini öngörebilmek için topraktaki pestisit bileşenlerinin tanımlanması amacıyla uygun analitik yöntemler geliştirmek zorunludur. Bu noktadan hareketle çalışmamızda, ülkemizde de yaygın olarak kullanılan insektisitlerden “cypermethrin”in, suda çözünürlüğünün az olup toprakta birikme riski taşıması nedeniyle, toprak materyalinden, HPTLC yöntemi kullanılarak kalitatif ve kantitatif tayini için yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

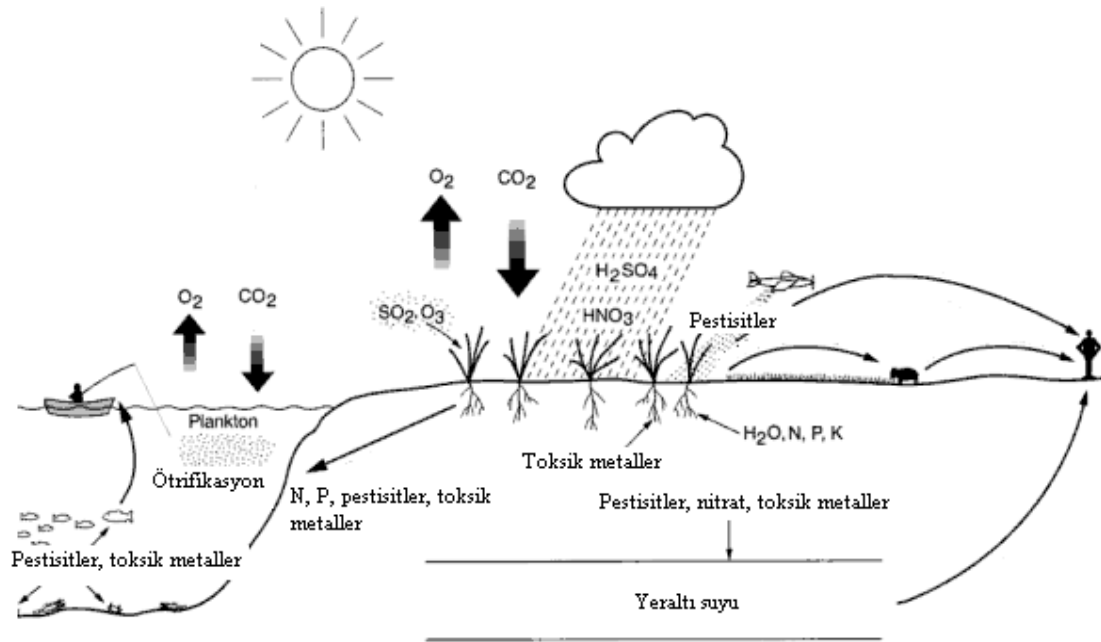
2.1. Pestisitler

Günümüzde bitki zararlılarına karşı kimyasal maddelerle savaşın ekonomik önemi son derece büyüktür. Tarım ürünlerini ve diğer besinleri büyük ölçüde zarara sokan zararlılara, ayrıca mikropları taşıma, ısırma ve sokma gibi yollarla hastalıkların yayılmasına neden olan organizmalara karşı savaşta kullanılan ilaçların tümüne pestisit adı verilmektedir (İmre, 1988).

Pestisitler, tarımsal üretimde ilk olarak 19. yüzyılın ikinci yarısında kullanılmaya başlanmıştır. Kurşun, arsenik, bakır, çinko tuzları ve bitkisel kaynaklı nikotin gibi maddeler mahsüllerdeki böcek ve hastalıkların kontrolü için kullanılmıştır. 1930 ve 1940'larda, bir herbisit olan 2,4-D ve insektisit olan DDT piyasaya sunulmuş; bunu takiben, dünya çapında tarımsal üretimde artan miktarlarda pestisit kullanımı gerçekleşmiştir. Pestisit kullanımının %70-80'ini tarımsal faaliyetler oluşturmaktadır (Sparks, 2003).

Yapılan ölçümler uygulanan pestisit hedef zararlıya ulaşan miktarının %1 ile %75 arasında geniş bir çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Geri kalan kısım toprağa geçme, erozyon, yağmurla yıkanma ve atmosfere buharlaşma ile çevrede kaybolmaktadır (Şekil 2.1.). Pestisit kalıntılarının çevrede ve besin zincirinde kalıcılıkları kimyasal yapılarına göre birkaç haftadan 30 yıla kadar değişiklik gösterebilmektedir (Parris ve Yokoi, 2003).

Pestisitler sınırlı alanlarda kullanılsalar dahi, yağmurlar ve seller yardımıyla yıkanıp taşınarak havuz, göl ya da nehirler gibi daha büyük su kütlelerine ulaşmakta ve burada suyun fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirmektedirler. Sucul ekosistemlerde, pestisitler, fitoplanktonlardan balıklara ve sonunda da insanlara transfer olabilmektedir (Das ve Mukherjee, 2003; Borges ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Bitki, toprak, hava, su ve besin arasındaki etkileşim zinciri (Radojević ve Bashkin, 1999).

Pestisitlerin yaygın olarak kullanılması çevre kirliliğine ve bu kirliliğin neden olduğu gıda zinciri dolayısıyla insanlarda ciddi akut ve kronik zehirlenmelere yol açmaktadır. Ayrıca, düşük dozda uzun süre pestisitlere maruz kalma kanser ve diğer genetik hasarlara öncülük edebilmektedir (Zahm ve Blair, 1992; Yamashita ve ark., 1997; Bradberry ve ark., 2005; Patel ve ark., 2007).

2.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik gelişim dönemlerine, görünüş ve fiziksel yapılarına, içerdikleri etken maddenin cins ve grubuna, toksisite derecelerine, kullanım tekniğine, formülasyon biçimlerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalardan en çok kullanılanı etki ettikleri organizmalara göre yapılandır. İnsektisitler böceklere, herbisitler yabancı

otlara, akarisitler örümceklere, fungusitler bitki mantar hastalıklarına, rodentisitler kemiricilere, nematositler kurtlara, mollussitler yumuşakçalara (salyangoz, sümüklü böcek) karşı kullanılmaktadır.

1- İnsektisitler

- Klorlu Hidrokarbonlar
- Organik Fosforular
- Karbamatlar
- Sentetik Piretroidler
- Benzoil Üreler
- Bakteriler
- Diğerleri

2- Akarisitler

- Halojen ve Oksijenliler
- Amin ve Hidrazin Türevleri
- Kükürtlüler
- Organik Kalaylılar
- Diğerleri

3- Kış Mücadele İlaçları ve Yazlık Yağlar

4- Fumigantlar, Nemositler ve Toprak Fumigantları

- Fumigantlar
- Nemositler ve Toprak Fumigantları

5- Rodentisit ve Mollussitler

6- Fungisitler

- Koruyucu Fungisitler

Bakırlılar
Dicarboximidler-Phtalimidler
Dithiokarbamatlar
Kalaylılar
Kükürtler
Nitro Bileşikler
Diğerleri

- Sistemik Fungisitler
 - Amin ve Amidler
 - Benzimidazoller
 - Morpholinler
 - Pyrimidinler
 - İmidazoller
 - Triazoller
- Diğer Sistemik Fungisitler
- Biyolojik Fungisitler

7- Herbisitler

- Fenoksi Bileşikler
- Karbamatlar
- Üre bileşikleri
- Sülfonil Üreler
- Anilinler
- Amidler ve Anilinler
- Benzoik Asitler
- Pikolinik Asitler
- Diazinler
- Triazinler
- Benzonitriller
- Sikloheksanlar
- İmidazolinonlar

- Triazoller
- Oksadiazoller
- Amino Fosfonatlar
- Diğerleri (Aydınöğlu ve ark., 2002)

İnsektisit etkili maddeler pestisitlerin en önemli gruplarından biridir. Türkiye’de pestisit tüketiminin %42.4’ünü insektisitler, %22.4’ünü herbisitler, %19.0’unu fungusitler, %2.7’sini akarisitler, %8.1’ini yağlar ve %5.4’ünü ise diğer pestisitler oluşturmaktadır (Demircan ve Yılmaz, 2005).

Günümüzde kullanılan tüm insektisitler nörotoksik maddelerdir ve hedef organizmanın sinir sistemi üzerine etki ederler. Böceklerin sinir sistemi oldukça gelişmiştir ve memelilerinkine benzer, periferal sinir sistemleri memelilerinki kadar karmaşık olmasa da aralarında çarpıcı benzerlikler bulunmaktadır. İnsektisitler bu yüzden seçici değildir ve hedef olmayan organizmaları da kolayca etkilemektedir. İnsektisitlerin toksik etki mekanizmaları ve hedef aldıkları yapılar bütün türlerde aynıdır ancak biyolojik etkinin şiddetini maruz kalma süresi, şekli ve miktarı belirlemektedir (Ecobichon, 2001).

İnsektisitler geleneksel olarak başlıca dört gruba ayrılırlar; klorlu hidrokarbonlar, organik fosforular, karbamatlar ve piretroidler (Rose ve ark., 1999).

2.1.1.1. Sentetik Piretroidler

Sentetik piretroidler, 1970’lerin sonlarında piyasaya sunulmuş ve 1982 yılı ile birlikte dünya çapındaki insektisit kullanımının yüzde 30’unu oluşturur hale gelmiştir. (Ecobichon, 2001.)

Günümüzde, piretroidler en sık kullanılan insektisitler arasındadır ve tarımda, ormancılıkta, bahçecilikte, halk sağlığında ve evlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Heudorf ve ark., 2004).

Amerikan Çevre Koruma Kurumu (U.S. EPA)'nun yaptığı araştırmaya göre piretrinler Amerika'da yılda 240 milyondan fazla uygulamada kullanılmaktadır ve bu diğer tüm insektisitlerden daha fazladır. Dünya çapında her yıl 200,000 kilogram piretrin tüketilmektedir (Cox, 2002).

Sentetik piretroidlerin kökeni ilk bitkisel insektisitlerden olan ve kurutulmuş krizantem çiçeklerinden (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) ekstrakte edilen "piretrum" dur. Piretrum ekstraktı 6 insektisidal ester içermektedir; piretrin I ve II (%73), cinerin I ve II (%19), Jasmolin I ve II (%8). Bu esterler ışığa karşı hassastır. Piretrin I'in insektisit özelliği yüksek, piretrin II ise kısa sürede böceği sersemletecek "knockdown" -hızla yere düşüren- etkiye sahiptir. Değişen oranlarda jasmolin, cinerin ve piretrin içeren ilk ticari piretrin preperatları 1800'lü yılların ortalarında hazırlanmıştır (Casida ve ark., 1983; Katsuda, 1999; Rose ve ark., 1999; Ecobichon, 2001; Cox, 2002).

Doğal piretrumların insektisit olarak birçok avantajları vardır. Geniş spektrumlu olmaları, memelilere karşı zehirliliklerinin ihmal edilebilir düzeyde olması ve doğal koşullarda kısa sürede dekompoze olmaları en önemli avantajlarıdır. Ancak, kolay bozulmalarının yanı sıra, üretim maliyetinin oldukça yüksek olması, üretiminin sürekli olmasındaki zorluklar doğal piretroidlerin kullanımını sınırlamıştır. Organik fosforlu gruplara göre molekülünde birçok asimetric merkez olması, her bir merkezin insektisit etkiye katkısının belirlenmesi, bunun yanı sıra streoisomer yapıda olması nedeniyle benzerlerini sentezlemek oldukça zor olmuştur (<http://www.itkb.gov.tr/files/zirai.pdf>).

İnsektisitlerin büyük bir sınıfı olan sentetik piretroidler, daha kalıcı ve zehirli hale gelmeleri için pretrinlerden kimyasal olarak modifiye edilmişlerdir (Cox, 2002). İlk sentetik piretroid olan allethrin 1949'da üretilmiştir ve düşük derecede kalıcıdır. Tetramethrin, resmethrin, bioresmethrin ve phenothrini içeren ikinci nesil piretroidlerin elde edilmesi 1960'larda gerçekleşmiştir. Bu ışığa dayanıksız piretroidler ise sadece iç mekanlarda kullanım için uygundur. 1970'lerde üçüncü nesil, fenvelerate ve permethrin sentezlenmiştir. Bunlar kabuledilebilir insektisit aktiviteleri ve ışığa karşı kararlılıklarıyla zirai kullanıma sunulan ilk piretroidler olmuşlardır. Dördüncü nesil piretroidler ise α -cyano grubu ihtiva etmektedirler ve

daha yüksek kalıcılığa ve insektisidal aktiviteye sahiptirler. Bu piretroidler arasında bugün sık kullanılan “**cypermethrin**”, cyhalothrin, deltamethrin, esfenvelerate, bifenthrin yer almaktadır (Rose ve ark., 1999).

Piretroid insektisitler primer olarak santral sinir sistemine etki eden kuvvetli nörotoksik ajanlardır, bununla birlikte ayrıca periferik sinirler ve kaslar üzerine önemli etkileri bulunmaktadır (Ray ve Fry, 2006).

Piretroidler; yapıları, toksisiteleri ve ortaya çıkardıkları sendromlar (hastalık belirtileri) göz önünde bulundurularak Tip I ve Tip II olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tip I piretroidler, α -cyano grubu bulundurmazlar ve temel olarak duyu sinirleri üzerine etki ederler, Tip II piretroidler ise bir α -cyano grubu ihtiva ederler ve motor sinirlerini etkilerler (Verschoyle ve Aldridge, 1980; Spencer ve ark., 2001).

Sentetik piretroidler, memelilere merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki sodyum kanallarıyla etkileşerek toksik etki yaparlar. Hücre zarındaki sodyum ve kalsiyum iyon alışverişini bozarak felce yol açarlar. Deride ve üst solunum yollarında aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olurlar. Ağız yoluyla ya da deri yoluyla yüksek miktarda alınmışlarsa, uyuşmalar, kan basıncında düşme, taşikardi, baş ağrısı gözlenir. Solunum yolu ile alınmada gırtlak ödemi, bronşların daralması, alerjik şok benzeri tepkiler meydana gelebilir. Piretroidler için toksik oral doz 100–1000 mg/kg, öldürücü akut oral doz 10–100 g'dır (Dorman ve Beasley, 1991; Lamb, 2007).

Piretrinler, insektisit zehirlenmelerinin yaygın sebeplerindendir. EPA, zehir kontrol merkezine gelen 1991 yılına ait çağrılarını incelediğinde piretrinlerin 9.000'in üzerinde vakaya neden olduğunu tespit etmiştir. Piretrin zehirlenmeleri, organofosfatlar haricindeki diğer tüm insektisit sınıfı zehirlenmelerinden daha sık görülmektedir (Cox, 2002).

Çin'de gerçekleşen 573 piretroid zehirlenme vakası araştırılmış; 51'inde bilinç kaybı ve 34'ünde felç tablosu geliştiği ve bunlardan sadece 5 tanesinin mesleki maruziyetten kaynaklandığı tespit edilmiştir. Felç, Tip I piretroidlere nazaran daha zehirli olan cyano-piretroidlere (Tip II) maruz kalındığında daha yaygın olarak ortaya çıkan bir durumdur (<http://stanford.wellsphere.com/cancer-article/alphacypermethrin/306869>).

Piretroidlerin akut toksisitesi iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen, sürekli ya da aralıklı olarak düşük dozlarda piretroidlere maruz kalmanın ortaya çıkaracağı sonuçlar henüz anlaşılammıştır. Oysa hergün her yaş grubundan insan çeşitli yollarla piretroidlere maruz kalmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kabul edilebilir günlük alım limitleri 10 µg/kg vücut ağırlığı (örn. deltamethrin) ile 50 µg/kg vücut ağırlığı (örn. permethrin, cypermethrin) dir (Heudorf ve ark., 2004).

İç mekanlarda kullanım sonucu pestisitlere maruz kalmanın büyük boyutlara ulaştığı Amerika'da 386 hamile kadının katıldığı bir araştırma gerçekleştirilmiş ve dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçları değerlendirmede, yapılan anket ve analiz edilen anne idrarlarındaki pestisit metaboliti seviyeleri temel alınmıştır. Buna göre annelerin %70'i hamileyken pestisitlere maruz kalmıştır ve %55'inin idrarında ölçülebilir seviyede piretroid metabolitleri tespit edilmiştir (Berkowitz ve ark., 2003).

Almanya'da yapılan bir çalışmada ise piretroid ve organofosfat insektisitlerin idrardaki metabolit seviyeleri ölçülmüş ve beslenme yoluyla pestisit maruziyeti incelenmiştir. Bu çalışmaya bahsi geçen insektisitlere daha önce herhangi bir sebeple hiç maruz kalmamış 673 gönüllü çocuk ve genç katılmış ve çalışma sonucunda idrarlarında günlük kabul edilebilir alım limitinin altında piretroid metabolitlerine rastlanmıştır (Heudorf ve ark., 2004).

Almanya'da yapılan bir diğer çalışmada populasyon genelinin piretroidlere maruz kalma şekli 1177 kişi üzerinden araştırılmış ve piretroid alımının genel olarak günlük beslenmeyle gerçekleştiği öne sürülmüştür. Analiz edilen idrar örneklerinin %65'inde permethrin ve cypermethrin gibi piretroidlerin metabolitleri (*cis*-DCCA and *trans*-DCCA) 0.5 ve 1.4 µg/l miktarında tespit edilmiş, %19'unda deltamethrin ve %16'sında da cyfluthrin metaboliti tanımlanmıştır (Schettgen ve ark., 2002).

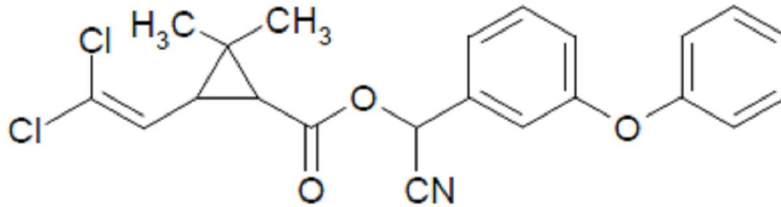
Piretroid toksisitesi ve maruziyeti üzerine yapılan tüm bu çalışmalar piretroidlere maruz kalmanın dünya halk sağlığına ait uluslararası bir problem olduğunu ortaya koymaktadır.

2.1.1.1.1. Cypermethrin

Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri (U.S. EPA, 1989; EXTOXNET, 1996; Aydınoglu ve ark., 2002; U.S. EPA, 2006);

Kimyasal Adı: (R,S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate

Kimyasal Yapısı:



Şekil 2.2. Cypermethrinin kimyasal yapısı

Fiziksel Hali: Katı

Renk: Renksiz kristaller

Koku: Kokusuz

Molekül Formülü: C₂₂H₁₉Cl₂NO₃

Molekül Ağırlığı: 416.30 g/mol

Erime Noktası: 60-80°C

Kaynama Noktası: 170-195°C

Yoğunluğu: 1.249 g/cm³ (20°C)

Buhar Basıncı: 8×10^{-4} (80°C); 1×10^{-7} (20°C)

Sudaki Çözünürlüğü: 7.6 ppb (25°C)

Diğer Çözücülerdeki Çözünürlüğü: Metanol, aseton ve ksilende iyi çözünür.

Dağılma Katsayısı: 6.60

Etki Şekli: Kontakt ve mide zehiri etkili insektisit.

Akut Oral LD₅₀ (Test hayvanlarının yarısını öldürmek için gerekli doz): 250–4150 mg/kg

Günlük Kabul Edilebilir Doz (ADI): 0.05 mg/kg

Türk Gıda Kodeksinde Yer Alan Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL):

Elma, Kiraz.....	1.0 ppm
Üzüm.....	0.5 ppm
Biber, Buğday, Domates, Salatalık.....	0.2 ppm
Şekerpancarı.....	0.1 ppm
Ayçiçeği, Patates, Mısır, Soya, Antepfıstığı, Pamuk tohumu.....	0.05 ppm
Havuç.....	0.01 ppm
Et (yağında).....	0.2 ppm
Süt, Yumurta.....	0.05 ppm

Cypermethrin ilk kez 1977’de piyasaya sürülmüştür. Tarımda pamuk, sebze ve meyve zararlılarını da içeren birçok zararlının kontrolünde ve ayrıca ev, depo, mağaza, sera, gemi, nakliye kamyonları gibi daha birçok yerde ilaçlama amacıyla kullanılmaktadır (Cox, 1996; EXTTOXNET, 1996).

Cypermethrin diğerk tüm sentetik piretroidler gibi böceklerin sinir sisteminin normal fonksiyonlarını bozarak onları öldürmektedir. İnsanlar da dahil tüm diğerk hayvanlarda olduğu gibi böceklerde de uyarılar, sinir içine geçici sodyum akışı sağlanarak bir sinirden diğerkine iletilir. Voltaj kapılı sodyum kanalları piretroidlerin ana hedefidir. Piretroidler sodyum akışına izin veren kapıların kapanışını geciktirmektedirler ve bu bir yerine çoklu sinir uyarılarına sebep olmaktadır.

Cypermethrinin sinir sistemine diğerk etkileri; γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörlerini, sinirler tarafından kalsiyum alınımını ve nörotransmitterleri yıkan bir enzim olan monoamin oksidaz enzimini inhibe etmesidir.

Cypermethrin ayrıca hücresele enerji üretimi, metal atomlarının taşınması ve kas kasılması ile ilgili bir enzim olan adenozein trifosfatazı da etkilemektedir (Cox, 1996).

EPA cypermethrini **orta derecede toksik bileşik [sınıf II]** ve **insanlarda muhtemel kanserojen [grup C]** olarak sınıflandırmaktadır.

Cypermethrin balıklara, sucul omurgasızlara ve arılara yüksek derecede toksiktir (EXTOXNET, 1996; U.S. EPA, 2006). Kuşlarda davranış bozukluklarına yol açabilmektedir ve cypermethrin uygulanan alanlarda yiyecek kaynakları olan böcekler öldüğünden kuşların yavru bakımındaki başarısı azalmaktadır (Pascual ve Peris, 1992; Walker, 2003). Ayrıca, cypermethrinin insektisit olmasına rağmen bitkileri de negatif olarak etkilediğı gösterilmiştir (Cox, 1996; Chauhan ve ark., 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalar cypermethrinin memeli hücreleri için sitotoksik olduğunu ve DNA hasarına yol açtığını ortaya koymaktadır (Surrallés ve ark., 1995; Ündeger ve Başaran, 2005; Patel ve ark., 2007).

Cypermethrin, suda çözünürlüğü düşük olduğundan toprak partiküllerine kuvvetlice adsorbe olma eğilimi göstermektedir. Topraktaki yarı ömrü 4 gün ile 8 hafta kadardır fakat çok daha kalıcı olabilmektedir. Örneğin Ontario ve Canada'daki tarım toprağında kalıcılığının 4 ile 12 ay arasında olduğu tespit edilmiştir (Cox, 1996).

Nötral ve asidik sulu çözeltilerde cypermethrin yavaş hidroliz olur; pH 9'da hidrolizi daha hızlıdır. Normal çevre şartlarında cypermethrin hidrolize (yarı ömrü 50 günden fazla) ve fotodegradasyona (yarı ömrü 100 günden fazla) karşı stabildir. Havuz sularında ve laboratuvar yıkım çalışmalarında, piretroid konsantrasyonu sedimente, askıdaki partiküllere ve bitkilere adsorbe olma nedeniyle hızla düşmektedir (EXTOXNET, 1996).

Cypermethrinin toprak, sediment ve su materyallerinden analizi için gerçekleştirilen ve çeşitli kromatografik yöntemlerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur.

Ultrasonik ekstraksiyon kullandıkları çalışmalarında *Yasin ve ark. (1996)*, topraktan beş sentetik piretroid insektisit gaz kromatografisi (GC) ile tayini için yöntem geliştirmişler ve gerçek toprak örneklerine başarıyla uyguladıklarını bildirmişlerdir.

Martinez Galera ve ark. (1996), kısmi en küçük kareler yöntemi kullanarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile toprakta ve yeraltı suyunda cypermethrin, fenvalerate, cis- ve trans-permethrin piretroidlerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Babic ve ark. (1998), tayin yöntemi olarak ters-faz ince tabaka kromatografisi (RP-TLC) kullandıkları çalışmalarında içlerinde piretroid grubu insektisitlerden α -cypermethrin ve tetramethrinin de bulunduğu altı pestisit topraktan ultrasonik ekstraksiyonu için yöntem geliştirmişler ve geleneksel ekstraksiyon yöntemleri olan sıvı-katı ve soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırmışlardır.

Sharma (2002), cypermethrin, α -cypermethrin ve λ -cyhalothrin sentetik piretroidlerinin formülasyonlarındaki aktif bileşenlerin analizi için bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi geliştirmiş ve ayrıca yaptığı alev iyonlaşma dedektörlü gaz kromatografisi (GC-FID) analizleriyle, iki yöntemin sonuçlarının karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koymuştur.

Ali ve Baugh (2003) ise farklı oranlarda organik madde içeren topraklarla gerçekleştirdikleri çalışmada gaz kromatografisi-negatif kimyasal iyonlaşma modunda kütle spektrometrisi (GC/MS-NICI) kullanarak altı piretroid ve mirexin topraktaki emilimi üstüne çalışmalar yapmışlardır.

Esteve-Turillas ve ark. (2004), topraktaki sentetik piretroid insektisit kalıntılarının mikrodalga yardımıyla ekstraksiyonu ve GC ile tayini için analitik bir yöntem geliştirmişler ve ultrasonik ekstraksiyon ile mikrodalga ekstraksiyonunu karşılaştırmışlardır.

Yıldırım ve Özcan (2007), Truva'nın toprak ve su kaynaklarında bulunan pestisit kalıntılarının tayinini amaçladıkları çalışmalarında, GC yöntemini kullanmışlar ve su örneklerinde cypermethrine rastlamazken toprak örneklerinin ikisinde cypermethrin tespit etmişlerdir

Xue ve ark. (2005), su ve sediment örnekleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada endokrin zarara yol açan 31 adet pestisitın elektron yakalama dedektörlü gaz kromatografisi (GC-ECD) ile çoklu kalıntı analizini gerçekleştirmişler ve cypermethrinin çalıştıkları bölgede en sık bulunan sentetik piretroid olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bir çoklu kalıntı yöntemi *Smalling ve Kuivila (2008)* tarafından 85 yasal ve güncel kullanımda olan pestisitın sedimentten analizi için geliştirilmiş, bu çalışmada mikrodalga ekstraksiyonu ve GC analiz yöntemi kullanılmıştır.

Wang ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada, toprak örneklerindeki malathion, lambda-cyhalothrin ve cypermethrin kalıntılarının önderişimi ve tayini homojenik sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin GC-ECD ile kombine edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

2.2. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki maddelerin iki faz arasında farklı bir şekilde dağılmaları esasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Günümüzde son derece duyarlı ve etkin bir ayırma yöntemi olarak kabul edilen kromatografi kalitatif ve kantitatif amaçlar için kullanılmaktadır.

Rus botanikçi M.S. Tswett kromatografinin babası olarak kabul edilmektedir. 1903 yılında Tswett, yeşil ve sarı kloroplast pigmentlerini yapraklardan ekstrakte edip petrol eterine transfer ettikten sonra incecik hale getirilmiş örneğin sükröz gibi bir

tozla doldurulmuş cam bir kolondan geçirmiş ve pigmentleri ayrı tabakalar halinde birbirinden ayırmayı başarmıştır (Flanagan ve ark., 2007). 1944 yılında Martin, Consden ve Gordon aminoasit karışımlarını kağıt kromatografisiyle ayırmıştır ve 1956'da ise Stahl'ın çalışmaları ile ince tabaka kromatografisi gelişmeye başlamıştır. Yüksek molekül ağırlığı olan maddeleri ve özellikle proteinleri ayırmak için güçlü bir teknik olan jel-filtrasyon kromatografisi ise 1959'da Poarth ve Flodin tarafından geliştirilmiştir (Baban ve ark., 2003).

Kromatografik sistemdeki fazlardan biri duran (stasyoner) faz, diğeri hareketli (mobil) faz olarak adlandırılır. Karışımı oluşturan bileşiklerin hareketli faz ile farklı bir şekilde ilerlemeleri sonucunda bir ayrılma sağlanır. Yani bir kromatografi sisteminde maddelerin hareketini sağlayan, bunları sürükleyen hareketli fazdır. Duran ve hareketli faz arasında devamlı olarak geçiş halinde bulunan maddeler, özelliklerine göre bu iki fazdan birinde daha fazla bulunurlar. Duran faz tarafından daha fazla adsorbe edilen (duran faz katı ise) veya daha fazla çözülen (duran faz sıvı ise) maddeler sistem içerisinde daha yavaş ilerlerken, hareketli fazda daha çok çözünen maddeler daha hızlı hareket ederler. Böylece karışımı oluşturan maddelerin duran ve hareketli faza karşı ilgilerinin farklı olması halinde bir ayrılma gerçekleşir (Ersoy, 1989).

Hareketli faz sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Hareketli sıvı faz olarak su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çeşitli oranlardaki karışımları kullanılabilir. Sabit faz olarak da silika jel, alumina, florasil, kömür, kalsiyum karbonat ve talkın da aralarında bulunduğu oldukça çeşitli maddeler kullanılabilir. Bu maddeler gözeneklidir ve bazılarının yüzeyi asidik, bazılarının bazik ve bazılarının de nötraldir (Gündüz, 2004).

Ayırmayı sağlayan kuvvete göre kromatografik işlemler; 1- Adsorpsiyon kromatografisi, 2- Partisyon kromatografisi, 3- İyon değiştirme kromatografisi, 4- Jel geçirgenlik kromatografisi olarak dört gruba ayrılmaktadır. Ayırmada kullanılan düzeneğe göre ise; 1- Sütun kromatografisi = Sıvı kromatografisi, 2- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), 3- Kağıt kromatografisi (PC), 4- İnce tabaka kromatografisi (İTK / TLC), 5- Gaz kromatografisi (GC) olarak sınıflandırılabilirler (Ersoy, 1989).

2.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Küçük dolgu maddeleriyle doldurulup yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) denir. HPLC ayırma yönteminde hareketli faz sıvı, sabit faz katı bir destek ya da katı bir destek maddesiyle kaplanmış bir sıvıdır. Örnek enjeksiyonu sisteme yüksek basınç altında yapılır ve örnek yüksek basınçta hareket eden hareketli faza karışır ve kolonun üstüne hareketli fazda çözünmüş bir şekilde ulaşır.

HPLC yönteminin avantajları; hassas olması, sıcaklığa duyarlı maddelere bile uygulanabilir olması, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir. Yöntemin üstün tarafı yüksek sıcaklık derecelerine gereksinim göstermemesi ve analiz sırasında ayrılan maddelerin bozulmaya uğramayıp çok saf olarak elde edilmesidir (Baban ve ark., 2003; Gündüz, 2004).

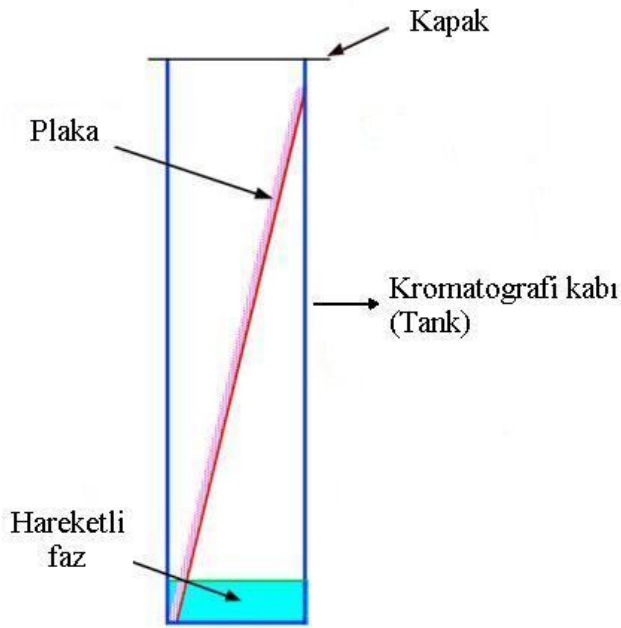
2.2.2. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisinde, uçucu veya kolaylıkla uçucu hale getirilebilen bileşenler ayrılır. Hareketli faz olarak azot, helyum veya argon gibi inert bir gaz kullanılır. Maddeleri taşımakla görevli olan hareketli faz ile ayrılmaları istenen maddeler arasında bir etkileşme olmaz. Sabit faz silika jel, alümina gibi katı bir adsorban veya yüksek kaynama noktalı bir sıvı olabilmektedir.

GC yöntemi ile ısıya dayanıklı maddelerin ayrılması sağlanır. Analizi yapılacak madde, sıcaklık derecesi ayarlanabilen bir fırın içine yerleştirilmiş olan bir kolondan geçirilir. Bu amaçla örnek önce bir enjektörle örnek enjeksiyon kutusuna enjekte edilir. İnert bir gaz yardımıyla kolon içinden geçmekte olan uçucu maddenin bileşenleri birbirinden ayrılır. Kolondan farklı zamanda çıkan bileşenler uygun bir dedektörden geçerken verdikleri sinyaller konsantrasyonu sağlamaya yarayan pikler şeklinde kaydedilir (Baban ve ark., 2003; Gündüz, 2004).

2.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC / İTK)

Kromatografi işlemi bu yöntemde cam, alüminyum veya plastik bir yüzey üzerine kaplanmış bir adsorban tabakasında gerçekleşir. Kromatografi kabındaki hareketli faz adsorban tabakası üzerinde alt kenardan üst kenara doğru ilerler (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. İnce tabaka kromatografisi düzeneği.

(<http://www.chromatography-online.org/Principles/TLC-Apparatus/Chambers.html>)

İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile kalitatif ve kantitatif analizler yapılabildiği gibi, bir karışımdan maddelerin saf halde elde edilmeleri amacıyla preparatif çalışmalar da yapılmaktadır (Ersoy, 1989). TLC, uygulaması kolay ve hızlı aynı zamanda ekonomik bir yöntemdir (Flanagan ve ark., 2007). İlaç endüstrisinde, maddelerin saflık derecelerini kontrol etmede, klinik laboratuvarlarda, biyoloji, biyokimya ve imalat laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Gündüz, 2004).

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak silika jel, talk, alüminyum oksit, selüloz, diatomeli topraklar gibi maddeler kullanılır. Bu maddeler su veya alkolle bulamaç haline getirilir ve özel olarak hazırlanmış plakalar üzerine ince bir tabaka halinde yayılıp kurutulur. Adsorban madde seçimi, ayrılması istenen maddelerin asidik veya bazik oluşlarına göre yapılır. Genellikle asidik karakterli maddeler için silika jel gibi asidik adsorplayıcılar, bazik karakterli maddeler için de alüminyum oksit, talk gibi bazik adsorplayıcılar kullanılır. Adsorbanın plakaya yapışmasını sağlamak için ayrıca kalsiyum oksit gibi yardımcı maddeler de ilave edilir. İnce tabaka plakaları, her ebatta, genel olarak da 5 x 20, 10 x 10, 20 x 20 cm ebatlarında imal edilir. Standart ince tabaka plakalarındaki tabaka kalınlığı 250 µm ve ortalama parçacık büyüklüğü 20 µm'dir (Ersoy, 1989; Gündüz, 2004).

2.2.3.1. Örneğin Plakaya Uygulanması

Kimyasal bir çözücü içerisinde çözülmüş halde bulunan analizi yapılacak olan madde, bir mikropipet, kapiler bir boru veya şırınga yardımıyla çok az miktarda plakaya uygulanır. Maddenin uygulandığı yer plakanın alt kenarından 1.5–2 cm yukarıda olmalıdır. Bu suretle, analiz edilecek olan madde silika jel üzerinde çok küçük bir spot (leke) oluşturur. Bu spotun biraz ilerisine aranan maddenin standart çözeltisinden yine çok az bir miktar uygulanır. Örnek çözeltisinin standartlardan önce uygulanması çapraz kontaminasyon riskini minimuma indirmektedir (Baban ve ark., 2003; Flanagan ve ark., 2007).

2.2.3.2. Plakanın Yürütülmesi

Kromatografide kullanılan plakanın büyüklüğüne göre değişik boyutlarda iyi kapanan cam tanklar kullanılır. Kullanılacak tankın içine uygulama noktasının seviyesini geçmeyecek şekilde hareketli faz çözeltisi konur. Spot hareketli çözeltiliye batmamalıdır. Plaka, hareketli faz ile doyurulmuş tanka yerleştirilir ve çözcünün yükselmesi gözle takip edilir. Çözücü yükselirken örnekteki bileşenleri de sürükler ve yukarıya çıkarır. Yükselme yaklaşık 10 cm olduğu zaman kromatograma son verilir, plaka tankın dışına çıkarılır ve kurutulur (Gündüz, 2004).

Hareketli faz için çözücü veya çözücü sistemi seçiminde, çalışılan maddenin yapısı ve kullanılan tabaka dikkate alınmaktadır. Polar olması beklenen maddeler için polar, apolar olması beklenenler için apolar çözücüler kullanılır. Polar çözücüler maddelerin R_f değerini arttırır. Sıklıkla, uygun kuvvette bir çözücü sistemi hazırlamak için birkaç çözücü karıştırılır. Maddeleri plakanın ortalarında yürüten çözücü sistemi en uygun sistemdir (Ersoy, 1989).

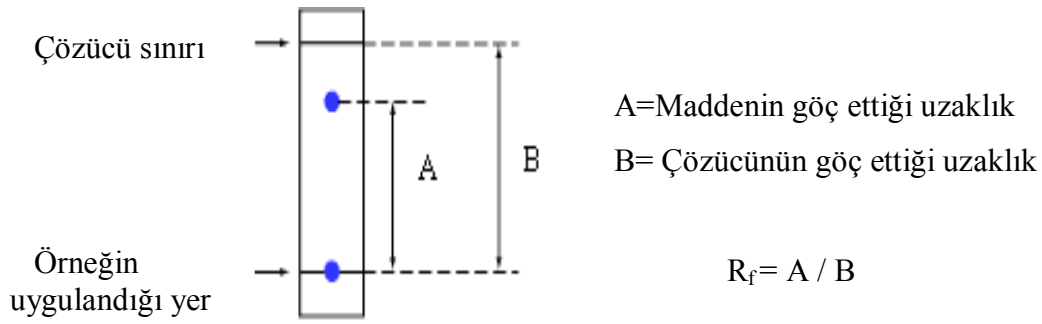
2.2.3.3. Kromatogramın Görüntülenmesi

Yürütme işlemi tamamlandıktan ve plaka iyice kurutulduktan sonra maddelerin yerleri tespit edilir. Eğer maddeler renkli ise tabaka üzerinde kolayca yerleri tespit edilebilir. Renkli olmayan maddeler ile çalışılırken lekelerin yerlerini belirlemek amacıyla kromatogram UV (254 veya 366 nm) ışık altında incelenebilir. Maddelerin çoğu UV ışını absorpladığından bazıları fluoresans gösteren, bazıları da karanlık lekeler halinde gözlenir. Bir başka yol fluoresans içeren tabaka kullanılmasıdır. Böylece plakadaki maddeler uygun dalga boyundaki UV ışık altında, parlak fluoresans zeminde karanlık lekeler halinde görülürler (Ersoy, 1989).

Görünürlüğü ve kimyasal tanımlamayı sağlamak amacıyla renk veren belirteçler kullanılabilir. Plakalar belirtece daldırılabilir fakat tercih edileni püskürtülerek uygulanmasıdır. Belirteçlerin çeşitli kombinasyonları, fonksiyonel grupların ve bilinmeyen maddelerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (Flanagan ve ark., 2007).

2.2.3.4. R_f Değeri (Alıkonulma Faktörü)

R_f değeri, maddenin göç ettiği uzaklığın hareketli fazın göç ettiği uzaklığa oranıdır (Şekil 2.4.), 0-1 arasında değişen bir değerdir ve kromatogramın uzunluğundan (çözücünün başlangıç noktasından göç ettiği uzaklık) bağımsızdır (Ersoy, 1989; Flanagan ve ark., 2007).



Şekil 2.4. R_f değerinin bulunması

R_f değerinin tekrar edilebilirliğini etkileyen birçok faktör vardır; kullanılan plaka, plakaya uygulanan örnek miktarı, yürütme mesafesi, tankın çözücü buharıyla doyma derecesi, ortam şartları (sıcaklık, basınç gibi) ve matris bileşenleri (Flanagan ve ark., 2007).

2.2.3.5. Kalitatif Analiz

Bir kromatogramdan elde edilen veriler, karışımda hangi maddelerin var olduğunu tespit etmeye yetmez. Kalitatif amaçlı çalışmalarda, R_f değerini etkileyen faktörlerin varlığından dolayı örnekle birlikte şüphelenilen maddelerin standartlarının da yürütülmesi gerekir. Örnekte bulunan maddelerin R_f değerleri ile standart maddelerin R_f değerleri karşılaştırılır. Aynı oldukları gözlemlenirse hareketli faz değiştirilerek bir yürütme daha yapılır. Böylece, aynı R_f değeri bulunursa analiz sağlanmıştır ve şüphelenilen madde tespit edilmiş olur (Ersoy, 1989; Gündüz, 2004).

2.2.3.6. Kantitatif Analiz

İnce tabaka kromatografisinde kantitatif analiz iki yöntemle yapılabilir. Birinci yöntemde analiz edilecek olan maddeye ait leke (spot) önce tabakadan kazanıp bir tüpe konur. Daha sonrasında uygun bir çözücünün kullanılmasıyla madde adsorbandan geri kazanılır ve fiziksel veya kimyasal bir yöntemle miktarı tayin edilir.

İkinci yöntemde ölçümler doğrudan doğruya tabaka üzerinde yapılır. Analiz edilecek olan madde ve konsantrasyonları bilinen standart maddeler aynı tabakaya eşit miktarlarda uygulanır. Kromatografi işleminden sonra en basit olarak gözle lekelerin büyüklüğü kıyaslanır fakat bu, hata yüzdesi yüksek yarı kantitatif bir yöntemdir.

Tabaka üzerinde en doğru ölçüm densitometrik yöntem ile lekelerin görünür veya UV alandaki absorbansının veya madde fluoresans özelliğine sahipse fluoresans şiddetinin ölçülmesiyle yapılır. Belli bir dalga boyunda ince tabaka üzerine yollanan ışın yansır. Leke üzerine yollanması halinde ise ışının bir kısmı absorplanır bir kısmı azaltılmış şekilde aynı dalga boyunda yansıtılır. Lekenin konsantrasyonu arttıkça absorplama da artar. Plakanın taranması sırasında boş alandan yansıyan ışının şiddeti ile lekeden yansıyanı arasındaki fark ölçülür. Her bir lekeden elde edilen pik alanları ile konsantrasyon arasında hazırlanan ölçü eğrisinden maddenin miktarı tayin edilir (Ersoy, 1989; Gündüz, 2004).

2.2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC / YPİTK)

TLC geniş çeşitlilikteki maddelerin ayrılmasında, göreceli tanımlanmasında ve yarı kantitasyonunda geleneksel olarak kullanılan kolay, hızlı ve ucuz bir yöntem olarak kabul görmüştür. Metodolojik açıdan bakıldığında geleneksel TLC en basit kromatografik yöntemdir ve kolayca tedarik edilebilecek temel malzeme ve aletlerle uygulanabilmektedir (Fried ve Sherma, 1999).

TLC son 40 yılı aşkın süredir tüm dünyada yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sıklıkla yüksek verimlilikte veya kantitatiflikte bir yöntem olarak dikkate alınmamıştır. Fakat şimdilerde geliştirilmiş olan yüksek performanslı TLC, kompleks karışımları ayırma ve madde kantitasyonu kabiliyetiyle HPLC ve GC ile rekabet edebilmektedir (Fried ve Sherma, 1999). HPTLC ile yapılan miktar tayini sonuçlarının HPLC ve GC sonuçlarıyla kıyaslanabilir olduğunu ortaya konmuştur (Bladek ve ark., 1996). HPTLC ayrıca diğer kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay uygulanabilirlik ve aynı anda çok sayıda örneğin çalışılabilmesi gibi kayda değer avantajlara sahiptir.

HPTLC, “adsorban niteliklerindeki ve plaka yapımındaki gelişmelerin”; “örneğin uygulanması, plakanın yürütülmesi ve densitometrik tarama için en uygun teknik ve donanım kullanımının”; ve “ince tabaka kromatografisinde kullanılagelen kromatografik teorinin çok daha iyi kavranmasının” bir sonucu olarak doğmuştur (Fried ve Sherma, 1999).

Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisinin gelişiminde, plaka teknolojisinin gelişimi etkin rol oynamıştır. İnce tabaka kromatografisinde adsorban olarak yaklaşık 5-10 µm boyutunda oldukça küçük çaplı taneciklerin kullanılması ile ayırmada büyük bir üstünlük sağlanmıştır. Adsorban olarak en çok silika jel kullanılan bu yöntemde plakalarda 10^{-9} ve 10^{-12} g gibi düşük miktarlarda madde ile çalışılabilmekte ve işlem kısa sürede tamamlanmaktadır (Ersoy, 1989; Gündüz, 2004).

Literatürde yüksek performanslı ince tabaka kromatografisinin klasik ince tabaka kromatografisinden daha üstün olduğu ifade edilmektedir. TLC’de gerçekleştirilemeyen ayrımlar HPTLC’de gerçekleştirilebilmektedir. HPTLC geleneksel TLC’ye göre daha hızlı, etkili ve duyarlı bir tekniktir. Güvenilir sonuçlar vermekte ve uygulamada önemli avantajlar sağlamaktadır (Sharma, 2002; Wall, 2005; Halkina ve Sherma, 2006).

Çalışmamızda kullanılan HPTLC sistemi Şekil 2.5.’te yer almaktadır.



Şekil 2.5. HPTLC sistemi.

2.3. Absorpsiyometri

(Dölen, 1989; Gündüz, 2004)

Işığın kimyasal ölçümlerde kullanılması absorpsiyometrinin esasıdır. Monokromatik (tek bir dalga boyuna sahip) bir ışımının ışığa karşı az ya da çok oranda geçirgen olan bir maddenin homojen bir katmanı üzerine düşmesi durumunda ışımının bir bölümü yansır, bir bölümü madde katmanından geçer ve bir bölümü de ortam tarafından absorplanır. Yansımanın olmadığı veya önemsiz düzeyde olduğu varsayılırsa absorplanan ışımının şiddeti, maddeye giren ve maddeden çıkan ışımaların şiddetleri arasındaki farka eşittir.

Monokromatik bir ışığın absorplayıcı bir ortamdan geçmesi sırasında ışık şiddetindeki azalma, ışığın yolu üzerindeki absorplayıcı molekül sayısı ve ışığın şiddeti ile orantılıdır.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A = Absorbans

I_0 = Giren ışığın şiddeti

I = Çıkan ışığın şiddeti

ϵ = Molar absorblama katsayısı

b = Geçiş yolu uzunluğu (Birimi cm'dir.)

c = Konsantrasyon (Birimi g/l'dir.)

Işığın absorplayıcı bir ortamdan geçişine ilişkin olan bu bağıntı **Lambert-Beer yasası** olarak adlandırılır.

Absorpsiyon spektroskopisi veya spektrofotometri, maddelerin belirli bir dalga boyundaki elektromanyetik ışımayı absorplamalarının ölçümü yoluyla tanınması ve miktarlarının tayinine ilişkin işlemleri kapsar. Absorplanan dalga boyu bunu absorplayan moleküllerin yapısına bağlıdır. Buradan giderek maddenin yapısı konusunda bilgi edinilebileceği gibi, belirli bir dalda boyundaki absorpsiyon madde konsantrasyonu ile orantılı olduğundan miktar tayini de yapılabilir.

Bir çözeltilinin veya maddenin absorbansının veya geçirgenliğinin (maddeden çıkan ışığın şiddetinin giren ışığın şiddetine oranı) dalga boyuna karşı değişimini veren eğrilere absorpsiyon eğrisi veya *maddenin absorpsiyon spektrumu* denir. Bu eğriler yardımıyla maddeler tanınabilir. Bir bileşiğin spektrumu onun imzası gibidir. Bilinmeyen bileşiğin spektrumu bilinen bileşiklerin spektrumlarıyla karşılaştırılır. Tanıma için spektrumun önemli karakteristikleri, maksimumların dalga boyları ve absorbanslarıdır. Absorpsiyon spektrumu belirleyici olmayıp yol göstericidir. Bilinen ve bilinmeyen maddelerin spektrumlarının çakıştığı dalga boyu aralığının genişliğinin artışı ve daha karmaşık spektrumlar durumunda tanınabilirlik daha belirgindir.

Kalitatif analiz amacıyla çoğu kez log A'nın dalgaboyuna karşı değişim grafiği çizilir. Spektrumun biçiminin, geçiş yolu ve konsantrasyona bağlı olmayıp yalnız maddenin özelliklerine bağlı olması istenilir.

Spektrofotometrik olarak yapılan kantitatif tayinlerin genel ilkesi örnek çözeltisi ile bir dizi standart çözeltinin belirli bir dalga boyundaki elektromanyetik ışımaya absorplamalarının karşılaştırılmasına dayanır. UV bölge özellikle organik maddelerin kantitatif ve kantitatif tayinlerinde önemlidir. Kantitatif tayinler genel olarak Beer yasasına dayanır. Absorbans konsantrasyon ile doğru orantılıdır.

Tayin edilen maddenin absorpsiyon spektrumu bilinmiyorsa önce spektrum alınır. Maddenin spektrumuyla çalışılacak dalga boyu aralığı seçilir. Maksimum duyarlılık için maksimum absorpsiyona yakın bir dalga boyu seçilmeli, seçilen dalga boyu absorbansın dalga boyu ile hızla değişmediği bir aralıkta olmalıdır. Daha sonrasında, tayini yapılacak maddenin çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanarak absorbansları ölçülür ve absorbansın konsantrasyona göre değişimini gösteren kalibrasyon eğrisi çizilir. Örneğin aynı koşullarda absorbansı ölçülerek kalibrasyon eğrisinde karşılık gelen konsantrasyon belirlenir.

UV ve görünür bölge için farklı dalga boylarında değişik **ışık kaynakları** gerekir. Hidrojen, döteryum lambaları 180–380 nm, tungsten lamba 320–2500 nm aralığında ışımaya vermektedir.

Monokromatörler, polikromatik ışıktan tek dalga boylu ışın elde etmek amacıyla geliştirilmiş olan düzeneklerdir. Monokromatörler tek dalga boylu ışınları art arda verebilirler. Böylece geniş bir dalga boyu aralığı araştırılabilir. Buna *tarama* denir. Monokromatize edilmiş ışımının monokromatörden çıktığı **slit (yarık)** genişliği ölçümler açısından önemlidir. Slit genişliği daraldıkça çıkan ışının dalga boyu aralığı da daralır. Bir spektrofotometrenin birbirinden hafifçe farklı iki dalga boyunu ayırt etme yeteneği monokromatörün slitinden çıkan dalgaboyu bandının oluşturduğu görüntünün genişliğine bağlıdır. Slit aralığı daraldıkça spektrum daha ayrıntılı hale gelir ve spektrumdan daha çok bilgi elde edilir. Ayrıca, piklerin genişliği azalır ve boyları yükselir.

Dedektörler, kullanılmak üzere tasarlandıkları dalga boyları aralığındaki bütün ışın enerjilerini aynı hassaslıkta ve süratle elektrik sinyaline çeviren cihazlardır. Böylece ışın enerjisi ölçebileceğimiz elektrik enerjisine dönüşmüş olur. UV ve görünür alanda en yaygın olarak kullanılan dedektörler **fototüp** ve **fotoçoğaltıcı** dedektörlerdir.

Fototüpler, üzerine fotohassas bir madde kaplanmış ve bir vakum tüpüne yerleştirilmiş yarı silindirik geniş bir katotla bir tel anottan meydana gelir. Fotohassas yüzey üzerine düşen ışınlar şiddetleriyle orantılı olarak elektron açığa çıkarırlar, fırlayan elektronların sayısı, yüzey üzerine düşen ışının şiddetiyle doğru orantılıdır. Pozitif anot tarafından fırlayan elektronlar çekilerek toplanır ve elektron akımı devreden bir akım geçmesine neden olur.

Fotoçoğaltıcı dedektörler, fototüplere benzer. Bunlarda farklı olarak fotonların çarptığı katottan başka, dinot adı verilen elektrona hassas katotlar vardır. Katottan fırlayan elektronlar buraya çarparak yeni elektronlar fırlatırlar. Bir tüpte birçok dinot bulunur ve sonuç olarak akım elektronik olarak milyonlarca defa şiddetlendirilmiş olur. Bu dedektörler düşük güçteki ışınlar için kullanılırlar ve son derece hassas, duyarlı ve hızlıdırlar.

2.3.1. Densitometri

Densitometri, optik yoğunluğun sayısal olarak ölçümüdür. İnce tabaka kromatografisinde densitometri kullanımının temel yararı kromatogramın kantitasyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu, modern TLC'nin HPLC ve GC ile karşılaştırılabilir, güvenilir bir kantitatif analitik araç olarak kabul edilmesinin başlıca koşuludur.

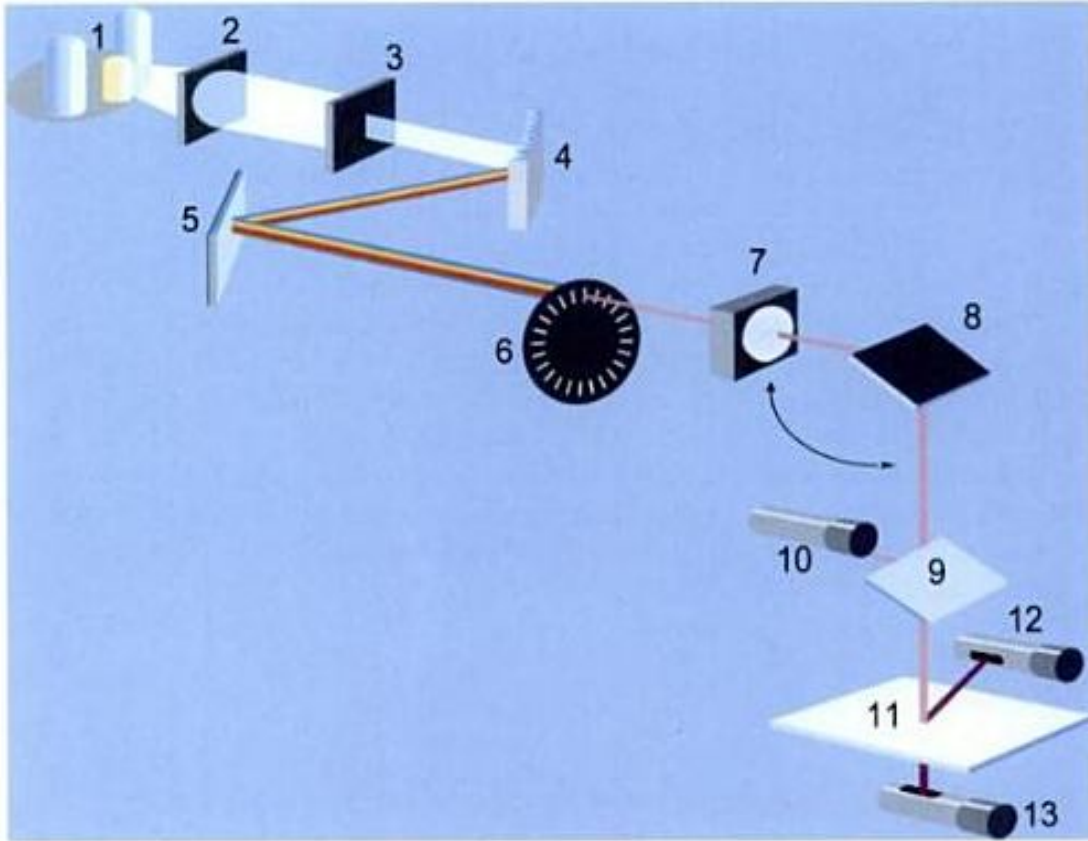
Bütün ölçümler bilinen bir maddenin bilinmeyenle karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bilinen standart maddelerin yardımıyla sistem kalibre edilebilmektedir. TLC'deki herhangi bir kalibrasyon sadece mevzubahis olan tek bir plaka için geçerlidir. Standartlar ve bilinmeyen maddeler aynı plakada yan yana kromatografiye edilmek zorundadır. Tam olarak aynı analiz uygulanıyor olsa bile, pratikte her TLC plakası farklı davranmaktadır. Aynı set standartlar ölçüm sırasında farklı plakalarda farklı mutlak değerler verebiliyor olsa bile, aynı bilinmeyen için kalibre sonuçlar her iki plakada eşit olacaktır (Reich ve Schibli, 2006).

Densitometrik tarama

HPTLC’de en doğru ölçümleri densitometrik tarama sunmaktadır. Spektral seçicilik özelliği büyük bir avantaj sağlamaktadır çünkü 190–800 nm dalga boyu aralığında monokromatize ışın kullanılabilen ve söz konusu maddenin maksimum absorbans/floresansı yakalanıp yüksek hassaslıkta ölçüm sağlanabilmektedir. Tipik dedeksiyon limitleri düşük nanogram seviyesinde (absorbans) veya orta pikogram seviyesindedir (floresans) (Reich ve Schibli, 2006).

Densitometre

Bir densitometre başlıca; bir ışık kaynağı, bir monokromatör ve bir dedektör sisteminden oluşur. Çalışmamızda da kullanılan CAMAG TLC Scanner 3 densitometrik tarayıcının yapısı Şekil 2.6.’da gösterilmektedir. UV ışığının 190–450 nm dalga boyu aralığında devamlı spektrumunu sunan döteryum lambası yanında modern cihazlar ayrıca tungsten lamba (370–800 nm) ve civalı basınç lambası (254 ve 366 nm) içermektedir. Lensler, aynalar ve bir monokromatörden oluşan optik sistem, istenen dalga boyunda dar bir ışık bandının kullanılmasını ve plakaya ulaşmasını sağlamaktadır. Plakadan yansıyan ışın bir fotoçoğaltıcı tarafından ölçülür. Bazı durumlarda geçirgenlik de ölçülebilir. Bütün operasyon software kontrolü altındadır ve absorbans/floresansın her ayrı örnek zonu için tanımlanmasına imkan vermektedir. Sonuç densitogram birleştirilebilmekte ve kantitatif değerlendirme yapılabilmektedir (Reich ve Schibli, 2006).

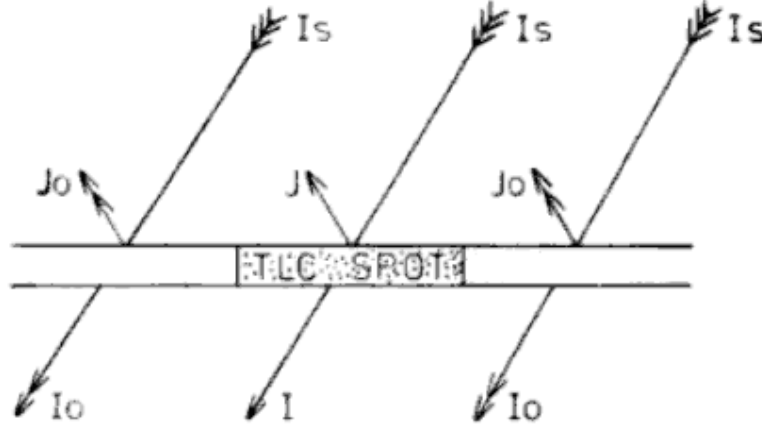


Şekil 2.6. CAMAG TLC Scanner 3'ün şematik yapısı: 1, lamba seçici; 2, giriş lensi; 3, monokromatör giriş sliti; 4, monokromatör grating; 5, ayna; 6, slit seçici; 7, lens; 8, ayna; 9, ışın dağıtıcısı; 10, referans fotoçoğaltıcı; 11, TLC plakası; 12, fotoçoğaltıcı (yansımaya); 13, fotoçoğaltıcı (geçirgenlik) (Reich ve Schibli, 2006).

Modern bilgisayar kontrollü densitometreler, absorbansın veya floresansın standardın konsantrasyonuna olan oranını gösteren lineer veya polinomial kalibrasyon eğrileri üretebilir ve buradan otomatik olarak ara değerini bulma ile bilinmeyen konsantrasyonunu hesaplayabilirler. Bant şeklindeki zonlar, yuvarlak spotlardan daha iyi kantitatif sonuçlar vermektedir (Sherma, 2005).

Spektrometrinin temeli olan genel Lambert-Beer Kanunu densitometri için geçerli değildir çünkü ışının absorpsiyonu ve saçılımı, direkt tabaka üzerinde zon ölçümü sırasında meydana gelmektedir (Sherma, 2005).

Silika tabaka saydam değildir ama karmaşık optik bir ortamdır. Işın tabakanın arasından geçer ve özgül parçacıkların sınırlarındaki çoklu saçılma sebebiyle kısmen geri yansır (Şekil 2.7.) (Huf, 1987).



Şekil 2.7. Işığın silika tabakada taşınımı. I_s , belli bir dalga boyunda tabakaya yolanan ışın; I_o , boş tabakadan geçen ışın; I , spottan geçen ışın; J_o , boş tabakadan yansıyan ışın; J , spottan yansıyan ışın (Huf, 1987).

Partikül boyutu, tabaka kalınlığı, nem, asidite gibi farklı parametreler ışın absorpsiyonunu ve saçılmasını etkileyebilir. Işının saçılmayı sağlayan bir ortamda absorpsiyonunu tanımlayan birkaç teori mevcuttur. Densitometriye genellikle uygulanan teori Kubelka ve Munk'in teorisidir (Huf, 1987).

Kubelka-Munk teorisi yansıma ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi ifade etmektedir.

$$F(R) = (1-R)^2/2R = k/s = Ac/s$$

R = yansıma

k = absorplama katsayısı

s = saçılma katsayısı

c = absorpsiyon yapan maddenin konsantrasyonu

A = absorbans

Genellikle densitometrik yöntemler, madde konsantrasyonu ile yansımanın ve/veya geçirgenliğin ölçülen optik miktarı arasındaki ilişkiye dayanmaktadır (Huf, 1987).

Ölçüm biçimleri

Densitometri **absorbans** ve **floresans** modunda gerçekleştirilebilir. Absorbans ölçümünde plakadan yansıyan ışın, ışın bandı örneğin absorplama zonuna çarptığı zaman küçülen temel sinyali temsil etmektedir. Sinyal elektronik olarak dönüştürülür ve absorbans densitogramda pozitif bir pik olarak sunulur. Absorbans prensip olarak yansıma veya -tabakanın karşı tarafına yerleştirilen bir dedektör yardımıyla geçirgenlik modunda ölçülebilir. Fakat geçirgenlikte tabakadaki düzensizlikler sonucu etkileyecektir ve ayrıca cam plakalar UV ışığının geçmesine izin vermemektedir. Floresans ölçümünde, uyarıcı UV ışınımını tutmak ve yayılan görünür floresansı geçirmek için tabaka ve dedektör arasına bir kesme filtre yerleştirilmesi gerekir (Reich ve Schibli, 2006).

Spektral ölçüm

UV spektrumunun plaka üzerinde yerinde ölçümü için ışın bandı ayrılan bir beneğin üzerine yönlendirilir. Işının dalga boyu arzu edilen spektral aralığı kaplayana kadar sürekli değiştirilir. UV spektrumundan iki önemli bilgi edinilebilir: ilki bileşenin maksimum absorbansı, ikincisi tanımlanması. Elde edilen bir spektrum kütüphanede bulunan spektrumlarla karşılaştırılıp bilinmeyen maddenin tanımlanması yapılabilir (Reich ve Schibli, 2006).

2.4. Örnek Hazırlama

Organik kirleticiler için çevresel örneklerin analizi sıklıkla birçok aşamayı içeren karmaşık bir prosedürdür. Analizin etkinliği analizin öncesinde gerçekleştirilen birçok işlemde temellenmektedir. Bu işlemler, örnekleme stratejisini, örneğin saklanması, ön muamelesini, örnek ekstraksiyonunu ve gerekliyse temizlemeyi ve/veya önderiştirmeyi içermektedir (Dean, 1998).

Çevresel analiz örneklerini; sıvı (örn. ırmak suyu), gaz (örn. hava) veya katı (örn. toprak, sediment) şeklinde tanımlayabiliriz.

2.4.1. Toprak Analizi

Toprak; mineraller, organik madde, su, hava ve içinde yaşayan organizmaların bir karışımıdır. Mineral partiküller kayalardan köken alan inorganik materyallerdir ve çok çeşitli büyüklüklerdeki kristal yapılardır. Topraktaki mineral maddenin çoğunluğunu sekiz kimyasal element meydana getirmektedir. Bu elementlerden ağırlık ve hacimce en fazla bulunanı oksijendir. Diğer elementler sırasıyla, silisyum, alüminyum, demir, magnezyum, kalsiyum, sodyum ve potasyumdur. Bu elementlerin iyonları çeşitli oranlarda birleşerek farklı mineralleri meydana getirmektedir. Ayrıca, toprak ve yer kabuğunda, düşük miktarlarda olmak üzere seksenden fazla farklı element daha bulunmaktadır.

Toprağın organik maddesi, yaşayan organizmalardan ve bu organizmaların metabolizma ürünleri ile kalıntılarından ibarettir. Ağırlık olarak toprak kitlesinin %10'undan daha azını temsil etmesine rağmen toprağın kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Topraktaki organik madde esas olarak karbon, hidrojen, oksijen, nitrojen ve daha küçük miktarlarda sülfür ve diğer elementlerden oluşmaktadır. Organik materyaller, topraktaki organizmalar tarafından mineral bileşenler ile reaksiyona sokularak organo-mineral bileşikleri oluşturmak üzere değişime uğratılmakta veya dönüştürülmektedirler.

Toprağın organik maddesi, polar ve apolar organik moleküllerin absorbe edildiği reaktif yüzeyler kadar iyi bir anyon ve kation değişim kapasitesine sahiptir. Bu yüzden eklenen organik ve inorganik materyaller toprağın organik maddesi ile etkileşime girmektedir (Juma, 2001; <http://organiclifestyles.tamu.edu/soilbasics/soilchemical.html>).

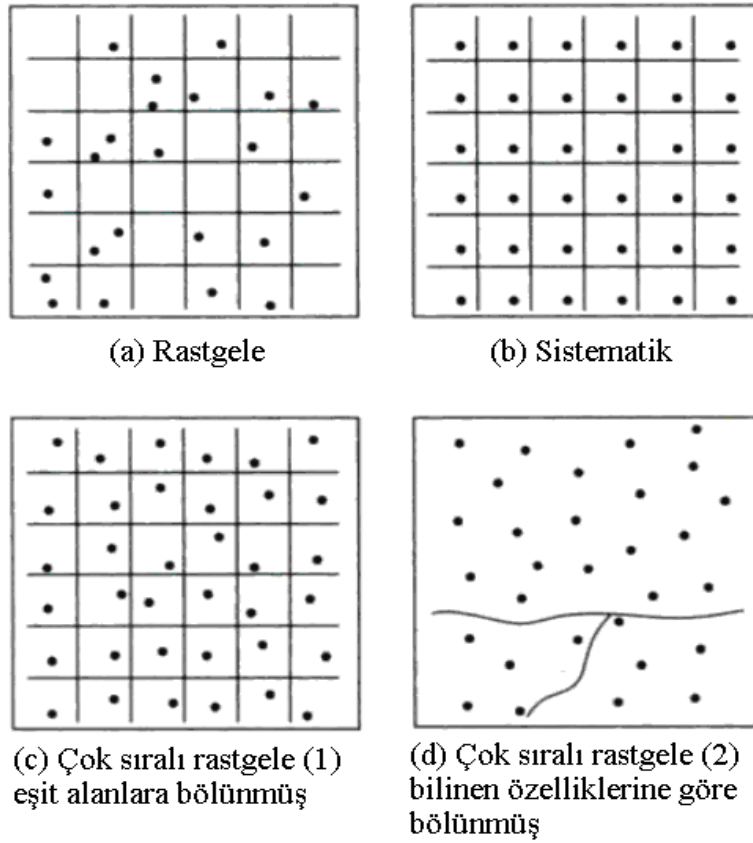
Toprak, çevreyi kirleten maddelerin yeryüzündeki biyokimyasal döngüsünde önemli rolü ve gıdanın elde edildiği ortam olmasındaki hayati rolü nedeniyle çevresel analizler arasında büyük önem taşımaktadır (Radojević ve Bashkin, 1999).

Yirminci yüzyılın başlarından itibaren modern tarıma geçilmesi ve sanayileşmenin hızlı artışıyla beraber, toprak kirliliği de bir çevre sorunu olarak ortaya çıkmaya başlamıştır ve toprak kirliliğine neden olan önemli faktörlerden biri de pestisitlerdir (http://www.cevreorman.gov.tr/toprak_01.htm).

Toprakta pestisit kalıcılığını etkileyen faktörler; toprak kompozisyonu, toprağın kimyasal yapısı ve mikrobiyal aktivitedir. Kil parçacıkları, amorf mineral maddeler ve organik maddeler, emilimi kontrol eden toprak bileşenlerini oluşturmaktadır. Organik madde içeriği yüksek olan topraklarda kalıcılık daha fazladır (Curran, 1998; Ali ve Baugh, 2003).

Toprak heterojenik bir materyaldir ve küçük bir alanda bile önemli derecede fiziksel ve kimyasal farklar gösterebilmektedir. Toprak gibi homojen olmayan ortamların örnekleme bu yüzden zorluklar içermektedir (Dean, 2003).

Herhangi bir örneklemenin temel amacı, toplam küleden temsili bir parça elde etmektir. Örneklemede kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (Şekil 2.8.). Öncelikle gerçekleştirilecek analizin amacına uygun olarak toprağın ne zaman, nereden ve hangi derinlikten, ne kadar miktarda toplanması gerektiği belirlenmelidir (Dean, 1998).



Şekil 2.8. Örneklemeye için kullanılan temel yöntemler (Dean, 2003).

Toprak örneklerinin ön işlemleri, kurutma, öğütme, eleme ve karıştırma aşamalarını içermektedir. Kurutma oda koşullarında, fırında veya dondurarak yapılabilmektedir. En uygun yöntem, analizi yapılacak olan maddeye göre belirlenmelidir.

Toprak kurutulduktan sonra topaklanmış parçaları gidermek ve tane büyüklüğünü küçültmek için öğütülür. Öğütme havan kullanılarak gerçekleştirilebilir. Daha sonrasında odun ve bitki parçacıkları gibi istenmeyen maddeleri ortamdan uzaklaştırmak için elenir. Eleme, büyük oranda kimyasal etkinlik göstermeyen iri parçalı feldspar ve karbonat mineralleri gibi toprak fraksiyonlarını da azaltacaktır. Öğütmek ve eleme partikül büyüklüğü bakımından standardizasyonu sağlamak için gereklidir. Eleme işleminden sonra homojenize toz haline gelmiş toprak örnekleri analize kadar uygun koşullarda saklanır (Petrovic, 2007).

2.4.2. Ekstraksiyon

Katı ve sıvı haldeki bir karışımdan bir veya birkaç maddeyi, bunları çözen bir çözücü yardımıyla ayırmaya ekstraksiyon denir. Ekstraksiyon, katılardan ve sıvılardan olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Tulus ve İmre, 1989).

Katıların ekstraksiyonu, çok bileşenli bir katıdan istenilen bileşenin bir çözücü ile çözülerek ayrılmasıdır. Sıvılardan ekstraksiyona benzer bir işlem gibi gözükmesine rağmen katı maddelerin ekstraksiyonu daha zor bir süreçtir. Çünkü katı içinde difüzyon sıvı içindeki difüzyondan çok daha yavaştır ve bu yüzden dengeye ulaşması daha zordur (www.mm.anadolu.edu.tr/kimya/deneyler2/Deney5.pdf).

Soxhlet ekstraksiyonu, sıvı-katı ekstraksiyon katı örneklerin ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel yöntemlerdendir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde uzun sürelerle ve büyük miktarlarda çözücüye ihtiyaç duyulmaktadır. Ekstraksiyon süresini kısaltan, çözücü tüketimini azaltan, çevre dostu yeni ekstraksiyon tekniklerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Ultrasonik, mikrodalga destekli, süperkritik ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon sistemleri hızlı ve etkilidirler. Bu tekniklerde yüksek basınç ve/veya yüksek sıcaklıklarda çalışma imkanının olması ekstraksiyon süresini büyük oranda azaltmaktadır (Tavman ve ark., 2009).

2.4.2.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon

Organik kirleticilerin topraktan ekstraksiyonu en yaygın olarak geleneksel sıvı-katı ekstraksiyon yöntemiyle yapılmaktadır. Geleneksel sıvı-katı ekstraksiyonun çalkalama yöntemiyle yapılan formunda, toprak örneği uygun bir cam erlene konup üzerine organik çözücü ilave edildikten sonra belirli bir zaman periyodu için dairesel hareketlerle mekanik bir çalkalayıcıda çalkalanır.

Ekstraksiyondan sonra analiti içeren çözücünün santrifüjleme ve/veya filtrasyon ile matriksten ayrılması gerekmektedir (Dean, 1998).

2.4.2.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

Sonikasyon olarak ta bilinen ultrasonik ekstraksiyonda örnekle çözücü arasında yakın temas sağlamak amacıyla ses dalgaları kullanılır (Kou ve Mitra, 2003). Bu işlem ultrasonik bir prob veya banyo kullanılarak uygulanabilir. Banyolar daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Örnek uygun bir kaba alınır, üstünü kaplayacak miktarda yeterli organik çözücü ilave edilir ve içinde su bulunan ultrasonik bir banyoya batırıldıktan sonra belirli süre ekstakte edilir (Dean, 1998). Örneğin her seferinde aynı miktarda taze çözücü kullanılarak iki veya üç defa daha ekstakte edilmesi gerekebilir. Her ekstraksiyon tekrarından sonra elde edilen ekstraktlar bir araya getirilir. 20 ppm'in üzerinde yüksek konsantrasyondaki örnekler için, örneğin 2 gramının 10 ml çözücü ile tek seferde ekstraksiyonu yeterli olabilmektedir (Kou ve Mitra, 2003).

Toprak ekstraksiyonlarında ultrasoniğin kullanılmasının en büyük yararı ekstraksiyon prosedürü sırasında sonik enerjinin bir sonucu olarak toprak partiküllerinin ufalanmasıdır. Bu toprağın yüzey alanını arttırmakta ve çözücünün toprak matriksine daha iyi nüfuz etmesini sağlamaktadır. Ayrıca mekanik titreşimler, toprak partiküllerini saran çözücü katmanını hızla değiştirmekte ve analitin katı yüzeyden çözücüye kütle transferine yardımcı olmaktadır (Synder, 2004). Bu şekilde katı-sıvı ara yüzeyinde ultrason etkisiyle mikrodüzeyde karışma gerçekleşmekte ve böylelikle sıvıdaki taşınım artarak kütle transferine olan dış direnç düşmektedir (Pugin ve Turner, 1990).

Ultrasonik ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve hızlı olması nedeniyle geleneksel ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatiftir. Ultrasonun ekstraksiyonda kullanılmasının başlıca yararları hızlı kinetik ve verim artışıdır. Ayrıca ultrason, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılmaktadır (Tavman ve ark., 2009).

2.4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalgalar 0.3–300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır. İkinci dünya savaşından beri kullanılan mikrodalga enerjisinin, analitik laboratuvarlarında ısıtma kaynağı olarak kullanılmaya başlanması 1970'lerin sonunu bulmuştur. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar örneğin tamamını aynı anda ısıtmaktadır ve çözücü kaynama noktasına çok hızlı bir şekilde varmaktadır. Mikrodalga ısıtması zayıf hidrojen bağlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Serbest kalan iyonların göçü, çözücü moleküllerinin matrikse nüfuz etmesini kolaylaştırmakta ve bu, ekstrakte edilen bileşenlerin çözünmesine imkan vermektedir. Bu ekstraksiyon tekniği, özellikle orta ve yüksek polarlıktaki bileşenlerin katı matrislerden ekstraksiyonunda gelecek vaad etmektedir.

Mikrodalgaları kullanırken ekstraksiyon kabı içersindeki radyasyonu absorplayacak bir bileşene ihtiyaç vardır. Su iyi bir mikrodalga absorplayıcı olduğu için örnek ya da çözücü sistemi su ihtiva ediyorsa bir problem yoktur. Eğer etmiyorsa çözücü sistemi en az bir tane yüksek polariteye sahip bileşen içermelidir.

Çözücü içeriği, uygulanan mikrodalga gücü, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı ekstraksiyonun verimliliğini etkileyen parametrelerdendir.

Mikrodalga ekstraksiyonu, yaygın olarak, sıcaklık ve basınç kontrolü altında, kapalı Teflon kaplarda (vessel) gerçekleştirilmektedir. Teflon kaplar yüksek basınca dayanıklıdır ve ekstraksiyon sıcaklığının 250–300°C'ye kadar çıkarılabilmesine imkan vermektedir. Aynı anda altıdan onikiye kadar örneğin ekstrakte edilebilmesi, kullanılan çözücü miktarının ve ekstraksiyon süresinin az olması mikrodalga ekstraksiyonunun avantajlarından (Kaufmann ve Christen 2002; Kaufmann ve ark., 2007; Reeve, 2002; Castro ve García, 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

α -Cypertmethrin (%99.8)	Fluka
Metanol	Sigma
Toluen	Sigma
Hekzan	Sigma
Diklormetan	Sigma
Aseton	Sigma
Azot	

Bu çalışmada gerek ekstraksiyon aşamasında gerekse kromatografi aşamasında kullanılan tüm çözücülerin ticari olarak yüksek saflıkta olanları tercih edildi.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

CAMAG HPTLC (YPİTK)

- **Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4):** Uygulama ünitesi
- **Automatic Development Chamber (ADC 2):** Yürütme ünitesi
- **TLC Scanner 3:** Tarama ünitesi

Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex
Mikrodalga fırın	Cem Mars 5
Elektronik hassas terazi	Precisa
Vortex	IKA Yellow Line
Santrifüj	Hettic Universal 320R
Mekanik çalkalayıcı	GFL 3017
Döner buharlaştırıcı	Heidolph Laborota 4003

Etüv	Termal Laboratuvar Aletleri
Buzdolabı	Arçelik
Otomatik Pipet	Eppendorf
- 10-200 µl	
- 200-1000 µl	
Silica gel 60 F ₂₅₄ HPTLC cam plaka	Merck
Enjektör ucu filtre (RC-45/25)	Chromafil

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Standart Çözeltiler

Piretroid grubunun bir üyesi olan α -cypermethrin standardına (%99.8) ait çözeltiler aşağıda bildirildiği şekilde hazırlandı. +4°C'de muhafaza edildi ve kullanımlarından önce oda sıcaklığına getirildi.

α -Cypermethrin stok çözeltisi (1000 µg/ml): 50 mg α -cypermethrin tartıldı, 50 ml hacme balon jodede metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (750 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 7.5 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (500 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 5 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (250 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 2.5 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (125 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 1.25 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (50 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 0.5 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (25 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 0.25 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (15 µg/ml): Hazırlanan 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 0.15 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (12.5 $\mu\text{g/ml}$): Hazırlanan 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik stok çözeltisinden 0.125 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (10 $\mu\text{g/ml}$): Hazırlanan 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik stok çözeltisinden 0.10 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

α -Cypermethrin test çözeltisi (5 $\mu\text{g/ml}$): Hazırlanan 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik stok çözeltisinden 0.05 ml alındı ve 10 ml balon joje içinde hacme metanol ile tamamlandı.

Stok çözeltileri, kalibrasyon eğrilerini hazırlamada ve geri kazanım çalışmalarında kullanıldı.

3.3.2. Çözücü Sistemleri

3.3.2.1. Hareketli Fazın Hazırlanması

Hekzan / Toluen (1:1)

5 ml hekzan ile 5 ml toluen karışımı her yürütmeden önce taze olarak hazırlandı.

3.3.2.2. Ekstraksiyon Çözücülerinin Hazırlanması

Hekzan / Diklormetan (1:1)

10 ml hekzan ile 10 ml diklormetan karışımı, örnek sayısı miktarınca ekstraksiyonlardan önce taze olarak hazırlandı.

Hekzan / Aseton (1:1)

10 ml hekzan ile 10 ml aseton karışımı, örnek sayısı miktarınca ekstraksiyonlardan önce taze olarak hazırlandı.

Aseton

Tek bir örnek için 20 ml olmak üzere örnek sayısı miktarınca kullanıldı.

Toluen

Tek bir örnek için 20 ml olmak üzere örnek sayısı miktarınca kullanıldı.

3.4. Örnek Hazırlama

3.4.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Toprak örnekleri, Adapazarı İli'ndeki α -cypermethrin ile ilaçlandığı bilinen yaklaşık 12 dekar büyüklüğündeki bir karpuz tarlasından 15 adet analizi yapılacak örnek ve 2 adet kontrol grubu (tarla sınırının 10 metre uzağından) olarak toplandı. Bu örnekler ilaçlama tarihinden 1 hafta sonra, 0-20 cm derinlikten, ilaçlanan bitkilerin dibinden ve bitki ekim sıralarının (karık) aralarından olmak üzere rastgele örnekleme yöntemiyle toplandı.

Ayrıca, yaklaşık 20 yıldır herhangi bir pestisitle muamele edilmemiş aynı ildeki bir bahçeden 0-20 cm derinlikten toplanan topraklar da kontrol amaçlı kullanıldı.

3.4.2. Toprak Örneklerinin Hazırlanması

3.4.2.1. Ön İşlemler

Toplanan tüm toprak örnekleri öncelikle oda koşullarında kurutuldu ve homojen oluncaya dek karıştırıldı. Daha sonra bir havan kullanılarak öğütüldü ve metal bir elekten geçirildi. Homojenize hale gelmiş toprak örnekleri, kimyasal analize kadar gün ışığına maruz kalmayacak bir şekilde, oda ısısında, kapaklı örnek kaplarında muhafaza edildi.

3.4.2.2. Katım Örneklerinin Hazırlanması

Katım; herhangi bir pestisitle muamele edilmemiş ve ön işlemlerden geçirilmiş 5 g ağırlığındaki toprak örneklerine farklı konsantrasyonlarda metanolde hazırlanmış α -cypermethrin standart çözeltilerinin 1 ml eklenmesiyle hazırlandı. Katım yapılan örnekler vortekslenildi ve ekstraksiyondan önce 1 gece oda ısısında bekletildi.

3.5. Ekstraksiyon

Çalışmamızda sıvı-katı ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon ve mikrodalga ekstraksiyonu olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi denendi. Her üç ekstraksiyon yöntemi için de uygun koşulları sağlamak üzere optimizasyon yapıldı.

Ekstraksiyonda kullanılacak en uygun çözücü sistemini seçmek için hekzan:diklormetan (1:1), aseton, toluen ve hekzan:aseton (1:1) denenerek hekzan:diklormetan (1:1) kullanımına karar verildi.

Ekstraksiyon yöntemlerinin verimlilikleri kıyaslanarak tarladan alınan toprak örneklerinin analizi için en uygun olanı belirlendi.

3.5.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon

5 g toprak örneği 50 ml'lik şilifli bir erlende 20 ml hekzan:diklormetan (1:1) çözücü karışımı ile mekanik çalkalayıcıda oda ısısında 12 saat boyunca (150 devir/dk) çalkalandı. 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Ekstrakt, enjektör ucu filtreden geçirildikten sonra organik faz, döner buharlaştırıcıda 40°C'de tamamen buharlaştırıldı. Kalıntı tümüyle cam tüpe aktarılarak azot gazı altında uçuruldu. 1 ml hekzan:diklormetan (1:1) ilave edildi ve vortekslendi. HPTLC sisteminde analiz edildi.

3.5.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

5 g toprak örneği 50 ml'lik bir polipropilen santrifüj tüpüne tartıldı ve üzerine 20 ml hekzan:diklormetan (1:1) çözücü karışımı eklendi. Kapağı kapatıldıktan sonra ultrasonik banyoda 30 dk 40°C'de ekstre edildi. Örnek 5000 rpm' de 5 dk santrifüjlendi, ekstrakt başka bir tüpe aktarıldı. Kalan toprak üzerine tekrar 20 ml hekzan:diklormetan (1:1) çözücü karışımı eklendi ve ekstraksiyon süreci bir kez daha tekrarlandı. Elde edilen ekstraktlar birleştirilip enjektör ucu filtreden geçirildikten sonra 40°C'de döner buharlaştırıcıda kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kalıntı tümüyle cam tüpe aktarıldı ve çözücü azot gazı altında uçuruldu. 1 ml hekzan: diklormetan (1:1) ilave edilip vortekslendikten sonra HPTLC sistemi ile analiz edildi.

3.5.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

5 g toprak örneği Teflon mikrodalga kaplarına kondu ve 20 ml hekzan:diklormetan (1:1) çözücü karışımı ilave edildi. Teflon kaplar sıkıca kapatıldıktan sonra mikrodalga fırına yerleştirildi. Ekstraksiyon, 1600 W (12 adet örnek için), %100 mikrodalga gücünde, sıcaklık ve basınç kontrolü altında 2 basamakta gerçekleştirildi. İlk basamakta sıcaklık 5 dk'da 75°C'ye çıkarıldı ve 5 dk boyunca 75°C'de tutuldu. İkinci basamakta sıcaklık 5 dk'da 100°C'ye yükseltildi ve 5 dk boyunca 100°C'de tutuldu. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra mikrodalga kapları dışarı çıkarılıp açıldı ve ekstrakt santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Enjektör ucu filtreden geçirildikten sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'de kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kalıntı, tümüyle cam tüpe aktarıldı. Organik faz azot gazı altında uçuruldu. 1 ml hekzan:diklormetan (1:1) ilave edilip vortekslelendikten sonra HPTLC sistemi ile analiz edildi.

3.6. HPTLC Analizi

Çalışmamızda 20 x 10 cm boyutlarında silika jel 60 F₂₅₄ HPTLC cam plaka (Merck Kat. No: 1.05649) kullanıldı. Plakalar kullanımdan önce bir kez metanol ile doyuruldu ve etüvde 100°C'de 20 dk kurutuldu. Standart kalibrasyon çözeltileri ve çalışma örnekleri 1 µl, tarladan alınan toprak örnekleri ise 10 µl hacimde, bant uzunluğu 5 mm olacak şekilde plakaya uygulandı. Hareketli faz olarak 10 ml hekzan:toluen (1:1) çözücü sistemi kullanıldı. Plaka 80 mm'ye kadar yürütüldü ve 5 dk sıcak hava akımında kurutuldu. Ayrımın sağlanmasının ardından plaka densitometrik tarama ünitesine yerleştirildi. Tarama parametreleri, döteryum lambası dalga boyu, 220 nm; slit ölçüleri, 4.00 x 0.10 mm; tarama hızı, 20 mm/s olacak şekilde seçildi. Spektrumlar 200 ile 400 nm arasında 20 nm/s hızla kaydedildi. Kantitatif analiz için tek dalga boylu reflektans modunda elde edilen pik alanı dikkate alındı.

3.7. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

α -Cypermethrinin kalibrasyon çözeltileri 5–1000 $\mu\text{g/ml}$ (5–10–12.5–25–50–125–250–500–750–1000 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyon aralığında, ana stok çözeltisinin (1000 $\mu\text{g/ml}$) metanol ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

3.7.1. Ekstraksiyon Yöntemleri İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

3.7. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan standart çözeltilerle sistem gereği her ekstraksiyon yöntemi için ayrı kalibrasyon eğrileri hazırlandı.

Ayrıca, 5–1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltiler, 5'er gram pestisit içermeyen toprağa katılarak sıvı-katı, ultrasonik ve mikrodalga ekstraksiyonu bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde uygulandı. Ardından bölüm 3.6.'da açıklanan HPTLC yöntemiyle analizleri yapıldı ve her ekstraksiyon için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edildi.

3.8. Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limitlerinin (LOQ) Belirlenmesi

LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde aşağıda verilen eşitlikler kullanıldı (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \text{SD}}{\text{eğim}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{eğim}}$$

SD = Kalibrasyon eğrisine ait standart sapma

Eğim = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.9. Geri Kazanım Çalışmaları

Geri kazanım deneyleri her üç ekstraksiyon yöntemi için 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında ve 5 kez olmak üzere gerçekleştirildi. Bunun için 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler pestisit içermeyen 5'er gram toprağa 1'er ml katıldı, 1 gece beklendikten sonra, bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde ekstre edilerek HPTLC yöntemiyle analizlendi (bölüm 3.6.). Her üç ekstraksiyon yöntemi için ayrı ayrı gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları sonrasında % geri kazanım oranları hesaplandı ve ilaçlanmış tarladan alınan örneklerin analizi için en verimli ekstraksiyon yöntemi seçildi.

3.10. Gerçek Toprak Örneklerinin Analizi

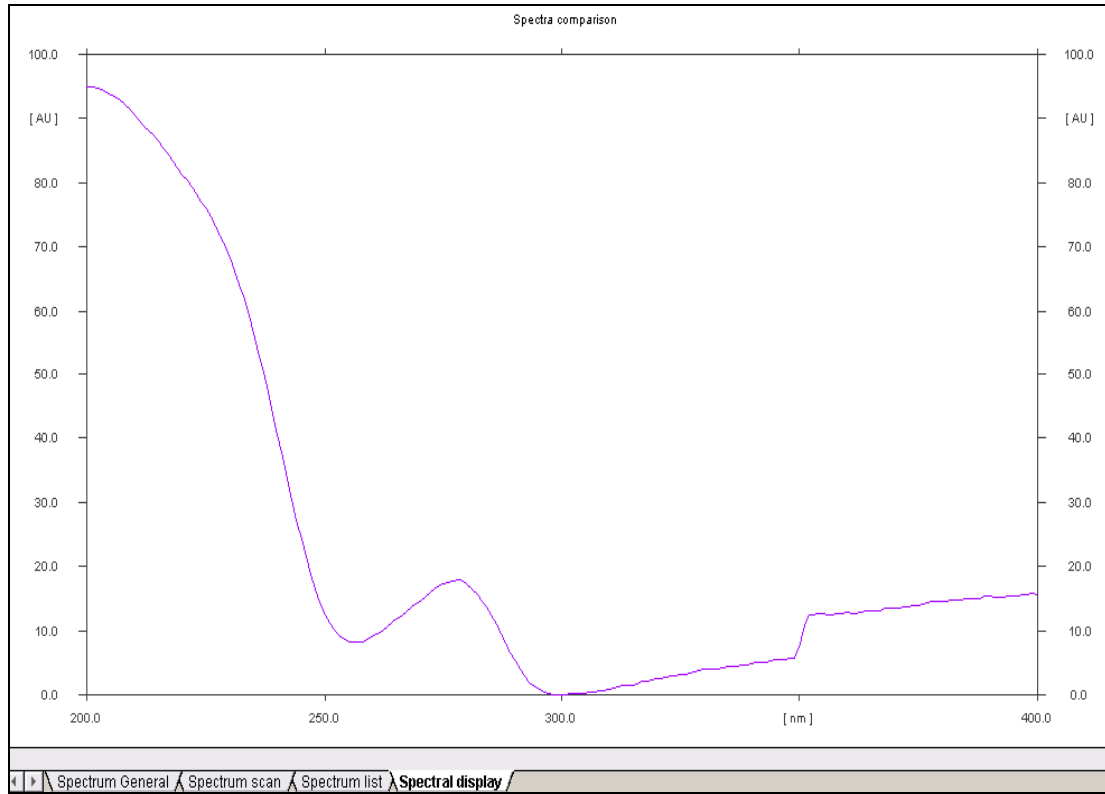
Yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda sıvı-katı, ultrasonik ve mikrodalga ekstraksiyonu yöntemleri arasında, α -cypermethrinin topraktan ekstraksiyonu için en verimli yöntemin mikrodalga ekstraksiyonu olduğuna karar verildi.

Karpuz tarlasından alınan toprak örnekleri verimi en yüksek olan mikrodalga yöntemi ile ekstre edildi. Elde edilen ekstraktlar kuruyana dek azot altında uçurulduktan sonra 200 µl hekzan:diklormetan (1:1) ilavesiyle tekrar çözülüp mikroviyalere alındı ve HPTLC yöntemiyle analizleri sırasında plakaya ekimleri 10 µl olarak yapıldı.

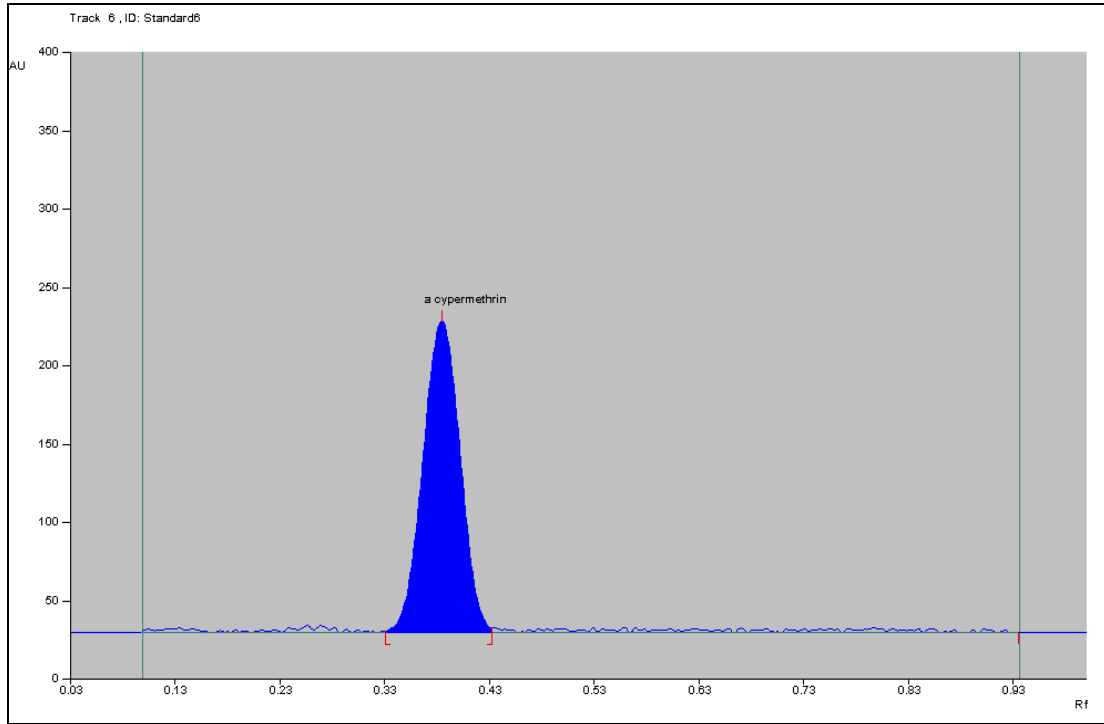
4. BULGULAR

Uygulanan HPTLC şartlarında α -cypermethrinin R_f değeri 0.38 ± 0.01 olarak tespit edilmiştir.

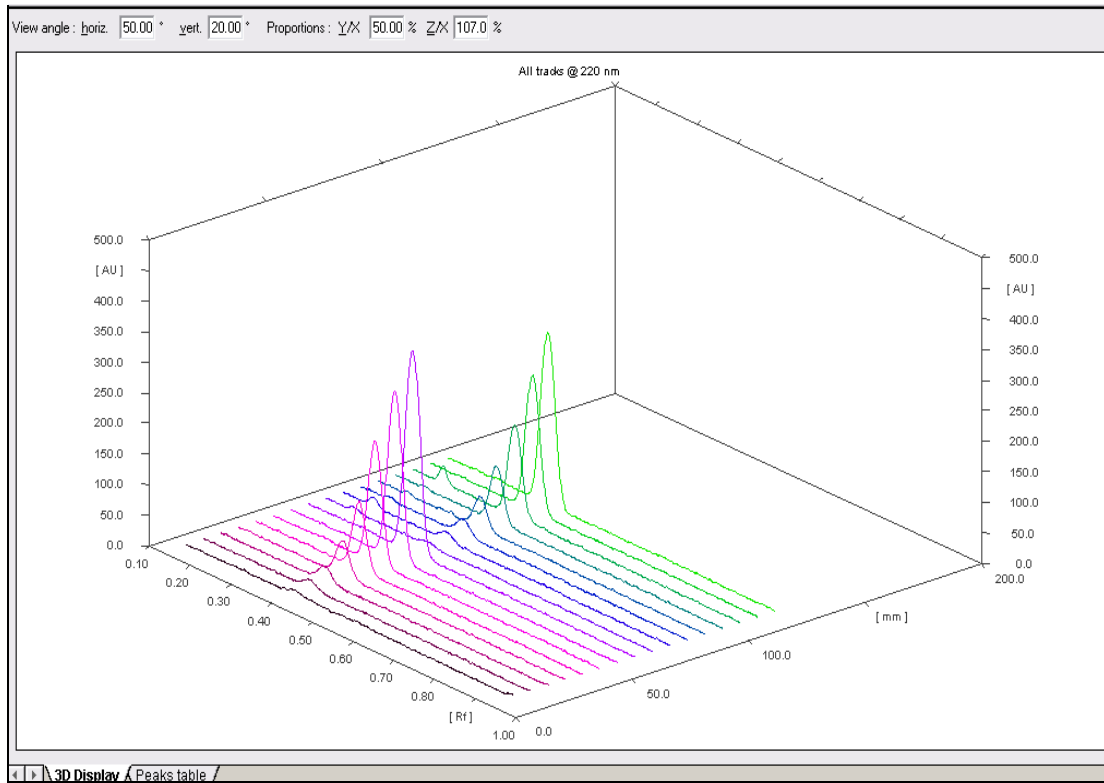
α -Cypermethrine ait UV spektrumu Şekil 4.1.'de, α -cypermethrin standardına ait kromatogram Şekil 4.2.'de ve standart kalibrasyon çözeltilerinin üç boyutlu kromatogramları Şekil 4.3.'te sunulmuştur.



Şekil 4.1. α -Cypermethrine ait UV spektrumu.



Şekil 4.2. α -Cypermethrin standardına ait kromatogram (500 ng/spot).



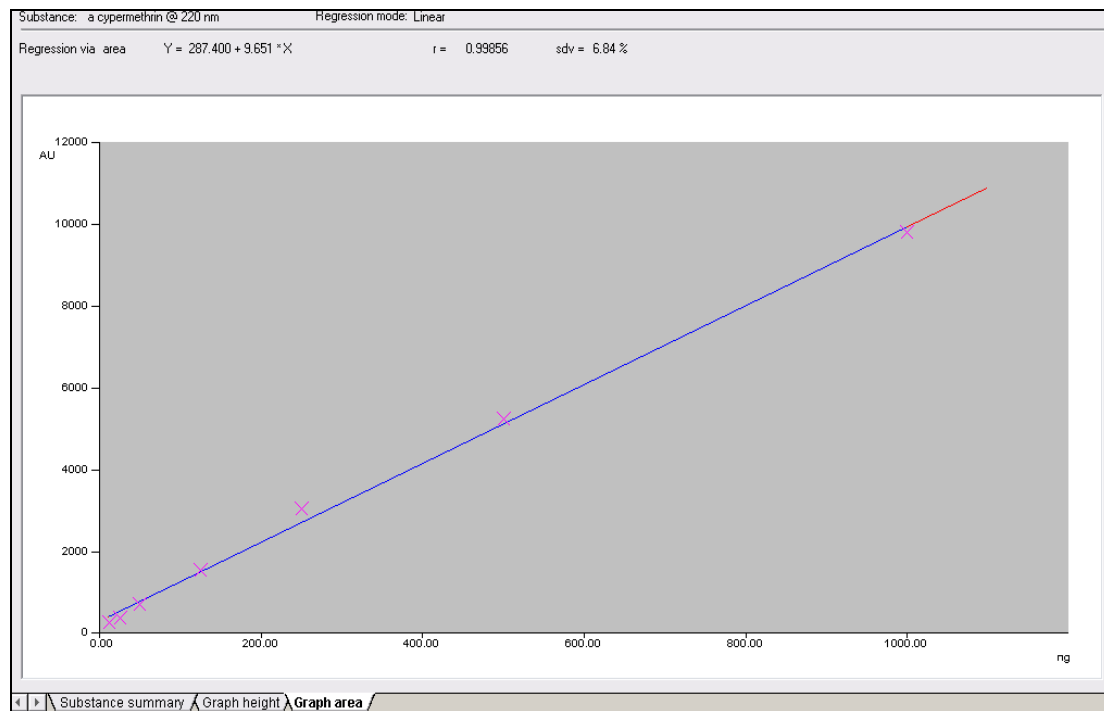
Şekil 4.3. Standart kalibrasyon çözeltilerinin üç boyutlu kromatogramları.

4.1. Doğrudan Standart Madde Çözeltileri ile Yapılan Çalışmalar

Sistem gereği, her üç ekstraksiyon yöntemi için ayrı kalibrasyon eğrileri doğrudan (katım yapılmadan) standart madde çözeltileri ile hazırlandı.

4.1.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon

Sıvı-katı ekstraksiyon yönteminin geri kazanım çalışmalarında kullanılan ve doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi α -cypermethrin için 12.5–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusaldır, hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.998$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 9.651x + 287.400$ 'dür (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Doğrudan α -cypermethrin standardı ile hazırlanan ve sıvı-katı ekstraksiyon yönteminin geri kazanım hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafiği.

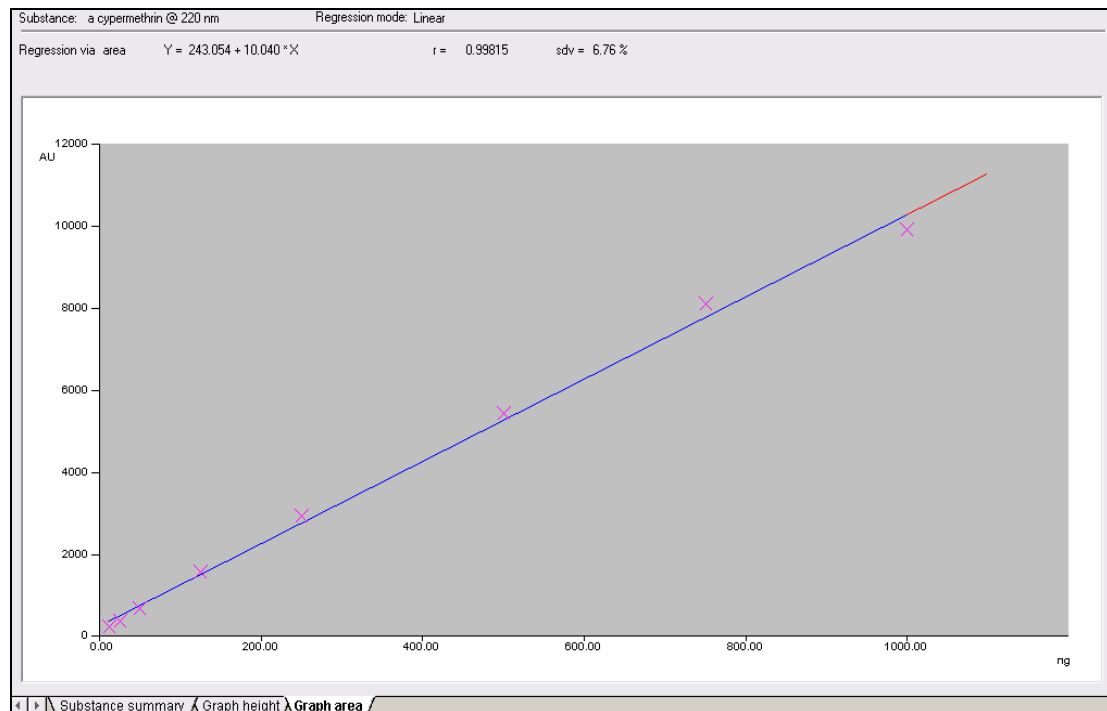
Sıvı-katı ekstraksiyon yönteminin, doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilmiş, iki farklı konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. α -Cypermethrinin doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla sıvı-katı ekstraksiyon için hesaplanan geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	72.8	3.8
500 ng/spot	68.7	2.9

4.1.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geri kazanım çalışmalarında kullanılan ve doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi α -cypermethrin için 12.5–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusaldır, hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.998$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 10.040x + 243.054$ 'tür (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Doğrudan α -cypermethrin standardı ile hazırlanan ve ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geri kazanım hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafiği.

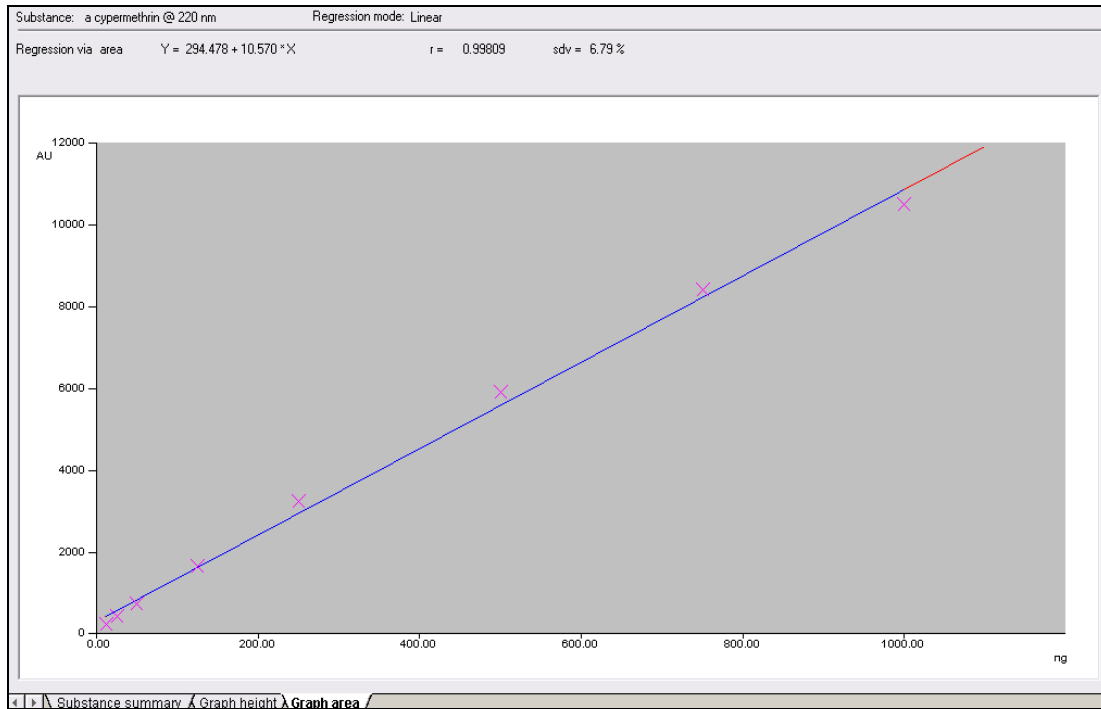
Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin, doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilmiş, iki farklı konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. α -Cypermethrinin doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla ultrasonik ekstraksiyon için hesaplanan geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	80.4	3.3
500 ng/spot	74.5	2.1

4.1.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalga ekstraksiyon yönteminin geri kazanım çalışmalarında kullanılan ve doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi α -cypermethrin için 12.5–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusaldır, hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.998$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 10.570x + 294.478$ 'dir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. α -Cypermethrinin, doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan ve mikrodalga ekstraksiyonu yönteminin geri kazanım hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafiği.

Mikrodalga ekstraksiyonu yönteminin, doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilmiş, iki farklı konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.3'te verilmiştir.

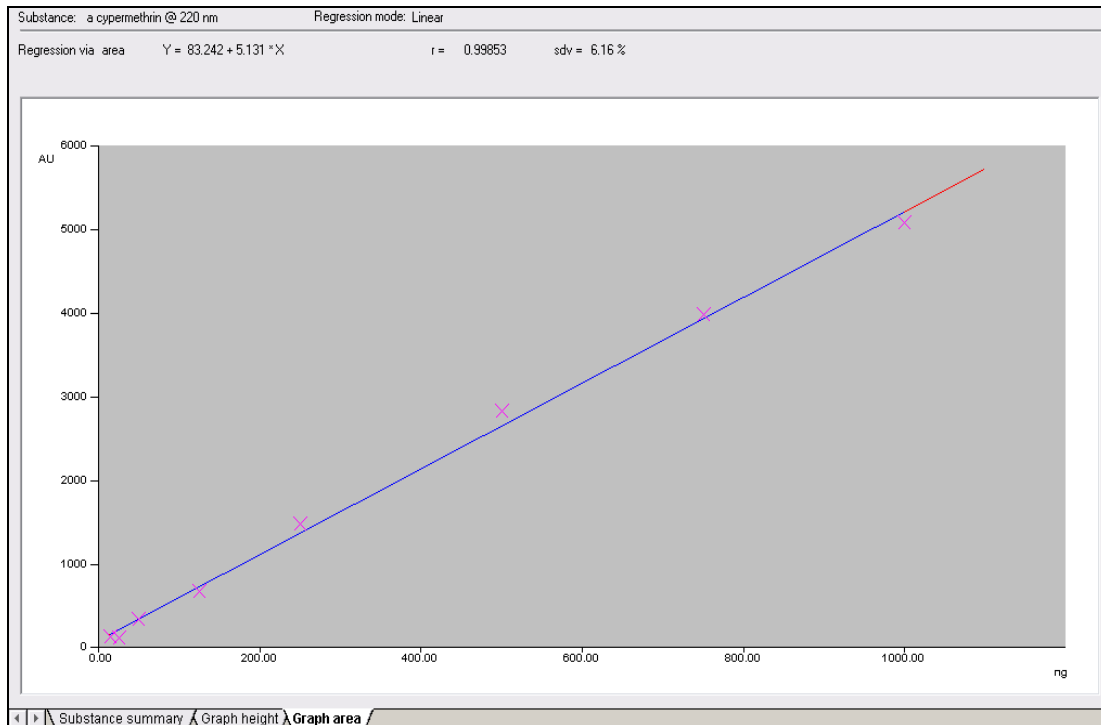
Tablo 4.3. α -Cypermethrinin doğrudan standart madde çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla mikrodalga ekstraksiyonu için hesaplanan geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	91.2	1.06
500 ng/spot	90.8	1.5

4.2. Katım Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

4.2.1. Sıvı-Katı Ekstraksiyon

Sıvı-katı ekstraksiyon yönteminde α -cypermethrin için LOD 3.9 ng/spot ve LOQ 12 ng/spot olarak saptandı. HPTLC analizinde, sıvı-katı ekstraksiyon yönteminde α -cypermethrin için 15–1000 ng/spot konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta α -cypermethrin için hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.998$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 5.131x + 83.242$ 'dir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. α -Cypermethrinin sıvı-katı ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon grafiği.

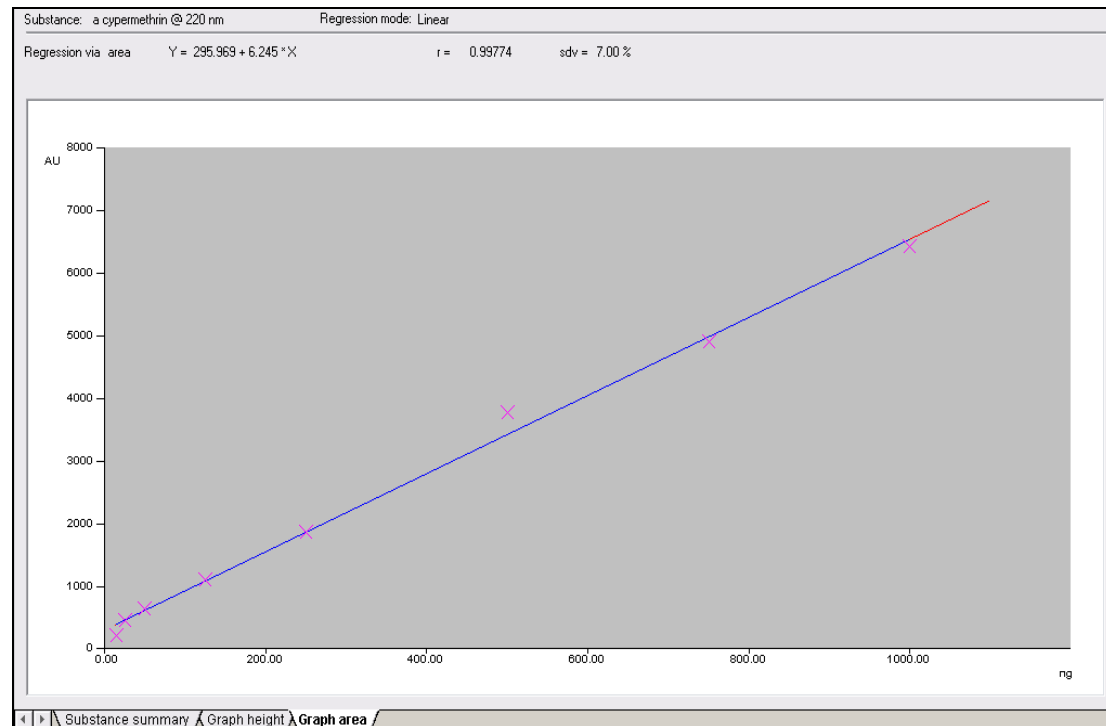
Sıvı-katı ekstraksiyon yönteminin iki konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. α -Cypermethrin için sıvı-katı ekstraksiyon yönteminin geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	102.6	4.7
500 ng/spot	106.1	3.8

4.2.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminde α -cypermethrin için LOD 3.7 ng/spot ve LOQ 11.2 ng/spot olarak saptandı. HPTLC analizinde, ultrasonik ekstraksiyon yönteminde α -cypermethrin için 15–1000 ng/spot konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta α -cypermethrin için hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.997$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 6.245x + 295.969$ 'dir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. α -Cypermethrinin ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon grafiği.

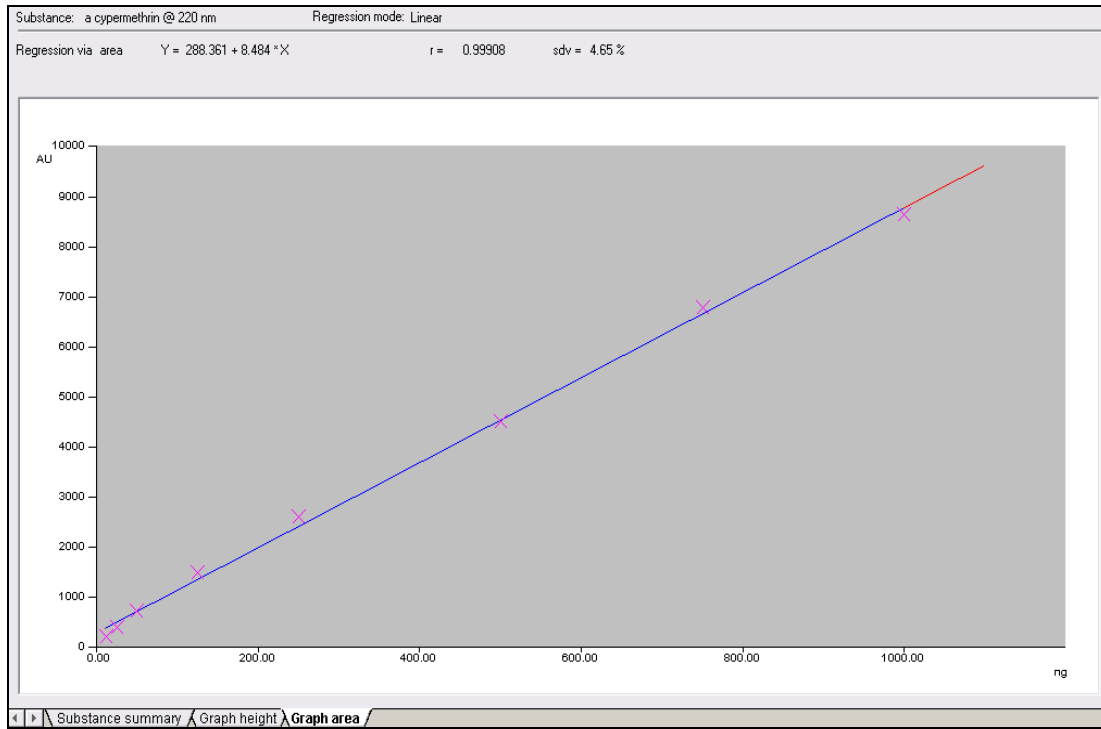
Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin iki farklı konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.5. α -Cypermethrin için ultrasonik ekstraksiyon yönteminin geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	103.8	3.0
500 ng/spot	92.1	2.7

4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalga ekstraksiyonu yönteminde α -cypermethrin için LOD 1.8 ng/spot ve LOQ 5.5 ng/spot olarak saptandı. HPTLC analizinde, mikrodalda ekstraksiyonu yönteminde α -cypermethrin için 12,5–1000 ng/spot konsantrasyon aralığının doğrusal olduğu görülmüştür. Bu aralıkta α -cypermethrin için hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.999$, kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 8.484x + 288.361$ 'dir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. α -Cypermethrinin mikrodalga ekstraksiyonu yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon grafiği.

Mikrodalga ekstraksiyonu yönteminin iki farklı konsantrasyondaki ortalama geri kazanım yüzde oranları Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. α -Cypermethrin için mikrodalga ekstraksiyonu yönteminin geri kazanım oranları (n = 5)

Konsantrasyon	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
250 ng/spot	101.3	2.1
500 ng/spot	100.9	1.6

Mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve sıvı-katı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. α -Cypermethrin için mikrodalga, ultrasonik ve sıvı-katı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Ekstraksiyon yöntemi	LOD (ng/spot)	LOQ (ng/spot)	Geri kazanım (%)		RSD (%)	
			250 ng/spot	500 ng/spot	250 ng/spot	500 ng/spot
Mikrodalga ekstraksiyonu	1.8	5.5	101.3	100.9	2.1	1.6
Ultrasonik ekstraksiyon	3.7	11.2	103.8	92.1	3.0	2.7
Sıvı-katı ekstraksiyon	3.9	12	102.6	106.1	4.7	3.8

4.3. Kontrol Grupları

3.4.1. bölümünde sözü edilen, tarla sınırının 10 metre uzağından alınan 2 adet örnekte ölçüm limitinin altında α -cypermethrin tespit edildi.

Yaklaşık 20 yıldır herhangi bir pestisitle muamele edilmemiş bahçe toprağından alınan örneklerde ise α -cypermethrine rastlanmadı.

4.4. Tarla Örnekleri

α -Cypermethrin ile ilaçlandığı bilinen tarladan 3.4.1. bölümünde anlatıldığı şekilde toplanan 15 adet örneğe ait sonuçlar Tablo 4.8.'de verilmiştir.

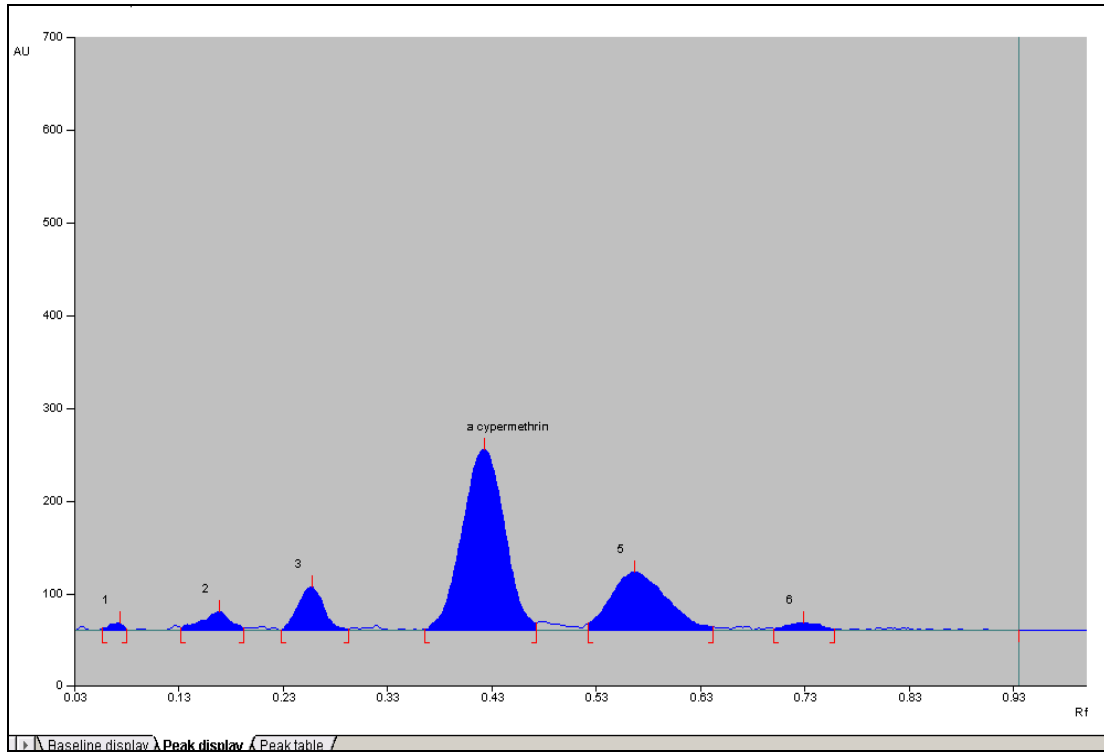
Tablo 4.8. Tarla örneklerine ait analiz sonuçları

Örnek No	α -Cypermethrin konsantrasyonu (ng/g)
1	678.72 ^a
2	820.24 ^a
3	78.92 ^b
4	1275.96 ^a
5	1389.32 ^a
6	115.92 ^b
7	2265.72 ^a
8	2535.16 ^a
9	372.12 ^b
10	708.68 ^a
11	876.08 ^a
12	107.84 ^b
13	2707.24 ^a
14	2482.40 ^a
15	325.20 ^b

^a Bitkilerin dibinden alınan örnekler

^b Bitki ekim sıralarının aralarından alınan örnekler

14 no'lu örneğe ait kromatogram Şekil 4.10.'da yer almaktadır.



Şekil 4.10. 14 no'lu tarla örneğine ait kromatogram.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, sentetik piretroidler tarımda, ormancılıkta, endüstride, iç mekanlarda, ürünleri depolamada ve veterinerlikte zararlı kontrolü için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve Wang, 1996).

Böylesi geniş bir kullanım alanıyla sentetik piretroidlerin çevrede birikimleri önem taşımaktadır. Topraktaki pestisit kalıntıları, yayılabilir, buharlaşarak havaya karışabilir veya yağmur sularıyla birlikte toprağın yıkanmasıyla sürüklenebilirler ve bunun sonucu olarak su kirliliğine ve diğer ekolojik problemlere sebebiyet verebilirler. Ayrıca, mahsül toprağında bulunan pestisit kalıntılarının bitki kökleri tarafından alınarak yetiştirilen ürünlere geçmesi insan sağlığını tehdit etmektedir. Topraktaki pestisit kalıntıları su, hava ve bitkilerdeki kalıntılar için bir depo görevi görmektedir. Bu yüzden topraktaki pestisit kalıntılarının tayinini gerçekleştirmek çevre ve insan sağlığı açısından önemlidir (Parris ve Yokoi, 2003; Gu ve ark., 2008).

Pestisit ve kalıntılarının, insan ve çevre sağlığına olan zararlı etkilerinin farkedilmesiyle birlikte sudan, topraktan, besinlerden ve biyolojik materyallerden tayinleri üzerine yapılan yayınlarda büyük bir artış gerçekleşmiş, kromatografi ön planda olmak üzere sayısız analitik yöntem geliştirilmiştir. Gaz kromatografisi (GC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) başlıca analitik yöntemler olmakla beraber modifiye plakalar, mobil fazların optimizasyonu ve kromatogramların geliştirilmesi ve miktar tayini için kullanılan modern teçhizatlar sayesinde ince tabaka kromatografisi (TLC) pestisitlerin analizinde daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisinin (HPTLC) geliştirilmesi, TLC uygulamalarını gelecek vaat edici kılmaktadır. Ayrıca, pestisitlerin toprak ve yiyecek gibi karmaşık örnek matrislerinden ekstraksiyonu için etkili yöntemlerin kullanılması TLC'nin başarısına katkı sağlamaktadır (Chen ve Wang, 1996; Kaştelan-Macan ve Babić, 2003).

Bir ekstraksiyon prosedüründe aranan özellikler; hızlı, basit, çevre dostu olması ve temiz ekstraktlar sağlamasıdır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde uzun sürelere ve büyük miktarlarda çözücüye ihtiyaç duyulduğundan ekstraksiyon süresini kısaltan, çözücü tüketimini azaltan, çevre dostu yeni ekstraksiyon tekniklerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır (Lesueur ve ark., 2008; Tavman ve ark., 2009).

Pestisitlerin toprak örneklerinden ayrılması ve izolasyonu için Soxhlet ekstraksiyonu (Zuloaga ve ark., 1999; Lang ve ark., 2005), sıvı-katı ekstraksiyon (Spack ve ark., 1998), ultrasonik ekstraksiyon (Gonçalves ve Alpendurada, 2005; Özcan ve ark., 2009), mikrodalga ekstraksiyonu (Font ve ark., 1998; Camel, 2000; Molins ve ark., 2000; Fuentes ve ark., 2007), katı faz ekstraksiyonu (SPE) (Redondo ve ark., 1996; Zhu ve ark., 2005), süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) (Kreuzig ve ark., 2000; Sun ve Lee, 2003) ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) (Tao ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007) gibi çeşitli ekstraksiyon prosedürleri kullanılmaktadır.

Cypermethrin, bir Tip II sentetik piretroid insektisittir ve EPA tarafından insanlarda muhtemel kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır, suda çözünürlüğü düşük olduğundan toprak partiküllerine kuvvetle adsorbe olma eğilimi göstermektedir (EXTOXNET).

Cypermethrinin biyolojik materyallerden (Heudorf ve ark., 2004; Schettgen ve ark., 2002) analizleri yanında; besin maddelerindeki (Barranco Martinez ve ark., 2006; Zawiyah ve ark., 2007; González-Rodríguez ve ark., 2008), sudaki (Xue ve ark., 2005; Yıldırım ve Özcan, 2007), sedimentteki (Müller ve ark., 2000; Woudneh ve Oros, 2006) ve topraktaki kalıntılarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen birçok çalışma mevcuttur. Ayrıca farklı niteliğe sahip topraklardaki kalıcılığı, emilimi ve dağılımı üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Zhou ve ark., 1995; Singh, 1997; Ali ve Baugh, 2003; Gu ve ark., 2007).

Chen ve Wang (1996), piretroid grubu pestisit atıklarının çeşitli materyallerden (yiyecek, çevre v.b.) farklı örnek hazırlama teknikleriyle kromatografik analizlerinin derlendiği bir çalışma yapmışlardır. Söz konusu çalışmada, farklı ekstraksiyon ve analiz koşulları irdelenmiş, karşılaştırmalar yapılmıştır.

Esteve-Turillas ve ark. (2004), toprak örneklerinde, cypermethrini de içeren piretroid grubuna mikrodalga ekstraksiyonu uygulamış GC-ECD yöntemi ile analizledikten sonra GC-NCI-MS ile konfirme etmişlerdir. ECD için LOD değerleri 1–200 ng/g ve NCI-MS için 0.3–2 ng/g olarak bulmuşlardır. Çalışmalarla ilgili geri kazanım oranlarını %97–106 ve RSD'leri %1–7 aralığında saptamışlardır.

Wang ve ark. (2008), cypermethrin ile birlikte iki pestisit (malathion, lambda-cyhalothrin) toprak örneklerinden yan yana tayinlerini, GC-ECD yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, farklı ekstraksiyon çözeltileri için geri kazanım oranları cypermethrin için %63.7–103.9 aralığında bulunmuştur, RSD oranı %2.3 ve dedeksiyon limiti 0.01 µg/kg olarak saptanmıştır.

Bladek ve ark. (1996), kirlenmiş toprak örneklerinden SPE ile hazırladıkları örneklerin pestisit artık (cypermethrin içermeyen) analizini HPTLC/AMD ile yapmışlar, farklı maddeler için 25–400 ng/spot aralığında tayin sınırı değerleri; %71.6–81.6 aralığında ise geri kazanım değerleri elde etmişlerdir.

Babić ve ark. (1998), tarım alanlarından aldıkları örneklerde α -cypermethrini de içeren sentetik piretroid, karbamat, triazin herbisit grubu gibi farklı pestisitleri, katım örnekleri hazırlamak suretiyle HPTLC yöntemini uygulamışlardır. Çalışmada ultrasonik ekstraksiyon, ters faz plakası kullanılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan çözücülere göre, α -cypermethrin için %66.7 ila %97.2 arası geri kazanım ve 0.1 µg civarında LOD sonuçları elde etmişlerdir.

Yasin ve ark. (1996), toprak örneklerinde cypermethrini de içeren sentetik piretroid insektisitlerin analizini ultrasonik ekstraksiyon ve GC-MS yöntemi ile NCI modunda çalışarak gerçekleştirmişlerdir. Cypermethrin için geri kazanım oranı %89.4–108.2 aralığında, LOQ değeri 0,69 ppb olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda ülkemizde de yaygın olarak kullanılan insektisitlerden “cypermethrin”in, suda çözünürlüğünün az olup toprakta birikme riski taşıması nedeniyle, toprak materyalinden, HPTLC yöntemi kullanılarak kalitatif ve kantitatif tayini için yöntem geliştirilmesi amaçlandı.

Cypermethrinin topraktan ekstraksiyonu için mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve sıvı-katı ekstraksiyon yöntemleri uygulandı. Her üç yöntemin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Hekzan:diklormetan (1:1), aseton, toluen ve hekzan:aseton (1:1) çözücü sistemleri denenerek en yüksek verimliliği gösteren hekzan:diklormetan (1:1) karışımı ekstraksiyon çözücüsü olarak belirlendi.

Katım yöntemi ile yapılan çalışmalarda;

Sıvı-katı ekstraksiyon yöntemine ait HPTLC analizlerinde α -cypermethrin için 15–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu aralıkta doğru denklemi $y = 5.131x + 83.242$ ve korelasyon katsayısı 0.998 olarak saptandı. LOD 3.9 ng/spot, LOQ 12 ng/spot olarak hesaplandı. Ortalama geri kazanım oranları ve RSD değerleri 250 ve 500 ng/spot için sırasıyla %102.6, %4.7 ve %106.1, %3.8 olarak bulundu.

Ultrasonik ekstraksiyon yöntemine ait HPTLC analizlerinde α -cypermethrin için 15–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu aralıkta doğru denklemi $y = 6.245x + 295.969$ ve korelasyon katsayısı 0.997 olarak saptandı. LOD 3.7 ng/spot, LOQ 11.2 ng/spot olarak hesaplandı. Ortalama geri kazanım oranları ve RSD değerleri 250 ve 500 ng/spot için sırasıyla %103.8, %3.0 ve %92.1, %2.7 olarak bulundu.

Mikrodalga ekstraksiyonu yöntemine ait HPTLC analizlerinde ise α -cypermethrin için 12.5–1000 ng/spot konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu aralıkta doğru denklemi $y = 8.484x + 288.361$ ve korelasyon katsayısı 0.999 olarak saptandı. LOD 1.8 ng/spot, LOQ 5.5 ng/spot olarak hesaplandı. Ortalama geri kazanım oranları ve RSD değerleri 250 ve 500 ng/spot için sırasıyla %101.3, %2.1 ve %100.9, %1.6 olarak saptandı.

Her üç ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen değerler, literatür bulguları ile uyumlu bulundu.

Çalışmamızda α -cypermethrinin ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu ile yaklaşık 30 dk'da ve örnek başına 20 ml çözücü kullanılarak, ultrasonik ekstraksiyon ile 60 dk'da ve 40 ml çözücü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geleneksel bir yöntem olan sıvı-katı ekstraksiyon ise çok daha uzun sürelerle ihtiyaç duymaktadır.

Mikrodalga ekstraksiyonu geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha küçük örnek hacmi ve çözücü miktarı gerektirmekte, ekstraksiyon verimliliğini yükseltmekte, ekstraksiyon zamanını ve örnek başına düşen maliyeti azaltmaktadır. Yüksek basınç ve sıcaklıklarda çalışma imkanı sağlaması mikrodalga ekstraksiyonuna önemli avantajlar kazandırmaktadır.

Bu veriler ışığında, α -cypermethrin kullanıldığı bilinen tarladan alınan 15 adet toprak örneğine en yüksek geri kazanım oranlarına ve en düşük RSD değerlerine sahip mikrodalga ekstraksiyonu yöntemi uygulandı ve örnekler bölüm 3.6.'da anlatıldığı şekilde HPTLC sistemi ile analiz edildi. Tarla örneklerindeki α -cypermethrin kalıntılarının tayin edilebilmesi için bu örnekler çalışma örneklerinden farklı olarak, ekstraksiyon işlemi bittikten sonra 200 μ l çözücü ile çözüldü ve plakaya ekimleri 10 μ l olarak yapıldı. Analiz edilen toprak örnekleri içinde en düşük α -cypermethrin miktarı 78.92 ng/g; en yüksek α -cypermethrin miktarı 2707.24 ng/g olarak saptandı. İlaçlama, bitkilerin üzerlerine püskürtülerek gerçekleştirildiği için bitkilerin dibinden alınan örneklerde, bitki ekim sıralarının aralarından alınan örneklere göre daha yüksek konsantrasyonlarda α -cypermethrine rastlandı.

Çalışmamız sonucunda, kullanılan HPTLC sisteminin toprak örneklerinden cypermethrin tayinine uygun olduğu ortaya konmuştur. Geliştirilen yöntem hassas, hızlı ve tekrarlanabilir. Kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede çok sayıda örnek analizinin gerçekleştirilebilmesi ile HPTLC cypermethrinin kalitatif ve kantitatif analizi için geçerli ve basit bir yöntem olup, yargıya intikal eden çevre analizlerinde ve rutin toprak kalıntı analizlerinde kullanılabileceği kanısındayız.

6. ÖZET

Pestisitler herhangi bir zararlıyı yok etmek, kaçırmak, uzaklaştırmak veya kontrol etmek amacıyla kullanılan maddeler veya madde karışımlarıdır. Pestisitlerin yaygın olarak kullanılması çevre kirliliğine ve insanların akut/kronik zehirlenmelerine sebep olabilmektedir. Ayrıca, düşük dozda uzun süre pestisitlere maruz kalma kansere ve diğer genetik bozukluklara öncülük edebilmektedir. Cypermethrin bir Tip II sentetik piretroid insektisittir ve insanlarda muhtemel kanserojen (grup C) ve orta derecede toksik bir kimyasal (sınıf II) olarak sınıflandırılmaktadır.

Çalışmamızda, cypermethrinin topraktan tayini için kolay bir HPTLC yöntemi geliştirildi. Yöntem mikrodalga ekstraksiyonunu takiben, ekstraktların HPTLC silika jel plakalarda hekzan:toluen mobil faz sistemiyle yürütülmesini ve 220 nm'de UV densitometri ile miktar tayinini içermektedir. Hekzan-diklormetan (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga, ultrasonik ve sıvı-katı ekstraksiyon yöntemleri birbirleriyle karşılaştırıldı. Mikrodalga ekstraksiyonu, 250 ve 500 ng/spot konsantrasyon düzeylerinde sırasıyla %101.3, 100.9 ortalama gerikazanım oranları ve %2.1, 1.6 bağıl standart sapma (RSD) değerleri ile güvenilir sonuçlar gösterdi. Cypermethrinin kalibrasyon eğrisi 12.5–1000 ng/spot aralığında doğrusaldır ve korelasyon katsayısı 0.999'dur. Yöntemin dedeksiyon limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) sırasıyla 1.8 ve 5.4 ng/spot'tur. Yöntem ayrıca gerçek toprak örneklerinin analizinde başarıyla uygulandı. Geliştirilen HPTLC yöntemi cypermethrinin topraktan tayini için hızlı, seçici ve hassastır.

7. SUMMARY

Pesticides are substances or mixtures of substances intended for preventing, destroying, repelling or controlling any pest. The widespread use of pesticides may cause environmental pollution and acute/chronic human poisoning. Also, a low-level long-term pesticides exposure can lead to cancer and other genetic disorders. Cypermethrin is a type II synthetic pyrethroid insecticide, which is classified as a moderately toxic chemical (class II) and possible human carcinogen (group C). It has a strong tendency to adsorb to the soil particles.

In our study, a simple HPTLC method was developed for the determination of cypermethrin in soil. The method involves microwave extraction followed by development of extracts on HPTLC silica gel plates with hexane:toluene (1:1, v/v) mobile phase system and quantitation by UV scanning densitometry at 220 nm. Microwave, ultrasonic and liquid-solid extraction methods using hexane-dichloromethane were compared with each other. Microwave extraction showed satisfactory results with the average recoveries 101.3, 100.9% and relative standard deviations (RSD) 2.1, 1.6% for 250 and 500 ng/spot concentration levels, respectively. Calibration curve of cypermethrin was linear in the range of 12.5–1000 ng/spot, and the correlation coefficient for the calibration equation was 0.999. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method was 1.8 and 5.4 ng/spot, respectively. The method was also successfully applied to the analysis of real soil samples. The developed HPTLC method is fast, selective and sensitive for the determination of cypermethrin in soil.

8. KAYNAKLAR

Ali, M.A., Baugh, P.J. (2003) Sorption-desorption studies of six pyrethroids and mirex on soils using GC/MS-NICI, *Intern J Environ Anal Chem*, **83**: 923-933.

Aydinođlu, H., Dursun, H.Y., Bayraktar, L. (2002) *Ruhsatlı Zirai Mücadele İlaçları*, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müd., Ankara.

Baban, N., Kurt, K., Kaptanođlu, K., Susmuş Kaptanođlu, A., Baban, A. ve ark. (2003) *Adli Toksikoloji*, Adli Tıp Kurumu Yayınları-8, İstanbul.

Babić, S., Petrović, M., Kaštelan-Macan, M. (1998) Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil, *Journal of Chromatography A*, **823**: 3-9.

Barranco Martinez, D., Parrilla Vazquez, P., Martinez Galera, M., Gil Garcia, M.D. (2006) Determination of pyrethroid insecticides in vegetables with liquid chromatography using detection by electrospray mass spectrometry, *Chromatographia*, **63**: 487-491.

Berkowitz, G.S., Obel, J., Deych, E., Lapinski, R., Godbold, J., Liu, Z., Landrigan P.J., Wolff M.S. (2003) Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort, *Environmental Health Perspectives*, **111**: 79-84.

Bladek, J., Rostkowski, A., Miszczak, M. (1996) Application of instrumental thin-layer chromatography and solid-phase extraction to the analyses of pesticide residues in grossly contaminated samples of soil, *Journal of Chromatography A*, **754**: 273-278.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Zanini, R., do Amaral, F., Jurinitz, D.F., Wasserman, F.G. (2007) Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin, *Chemosphere*, **69**: 920-926.

Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., Vale, J.A. (2005) Poisoning due to pyrethroids, *Toxicological Review*, **24**: 93-106.

Camel, V. (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*, **19**: 229-248.

Casida, J.E., Gammon, D.W., Glickman, A.H., Lawrance, L.J. (1983) Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **23**: 413-438.

Castro, M.D., Garcia, J.L. (2002) *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*, pp. 179-132, Elsevier Science B.V.

Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N., Gupta, S.K. (1999) Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Environmental and Experimental Botany*, **42**(3): 181-189.

Chen, Z., Wang, Y. (1996) Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples, *Journal of Chromatography A*, **754**: 367-395.

Cox, C. (1996) Insecticide Factsheet Cypermethrin, *Journal of Pesticide Reform*, **16**(2): 15-20.

Cox, C. (2002) Insecticide Factsheet Pyrethrins/Pyrethrum, *Journal of Pesticide Reform*, **22**(1): 14-20.

Curran, W.S. (1998) Persistence of herbicides in soil, *Agronomy Facts 36*, PennState College of Agric. Sci., Univ. Park, PA.

Das, B.K., Mukherjee, S.C. (2003) Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **134**: 109-121.

Dean, J.R. (1998) *Extraction Methods for Environmental Analysis*, pp. 99, John Wiley & Sons Ltd., England.

Dean, J.R. (2003) *Methods for Environmental Trace Analysis*, pp. 27-38, John Wiley & Sons Ltd., England.

Demircan, V., Yılmaz, H. (2005) Isparta İli Elma Üretiminde Tarımsal İlaç Kullanımının Çevresel Duyarlılık ve Ekonomik Açından Analizi, *Ekoloji*, **14**(57): 15–25.

Dorman, D.C., Beasley, R. (1991) Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides, *Veterinary and Human Toxicology*, **33**(3): 238-243.

Dölen, E. (1989) Spektroskopiye Giriş, Aletli Analiz Yöntemleri I Spektroskopi Okulu, T.M.M.O.B. Kimya Mühendisleri Odası İstanbul Şubesi.

Ecobichon, D.J. (2001) Toxic Effects of Pesticides, In: *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (C.D. Klaassen, Ed.), 6th ed., pp. 763-804, MacGraw-Hill, New York.

Ersoy, L. (1989) Kromatografik Ayırma Yöntemleri, Aletli Analiz Yöntemleri II Kromatografi Okulu, T.M.M.O.B. Kimya Mühendisleri Odası İstanbul Şubesi.

Esteve-Turrillas, F.A., Aman, C.S., Pastor, A., de la Guardia, M. (2004) Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil, *Analytica Chimica Acta*, **522**: 73-78.

EXTOXNET (1996) Cypermethrin, *Pesticide Information Profiles*, Oregon State University. < <http://extoxnet.orst.edu> >

Flanagan, R.J., Taylor, A., Watson, I.D., Whelpton, R. (2007) *Fundamentals of Analytical Toxicology*, pp. 131-143, John Wiley & Sons, Inc., England.

Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E.A., Baumann, R.A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides, *Journal of Chromatography A*, **798**: 179–186.

Fried, B., Sherma, J. (1999) *Thin-Layer Chromatography*, 4th ed., pp. 1-8, Marcel Dekker, Inc., New York.

Fuentes, E., Báez, M.E., Labra, R. (2007) Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil, *Journal of Chromatography A*, **1169**(1-2), 40-46.

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. (2005) Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta*, **65**(5), 1179-1189.

González-Rodríguez, R.M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2008) Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography–ion trap mass spectrometry and analyte protectants, *Journal of Chromatography A*, **1196-1197**: 100-109.

Gu, X.Z., Zhang, G.Y., Chen, L., Dai, R.L., Yu, Y.C. (2008) Persistence and dissipation of synthetic pyrethroid pesticides in red soils from the Yangtze River Delta area, *Environmental Geochemistry and Health*, **30**: 67-77.

Gündüz, T. (2004) *İnstrümental Analiz*, 7. baskı, Gazi Kitabevi, Ankara.

Halkina T., Sherma J. (2006) Comparative evaluation of the performance of silica gel TLC plates and irregular and spherical-particle HPTLC plates, *Acta Chromatographica*, **17**: 261-271.

Heudorf, U., Angerer, J., Drexler, H. (2004) Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides, *Int Arch Occup Environ Health*, **77**: 67-72.

Huf, F.A. (1987) In situ evaluation of thin-layer chromatograms, In: *Quantitative Thin Layer Chromatography and Its Industrial Applications* (L.R. Treiber, Ed.), pp. 17-66, Marcel Dekker, Inc., New York.

ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).

İmre, Z. (1988) *Toksikoloji*, s. 198-199, İstanbul.

Juma, N.G. (2001) *The Pedosphere and Its Dynamics: A Systems Approach to Soil Science*, Vol.1: Introduction to Soil Science and Soil Resources, pp. 1-21, 277-288, Salman Productions, Inc., Alberta, Canada.

Kaštelan-Macan, M., Babić, S. (2003) Pesticides, In: *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (J. Sherma and B. Fried, Eds.), 3rd ed., pp. 767-806, Marcel Dekker, Inc., New York.

Katsuda, Y. (1999) Development of and future prospects for pyrethroid chemistry, *Pesticide Science*, **55**: 775-782.

Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction And Pressurised Solvent Extraction, *Phytochemical Analysis*, **13**: 105-113.

Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., Chisten, P. (2007) Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. The case of diosgenin extracted from Fenugreek, *Phytochemical Analysis*, **18**: 70-76.

Kou, D., Mitra, S. (2003) Extraction of semi volatile organic compounds from solid matrices, In: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (S. Mitra, Ed.), pp. 139-182, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Kreuzig, R., Koinecke, A., Bahadır, M. (2000) Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **43**: 403-409.

Lamb, J.P. (2007) Prethrins and Pyrethroids, In: *Poisoning and Drug Overdose* (K.R. Olson, Ed.), 5th ed., pp. 324-325, Lange Medical Books/McGrawHill, New York.

Lang, Y.H., Cao, Z.M., Jiangc, X. (2005) Prediction of solvents extraction—the organochlorine pesticides in soil using solubility parameter, *Talanta*, **66**: 249-252.

Legrand, M.P., Costentin, E., Bruchet, A. (1991) Occurrence of 38 pesticides in various French surface and ground waters, *Environmental Technology*, **12**(11): 985-996.

Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M. (2008) Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry, *Talanta*, **75**: 284-293.

Martinez Galera, M., Martinez Vidal, J.L., Garrido Frenich, A., Gil Garcia, M.D. (1996) Determination of cypermethrin, fenvalerate and cis- and trans-permethrin in soil and groundwater by high-performance liquid chromatography using partial least-squares regression, *Journal of Chromatography A*, **727**(1): 39-46.

Molins, C., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E., Heusinkveld, H.A.G., Bauman, R.A. (2000) Determination of linuron and related compounds in soil by microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography A*, **869**: 487-496.

Müller, J.F., Duquesne, S., Ng, J., Shaw, G.R., Krrishnamohan, K., Manonmanii, K., Hodge, M., Eaglesham G.K. (2000) Pesticides in Sediments From Queensland Irrigation Channels and Drains, *Marine Pollution Bulletin*, **41**(7-12): 294-301.

Özcan, S., Tor, A., Aydın, M.E. (2009) Application of miniaturised ultrasonic extraction to the analysis of organochlorine pesticides in soil, *Analytica Chimica Acta*, **640**: 52-57.

Parris, K., Yokoi, Y. (2003) Assessing the environmental performance of agriculture: pesticide use, risk and management indicators, In: *Pesticides: Problems, Improvements, Alternatives* (F. den Hond, P. Groenewegen, N.M. van Straalen, Eds.), pp. 113-134, Blackwell Science, Great Britain.

Pascual, J.A., Peris, S.J. (1992) Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (*Parus caeruleus*), *Environ Toxicol Chem*, **11**: 1271-1280.

Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A. (2007) In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos, *Toxicology in Vitro*, **21**: 1409–1418.

Petrovic, M., Eljarrat E., Diez, S., Kowalewska G., Barcelo, D. (2007) Chemical analysis of contaminants in sediments, In: *Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants*, (D. Barcelo and M. Petrovic, Eds.), pp. 61-129, Elsevier B.V.

Pugin, B., Turner, A.T. (1990) Influence of ultrasound on reaction with metals, In: *Advances in Sonochemistry* (T.J. Mason, Ed.), Vol.1, pp. 81-118, JAI Pres, London.

Radojević, M., Bashkin, V.N. (1999) *Practical Environmental Analysis*, pp. 274-377, Royal Society of Chemistry, UK.

Ray, D.E., Fry, J.R. (2006) A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides, *Pharmacology and Therapeutics*, **111**(1): 174-193.

Redondo, M.J., Ruiz, M.J., Boluda, R., Font, G. (1996) Optimization of a solid-phase extraction technique for the extraction of pesticides from soil samples, *Journal of Chromatography A*, **719**(1): 69-76.

Reeve, R.N. (2002) *Introduction to Environmental Analysis*, pp. 135-174, John Wiley & Sons, Ltd., England.

Reich, E., Schibli, A. (2006) *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*, pp. 116-121, Thieme Medical Publishers, Inc., New York.

Rose, R.L., Roe, R.M., Hodgson, E. (1999) Pesticides, In: *Toxicology* (H. Marquardt, S.G. Schafer, R. McClellan and F. Welsch, eds.), pp 663-697, Academic Press, San Diego.

Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H., Angerer, J. (2002) Pyrethroid exposure of the general population—is this due to diet, *Toxicology Letters*, **134**: 141-145.

Sharma, K.K. (2002) Determination of active ingredient in synthetic pyrethroid formulation by high-performance thin-layer chromatography/densitometry, *Journal of AOAC International*, **85**: 1420-1424

Sherma, J. (2005) Optical Quantification (Densitometry) in TLC, In: *Encyclopedia of Chromatography* (J. Cazes, Ed.), 2nd ed., Vol. 2, pp. 1150-1157, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Singh, R.P. (1997) Influence of cosolvent (acetone) on the adsorption and movement of cypermethrin on soils, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **122**: 63-73.

Smalling, K.L., Kuivila, K.M. (2008) Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments, *Journal of Chromatography A*, **1210**: 8-18.

Spack, L., Alvarez, C., Martins, J.M.F., Tarradellas, J. (1998) Comparison of supercritical fluid extraction (SFE), Soxhlet and shaking methods for pendimethalin extraction from soils: effect of soil properties and water content, *Journal of Contaminant Hydrology*, **33**: 171-185.

Sparks, D.L. (2003) *Environmental Soil Chemistry*, 2nd ed., pp. 7-10, Elsevier Science, USA.

Spencer, C.I., Yuill, K.H., Borg, J.J., Hancox, J.C., Kozłowski, R.Z. (2001) Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **289**: 1067-1082.

Sun, L., Lee, H.K. (2003) Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology, *Journal of Chromatography A*, **1014**: 165-177.

Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **341**(3): 169-184.

Snyder, J.L. (2004) Environmental applications of gas chromatography, In: *Modern Practice of Gas Chromatography* (R.L. Grob, E.F. Barry, Eds.), 4th ed., pp. 769-882, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Tao, S., Guo, L.Q., Wang, X.J., Liu, W.X., Ju, T.Z., Dawson, R., Cao, J., Xu, F.L., Li, B.G. (2004) Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents, *Science of The Total Environment*, **320**(1), 1-9.

Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z. (2009) Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu, *Gıda*, **34** (3): 175-182.

Tulus, R., İmre S. (1989) Eczacılık Öğrencilerine *Analitik Kimya*, s. 343-345, Gençlik Basımevi, İstanbul.

U.S. Environmental Protection Agency (1989) *Cypermethrin Pesticide Fact Sheet*, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency (2006) *Reregistration Eligibility Decision (RED) Document for Cypermethrin*, Washington, DC.

Ündeger Ü., Başaran N. (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage, *Archives of Toxicology*, **79**: 169–176.

Verschöyle, R.D., Aldridge, W.N. (1980) Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats, *Archives of Toxicology*, **45**: 325-329.

Walker, C.H. (2003) Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds, *Ecotoxicology*, **12**: 307-316.

Wall, P.E. (2005) *Thin Layer Chromatography: A Modern Practical Approach*, pp. 45-48, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., Tao, S. (2007) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, **602**(2): 211-222.

Wang, X., Zhao, X., Liu, X., Li, Y., Fu, L., Hu, J., Huang, C. (2008) Homogeneous liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils, *Analytica Chimica Acta*, **620**: 162-169.

Woudneh, M.B., Oros, D.R. (2006) Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1135**(1): 71-77.

Xue, N., Xu, X., Jin, Z. (2005) Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir, *Chemosphere*, **61**:1594-1606.

Yamashita, M., Tanaka, J., Ando, Y. (1997) Human mortality in organophosphate poisonings, *Veterinary and Human Toxicology*, **39**: 84–85.

Yasin, M., Baugh, P.J., Bonwick, G.A., Davies, D.H., Hancock, P., Leinoudi, M. (1996) Analytical method development for the determination of synthetic pyrethroid insecticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry operated in negative-ion chemical-ionization mode, *Journal of Chromatography A*, **754**: 235-243.

Yıldırım, İ., Özcan, H. (2007) Determination of pesticide residues in water and soil resources of Troia (Troy), *Fresenius Environmental Bulletin*, **16**:63-70.

Zahm, S.H., Blair, A. (1992) Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma, *Cancer Research*, **52**: 5485–5488.

Zawiyah, S., Che Man, Y.B., Nazimah, S.A.H., Chin, C.K., Tsukamoto, I., Hamanyza, A.H., Norhaizan, I. (2007) Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column, *Food Chemistry*, **102**(1): 98-103.

Zhou, J.L., Rowland, S.J., Mantoura, R.F.C., Harland, B.J. (1995) Influence of the nature of particulate organic matter on the sorption of cypermethrin: implications on K_{oc} correlations, *Environment International*, **21**(2), 187-195.

Zhu, X., Yang, J., Su, Q., Cai, J., Gao, Y. (2005) Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples, *Journal of Chromatography A*, **1092**(2), 161-169.

Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L.A., Madariaga, J.M. (1999) Optimisation and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach, *Talanta*, **50**: 345-357.

<http://organiclifestyles.tamu.edu/soilbasics/soilchemical.html> (Son Ulaşım 15.11.09)

<http://stanford.wellsphere.com/cancer-article/alphacypermethrin/306869> (Son Ulaşım 15.11.09)

http://www.cevreorman.gov.tr/toprak_01.htm (Son Ulaşım 15.11.09)

<http://www.chromatography-online.org/Principles/TLC-Apparatus/Chambers.html>
(Son Ulaşım 15.11.09)

<http://www.itkb.gov.tr/files/zirai.pdf> (Son Ulaşım 15.11.09)

<http://www.mm.anadolu.edu.tr/kimya/deneyler2/Deney5.pdf> (Son Ulaşım 15.11.09)

9. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sevcan ŞEMEN

Doğum Tarihi: 21.10.1983

Doğum Yeri: Bulgaristan

Uyruđu: T.C.

Eđitim Durumu:

2006 - İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eđitimi

2006 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü lisans diploması

2001 Adapazarı Atatürk Lisesi (Y.D.A), lise diploması

1997 Şehit Mustafa Özen İlköğretim Okulu, ortaokul diploması

1994 Adapazarı Sakarya İlkokulu, ilkokul diploması