

DOĞA BİLİMLERİ VE MATEMATİKTE GÜNCEL TRENDLER VE ÇALIŞMALAR



All Sciences Academy

*DOĞA BİLİMLERİ VE
MATEMATİKTE GÜNCEL
TRENDLER VE ÇALIŞMALAR*

Editör
Prof. Dr. Canan ÖZDEMİR





Doğa Bilimleri ve Matematikte Güncel Trendler ve Çalışmalar
Editör: Prof. Dr. Canan ÖZDEMİR

Dizayn: All Sciences Academy Design

Basım Tarihi: Eylül 2026

Yayıncı Sertifika Numarası: 72273

ISBN: 978-625-5472-08-3

© All Sciences Academy

www.allsciencesacademy.com

allsciencesacademy@gmail.com

İÇERİK

1. Bölüm

5

Cimex lectularius Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae) Türünün Başlıca Morfolojik Özellikleri ve İşlevleri

Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

2. Bölüm

25

Triazol Türevi Bazı Fungusitlerin Alan Güçlendirilmiş Örnek Enjeksiyonu İle Kapiler Elektroforez Tayini

Tufan GÜRAY, Ulku Dilek UYSAL

***Cimex lectularius* Linnaeus, 1758
(Hemiptera: Cimicidae) Türünün Başlıca
Morfolojik Özellikleri ve İşlevleri**

Mehmet Oğuz ÖZTÜRK¹

1- Prof. Dr.; Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye oozturk@aku.edu.tr ORCID No: 0000-0001-7263-3585

ÖZET

Cimicidae familyasında, Cimex cinsi halk sağlığı açısından önemiyle öne çıkmaktadır. *Cimex lectularius*, kan emici bir böcektir ve küresel bir dağılıma sahiptir. Bu derleme, *Cimex lectularius* türünün baş (cephal), göğüs (toraks) ve karın (abdomen) bölgelerine ait morfolojik özelliklerini incelemektedir. Piramidal ve dorsoventral basık baş yapısında, yaklaşık 30 ommatidyumdan oluşan ve aralarında türe özgü setalar barındıran bileşik gözler yer alır; basit gözler (ocellus) bulunmaz. Göz boyutlarında dişi lehine eşeysel dimorfizm görülmektedir. Dört segmentli antenlerin pediselinde beş farklı sensilla tipi tanımlanmış olup; C, D ve F tipleri belirgin bir duyuşal yamada (SP) kümelenmiştir. Delici-emici ağız yapısını oluşturan rostrum, deriyi kesen mandibular ve kanalı barındıran maksiller stiletleri içerir. Göğüs bölgesi pronotum, mesonotum ve metanotumdan oluşur. Evrimsel olarak uçuş yeteneğini kaybeden erginlerde, mesonotumdan gelişen scutellum ve körelmiş ön kanat pulları (hemelytral pad) yer alır. Üç çift bacağın tibia ucunda yer alan tibial tutunma ayakları (TAP), spatula formundaki kılları ve bezsel epiteliyle pürüzsüz yüzeylerde (özellikle çiftleşme esnasında dişi kütikulasında) adeziv tutunmayı sağlar. TAP sayısı en yüksek ön bacaklarda (Tibia I) gözlenmiştir. Pürüzlü yüzeylerde ve beslenme sırasında ise tutunma, V şeklinde açılan tarsal tırnakların mekanik kenetlenmesiyle gerçekleşir. Abdomen dişi bireylerde dairesel, erkeklerde ise oval olup 9 segmentten oluşur. Dişilerde beşinci segmentte spermalege, erkeklerde ise sağa bakan tek bir paramer yapısı mevcuttur. Bu çalışmada, elde edilen sonuçlarla bu türün taksonomik tanınırlığına ve bilinirliğine katkıda bulunuldu.

Anahtar Kelimeler – Cimex lectularius, morfoloji, pedisel, tahtakuruları, tibia

GİRİŞ

Genel olarak, cimicidler kırmızımsı kahverengi, kanatsız, 4,5 ila 7,0 mm uzunluğunda, genel görünümü oval, vücutlarında çok sayıda kıl bulunur ve vücutlarının sırt-karın yönünde yassı olması, dar çatlak ve yarıklarda saklanmalarını sağlar, bu da tespit edilmelerini genellikle çok zorlaştırır. Diğer hematofag böceklerle karşılaştırıldığında, cimicidlerin yarasalar ve kuşlar da dahil olmak üzere az sayıda konakçısı vardır (Reinhardt ve Siva-Jothy, 2007).

Cimicidae familyasında, *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758, halk sağlığı açısından önemiyle öne çıkar (Usinger 1966). Bu tür, "yaygın yatak böceği" olarak bilinir ve varlıkları genellikle kötü sağlık yönetimini ve yoksulluğu gösterir (Reinhardt vd.,2019). Fakat günümüzde, bu yatak

böcekleri, uluslararası seyahatlerin artmasıyla birlikte kişisel eşyalar ve bagajlarda pasif taşınma sonucu daha yeni ve daha varlıklı evlerde çoğalmaları için elverişli koşullar bulmaktadır (Pereira vd. 2018).

Cimex lectularius dünya genelinde ılıman bölgelerde yaygındır (Usinger 1966). Türün kökeni Orta Doğu bölgesine dayanmaktadır ve dünya çapındaki dağılımı insanlarla yakın ilişki yoluyla gerçekleşmektedir. İnsanlara yakınlık, muhtemelen ilkel hominidlerle mağaraları paylaşan yarasalarla olan ilişkiden kaynaklanmıştır (Usinger 1966). Kanıtlar, en az 3500 yıldır cimicidlerin insanlarda parazitlik yaptığını göstermektedir (Panagiotakopulu ve Buckland 1999).

Bu derleme çalışmasında, *Cimex lectularius* yetişkin evrelerinin morfolojik özellikleri, ışık ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) verileri kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerle, halk sağlığı açısından önemli olan bu türün Türkiye'deki tanınırlığını ve bilinirliğini artırmak amaçlanmıştır.

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER VE İŞLEVLERİ

Cimex lectularius morfolojik tanımlaması, Baş (Cephal), Göğüs (Thorax) ve Karın (Abdomen) özelliklerine dayanmaktadır (Şekil 1, 2).

BAŞ (CEPHAL)

Baş bölgesi piramidal ve dorsoventral (sırt-karın) yönde basık bir yapıya sahiptir. Baş, göğüs bölgesine doğru gömülü bir görünüm sergiler. Baş üzerinde beslenme, duyu ve görme işlevlerinden sorumlu temel morfolojik yapılar bulunur.

Bileşik Gözler

Bileşik gözler, sertleşmiş (sklerotize) baş kapsülünün yan kenarlarından çıkarlar ve faset (ommatidyum/göz yüzeyciği)'lerden oluşurlar. Dışa çıkıntılı bu organlar başın en dış kısmını oluşturur. Ocellus (basit göz) yoktur (Shinti Kawasima vd. 2022) (Şekil 2).

Erkek ve dişi bireyler yaklaşık 30 ommatidyuma sahiptir. Buna ek olarak, ergin *C. lectularius* bireylerinde ommatidyumlar arası setaların bulunması bu türe özgü özelliktir (Singh vd., 1996). Eşeyler arasında ommatidyum sayısı bakımından belirgin bir farklılık bulunmamasına rağmen göz boyutlarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Dişi tahtakurularının gözlerinin erkek bireylere kıyasla yaklaşık 22 µm daha uzun ve 18 µm daha geniş olduğu bildirilmiştir (McNeill vd., 2016) (Şekil 3).

Antenler

Başın yan taraflarında yer alan antenler 4 segmentlidir. Birinci segment (scapus), göz ile clypeus arasındaki küçük bir çıkıntı üzerine yerleşmiştir. Bu

segment kalın ve uca doğru genişlemiştir. İkinci segment (pedicellus) uzun ve silindiriğimsidir. Üçüncü ve dördüncü segmentler (flagellum/clavola) daha ince ve iğ şeklindedir. Bu segmentlerin her birinin tabanında, yalnızca yayılmış ve lam üzerine hazırlanmış örneklerde görülebilen çok küçük bir ara segment (interkalar segment) bulunur. Antenler üzerinde sıcaklık ve kokuya duyarlı hassas setalar bulunur (Şekil 4) (Olson vd, 2014).

Olson vd. (2014), *Cimex lectularius*'un anten pediselinde beş farklı sensilla tipi tanımlamıştır (Şekil 5). Bunlardan dördü; tırtıklı kıllar (Şekil 5A), oluklu çıkıntılar (Şekil 5C), düz çıkıntılar (Şekil 5D) ve gömülü konilerdir (Şekil 5F). Beşinci sensilla tipi ise, önceki çalışmalarda bildirilen Şekil 5 E1 ve E2 düz kıllara büyük ölçüde benzemekle birlikte kütiküler gözenek taşımaması nedeniyle bunlardan ayrılmakta ve bu nedenle araştırmacılar tarafından yeni bir sensilla tipi olarak değerlendirilerek E3 olarak adlandırılmaktadır (Olson vd., 2014) (Şekil 5).

Sensillaların pedisel üzerindeki konumları da tiplerine göre farklılık göstermektedir. Tırtıklı kıllar pedisel boyunca homojen şekilde dağılırken (Şekil 5A), düz kıllar (Şekil 5E3) ağırlıklı olarak distal bölgede yoğunlaşmakta, segmentin orta kısmında yalnızca 1-2 adet bulunmakta ve proksimal bölgede hiç görülmemektedir (Şekil 5A). Ergin bireylerde C, D ve F tipi sensillalar, pediselin posteröör kenarının distalinde yer alan belirgin bir duysal yama (SP) içerisinde kümelenmektedir (Şekil 4 ve 5B, D) (Olson vd., 2014).

TEM incelemeleri, sensilla tiplerinin ultrastrüktürel açıdan da birbirinden belirgin biçimde ayrıldığını göstermektedir. Tırtıklı kıllar, konumları, yüksek sayıları, girintili çıkıntılı dış yüzeyleri ve lümenlerinde dendrit bulunmaması sayesinde diğer sensillalardan kolaylıkla ayırt edilmektedir (Şekil 5A). Düz kıllar (E3), gözeneksiz ve kalın tek bir kütiküler duvara sahipken, C ve D tipi sensillalar çok sayıda dendrit ile çok sayıda kanal içeren ince ve gözenekli bir kütiküler duvar taşımaktadır (Şekil 5C, D). Oluklu çıkıntılar (C), diğer sensillalardan farklı olarak dendritleri içeren merkezi lümeni çevreleyen ve sinir elemanı içermeyen ek bir iç kütiküler duvara sahiptir (Olson vd., 2014).

Klypeus/Kalkan

Başın ön kısmında, alın/frons bölgesi ile üst dudak/labrum arasında yer alan sertleşmiş bir dış iskelet/sklerit parçasıdır. Ağız kaslarının tutunması için ana yüzey oluşturur ve beslenme sırasında ağız parçalarına destek verir. Klypeusun her iki yanında rostrumun tabanını çevreleyen ve paraklypeal loblar veya juga olarak tanımlanan maksiller loblar bulunur (Şekil 6) (Usinger, 1966).

Labrum/Üst dudak

Başın en ön kenarında serbest bir sklerit olarak görünür. Yarı dairesel veya yarı elips şeklindedir ve belirgin bir labrum izi ile sınırlanmıştır. Genellikle

başın altına doğru bükülür ve rostrumun kaidesini örter (Şekil 6) (Usinger 1966).

Labium/Rostrum/Alt dudak

Labrumun altında, başın alt ön kenarının hemen iç kısmından çıkar ve dinlenme anında başın altına doğru katlanır. Tabanındaki küçük sklerit plaka dördüncü segment hariç tutulursa, 3 segmentli olarak kabul edilir (Şekil 6) (Usinger 1966).

Labium/Rostrum/Hortum/Delici-emici ağız olarak bilinir. Snodgrass'a (1944) göre, bu yapıda iki çift stilet/iğne bulunur. Dıştaki iki Mandibular stilet/iğneler (Q), deriyi kesen ve delen yapılardır. Uçlarında konak derisine tutunmayı kolaylaştıran geriye dönük küçük dişler bulunur. Mandibular stiletler (çene iğneleri), maksiller stiletlerden (üst çene iğneleri) çok daha incedir ve onların arka yüzeyine yaslanmış durumdadır. Ortadaki Maksiller stilet/iğnelerin arasında nispeten geniş bir besin kanalı ile dar bir tükürük kanalı yer alır. Böcek beslenmeye hazır olduğunda, rostrum öne doğru uzar ve maksiller stiletler konakçının derisine nüfuz eder. Antikoagülan ve anestezi maddeleri içeren tükürük, tükürük kanalı yoluyla konakçıya enjekte edilir. Konakçının kanı besin kanalı yoluyla emilir. Rostrumun kaidesindeki stiletler geriye doğru baş keselerine kıvrılır ve genişlemiş tabanları, protraktör (öne çekici) ve retraktör (geriye çekici) kaslara tutunur; tahtakurularında ne mandibular ne de maksiller stilete bağlı bir kaldırma kolu (lever arm) bulunmaz. Mandibular stiletler uç kısımda (apikalde) ince tırtıklıdır ve sağ maksilla ucu kanca şeklindedir (Şekil 7) (Dickerson ve Lavoipierre 1959).

GÖĞÜS (TORAKS)

Cimex lectularius göğüs (toraks) bölgesi üç segmentten oluşur. Bu segmentleri tanımlayan terimler o segmentlerin sırt (notum) plakalarını ifade eder: Pronotum, ön göğüs sırt plağıdır. Başın hemen arkasındaki geniş yapıdır. Mesonotum, kanat kalıntılarının (*hemelytral pad*) bağlı olduğu orta göğüs segmentinin sırtıdır. Arka göğüs sırt plağı olan Metatorasik notum (metanotum), ergin bireyde de varlığını sürdürür. Ancak erginlerde, mezotorakstan çıkan genişlemiş hemelital pedler (ön kanat pulları) geriye doğru uzanarak metatorasik notumun üzerini kısmen veya tamamen örter. Bu nedenle nimflerde (larvalarda) dışarıdan açıkça görülen metatorasik notum, erginlerde mezotorasik kökenli olan hemelital pedlerin altında gizli kalan bir sırt plakasıdır (Krinsky, 2002) (Şekil 2).

Ergin bireyde son gömlek değişiminden (ekdisis) sonra mezotorasik notum tek bir düz plaka olarak kalmaz, Scutellum, Sağ ve Sol Hemelital Pedler olmak üzere üç farklı morfolojik yapıya farklılaşır. "Scutellum" adı verilen üçgen kalkan şeklindeki yapı, evrimsel ve gelişimsel olarak nimf evresindeki mezotorasik notumun (orta göğüs sırt plağının) merkez

bölgesinin farklılaşması ve genişlemesiyle meydana gelir. Dolayısıyla ergin bireydeki Scutellum, 5. evre nimfteki mezotorasik notumun (orta göğüs sırtının) tamamına değil, bu yapının erginleşme sırasında merkezi hat boyunca özelleşerek oluşturduğu orta kalkan bölgesine denk gelir. Scutellum, bu kalıntı kanatların ortasında birleştirici ve destekleyici bir yapı olarak görev yapar. Temel işlevi, böceğin göğüs yapısına mekanik destek sağlamak, gövdeyi sertleştirmek ve uçuş kaslarının (diğer uçabilen böceklerde olduğu gibi) bağlanma yüzeyini oluşturmaktır. *Cimex lectularius* uçamayan bir böcek olsa da, bu anatomik yapı evrimsel süreçten miras kalmıştır ve toraksın (göğüs) temel iskeletini oluşturmaya devam eder (Shinti Kawasima vd. 2022) (Şekil 2).

Scutellumun yan tarafları ise kanat kalıntılarına "Hemelytral pad" dönüşür. Bu yapı "hemelital ped", "hemelitrone kalıntısı" veya "körelmiş ön kanat pulu" olarak da tanımlanır. Hemelital ped'ler, küçük, oval ve derimsi yapıya körelmiş ön kanatlardır. Ergin bireydeki hemelital pedler, nimf (larva) evresindeki mezotorasik notum (mesonotum) üzerindeki kanat kabartılarından gelişir. Tahtakuruları evrimsel süreçte uçuş yeteneklerini kaybettikleri için ön kanatları körelmiş, küçülmüş ve pul/ped (pad) şeklini almıştır. Arka kanatlar tamamen yok olmuştur (Shinti Kawasima vd. 2022) (Şekil 2).

Bacak Morfolojisi

Cimex lectularius, tüm böcekler gibi göğüs (toraks) segmentlerine bağlı eklemlili 3 çift bacağı sahiptir. Bacaklar 5 segmentten meydana gelir (Şekil 8). Coxa (Koksa): Bacağı gövdeye bağlayan, genellikle geniş ve kısa olan ilk bazal segmenttir. Trochanter (Trokanter): Coxa ile femur arasında yer alan, bacağın hareket kabiliyetini artıran çok küçük, mafsalsı benzeri ikinci segmenttir. Femur: Bacağın en kalın, en güçlü ve genellikle en belirgin olan üçüncü segmentidir. Tibia: Femurdan sonra gelen, genellikle daha ince, uzun ve üzerinde ince dikenler/kıllar barındıran dördüncü segmenttir. Tarsus: Bacağın en ucunda yer alan, kendi içinde alt segmentlere (tarsomer) ayrılan ayak kısmıdır. Tarsus 3 segmentlidir ve ucunda tutunmayı sağlayan iki adet tırnak (*claws*) taşır (Usinger, 1966).

Tibial Tutunma Ayakları (TAP)'nın Morfolojisi ve İşlevleri

Baker ve Goddard (2018), taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemelerinde, her bir bacağın tibia ucunun ventral yüzeyinde, tibianın yastıksı bir uzantısı üzerinde yer alan ve fossula spongiosa olarak tanımlanan Tibial Tutunma Ayakları (Tibial Attachment Pads, TAP) bulunduğunu bildirmiştir (Şekil 9, 11A). Araştırmacılar, bu kılların uzunluğunun 35,6–59,3 µm arasında değiştiğini ve kılların üzerindeki yastıksı uzantının oldukça engebeli (pürüzlü) bir yüzey yapısına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 11 B, D). Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri ise tibial fırça kıllarının içinin boş olduğunu ve gözenekli bir kutikula yapısına sahip

bulunduğunu göstermiştir (Şekil 11C, D). Ayrıca, tibial fırça kıllarının uç kısımlarına yakın bölgede belirgin şekilde spatula (kaşık) formu aldığı; dorsal yüzeylerinin düz, ventral yüzeylerinin ise yuvarlatılmış çıkıntılar taşıdığı ortaya konmuştur (Şekil 11E, F). Bunun yanı sıra, kılların tabanında yerleşmiş bezsel bir epitel dokunun fırça kıllarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 10, 11G). Tibial fırça kılları arasında ise uç kısmında belirgin bir gözenek taşıyan düz duvarlı trikoid duyu kılları (trikoid sensilla) tespit edilmiştir (Şekil 11H). Tibial tutunma kıllarının bacak çiftlerine göre farklı yoğunluklarda dağıldığı belirlenmiştir. Buna göre, ortalama TAP sayısı ön bacak tibiasında (Tibia I) 134–138, orta bacak tibiasında (Tibia II) 83–88 ve arka bacak tibiasında (Tibia III) 43–48 olarak rapor edilmiştir (Şekil 14 K, I) (Baker ve Goddard, 2018).

Farklı Ortam ve Biyolojik Eylemlerde Tutunma Mekanizmaları

Reinhardt vd. (2019), pürüzsüz yüzeylerde tutunma ağırlıklı olarak tibial yapışma pedleri (TAP) aracılığıyla sağlanırken, daha pürüzlü yüzeylerde ise mekanik tutunma esas olarak tarsal tırnaklar tarafından gerçekleştirildiğini belirtmiştir (Şekil 12, 13, 14) (Reinhardt vd., 2019).

Reinhardt vd. (2019), erkek bireylerin pürüzsüz dişi kütikulasına tutunmasında temel rolün tarsal tırnaklardan ziyade tibial tutunma pedleri (TAP) tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur. Kriyo-taramalı elektron mikroskobu (Cryo-SEM) incelemeleri ve canlı bireyler üzerinde yapılan gözlemler, çiftleşme sırasında erkek bireyin özellikle sol taraftaki üç bacağı ile sağ taraftaki bir bacağı kullandığını göstermiştir. Araştırmacılar, özellikle sol orta ve arka bacaklarda bulunan TAP yapılarındaki tutunma kıllarının (tenent setae) spatula biçimli uçlarının, dişinin dorsal kütikulasındaki pürüzsüz yüzeyle geniş bir temas alanı oluşturduğunu ve böylece güçlü bir adeziv tutunma ara yüzü meydana getirdiğini bildirmiştir (Şekil 14A, B). Çiftleşme sırasında tarsal tırnaklar morfolojik bir refleksle yukarı doğru kaldırılarak dişinin vücut yüzeyiyle temas etmeleri engellenmektedir. Bu durum, erkek bireyin dişi kütikulasına tutunmasında temel mekanik rolün tarsal tırnaklardan ziyade tibial tutunma pedleri (Tibial Attachment Pads, TAP) tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 13B) (Reinhardt vd., 2019).

Ayrıca, çiftleşme sırasında erkeğin dişi birey dışında bir yüzeyle temas ettiği durumlarda, adeziv özellik gösteren TAP yapılarının devre dışı bırakıldığı ve yüzeyle tutunmanın yalnızca sağ bacaklardaki tarsal tırnakların mekanik kavrama etkisiyle sağlandığı belirlenmiştir. Bu bulgular, yatak böceklerinde tutunma mekanizmasının temas edilen yüzeyin özelliklerine ve davranışsal bağlama göre farklı yapısal adaptasyonlarla gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 14) (Reinhardt vd., 2019).

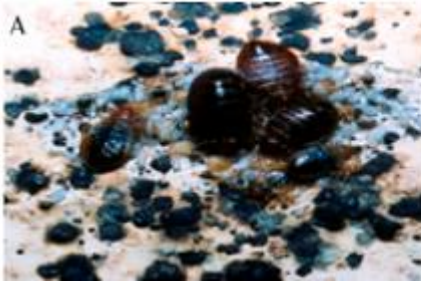
Pürüzlü Yüzeylerde Tutunma

Reinhardt vd. (2019), pürüzlü veya lifli yüzeylerde, örneğin filtre kâğıdı üzerinde ya da beslenme sırasında insan derisi gibi biyolojik yüzeylerde, yatak böceklerinin temel tutunma organının adezif özellik gösteren tibial tutunma pedleri (TAP) değil, tarsal tırnaklar olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, beslenme davranışı sırasında hem ergin erkek ve dişi bireylerde hem de nimflerde, altı bacağın tamamında bulunan çiftli tarsal tırnakların temel mekanik tutunma yapısı olarak görev yaptığını göstermiştir (Şekil 12, 13).

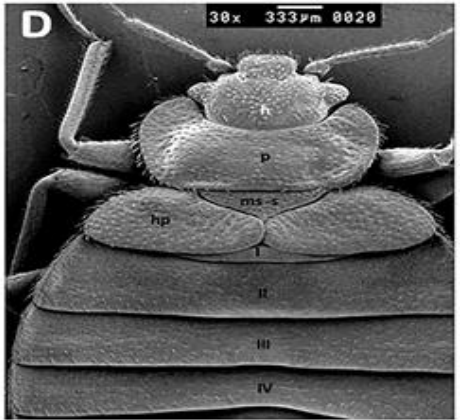
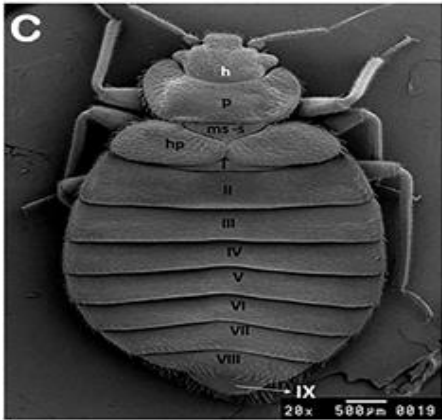
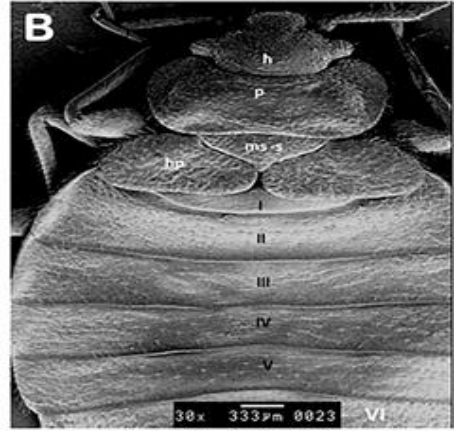
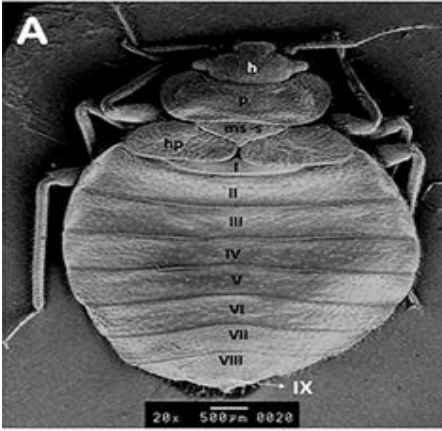
Tarsus ucunda bulunan tırnak çiftlerinin lateral olarak açılarak V şeklinde bir konformasyon oluşturduğu ve bu yapısal esnekliğin, tırnakların insan derisindeki mikro kıvrımlara, epidermal kıllara veya pürüzlü yüzeylerdeki lif yapılarına mekanik olarak kenetlenmesini (mechanical interlocking) sağladığı belirtilmiştir. Böylece, yatak böceklerinde tutunma mekanizmasının yüzey özelliklerine bağlı olarak değiştiği; pürüzsüz yüzeylerde TAP aracılı adezif tutunmanın, pürüzlü ve düzensiz yüzeylerde ise tarsal tırnaklara dayalı mekanik tutunmanın ön plana çıktığı ortaya konmuştur (Şekil 12, 13) (Reinhardt vd., 2019).

ABDOMEN (KARIN)

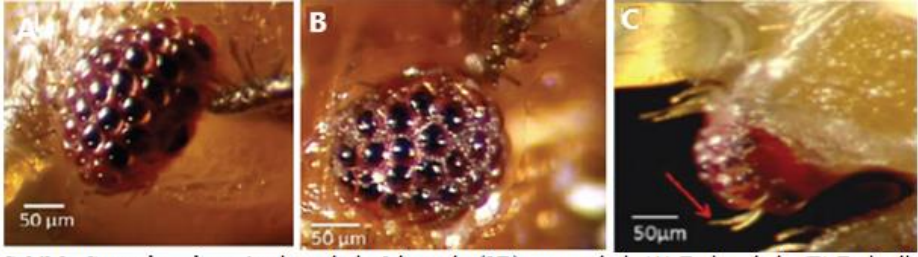
Yetişkin dişilerin karın bölgesi dairesel, erkek bireylerin ise oval şekildedir (Şekil 1). Bu bölüm 9 segmentten meydana gelir (Şekil 2). Erkeklerde karın bölgesinin son kısmında çiftleşmeyle ilgili adaptasyonlar bulunur. Dişi *C. lectularius* spermalegesi, beşinci segmentin sol tarafının lateral ve merkezi kısmı arasında yer alır. Bu genital açıklık, beşinci segmentin içe doğru kıvrılmasından başlayıp bu segmentin iç kısmındaki küçük bir delikte sonlanan bir yarıktan oluşur (Şekil 8C, E, F). Spermalege beşinci segmentin her iki tarafında, sadece sol tarafta ya da sadece sağ tarafta bulunur (Şekil 15E, F). Bu bulgu daha önce Kamimura ve ark. (2014) tarafından bazı *C. lectularius* örneklerinde gözlenmiştir. Erkek *C. lectularius* parameri, sivri uçlu ve pigofor boyunca sağa bakan tek, uzun bir yapıdır (Şekil 15D) (Shinti Kawasima vd. 2022).



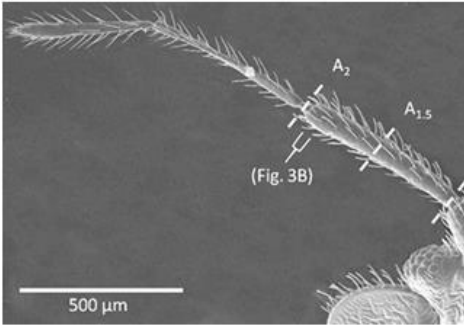
Şekil 1. *Cimex lectularius*. A: Toplama yerindeki koloni, B: Dişinin dorsal görünümü, C: Erkeğin dorsal görünümü (Shinti Kawasima vd., 2022).



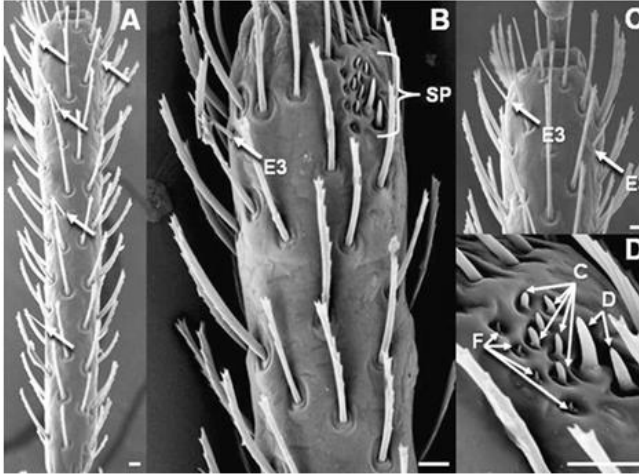
Şekil 2. A: *Cimex lectularius* yetişkin dişisinin tüm vücudu, B: detaylı görünüm. C: *Cimex lectularius* yetişkin erkeğinin tüm vücudu, D: detaylı görünüm. h: baş, p: pronotum, ön göğüs segmentinin (prothorax) üst/sırt kısmını kaplayan sertleşmiş büyük plaka, ms-s: scutellum, üçgen veya kalkan biçimindeki toraks plakası. hp: **hemelitrall ped veya körelmiş ön kanat pulu**. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX: Abdominal segmentler (Shinti Kawasima vd. 2022).



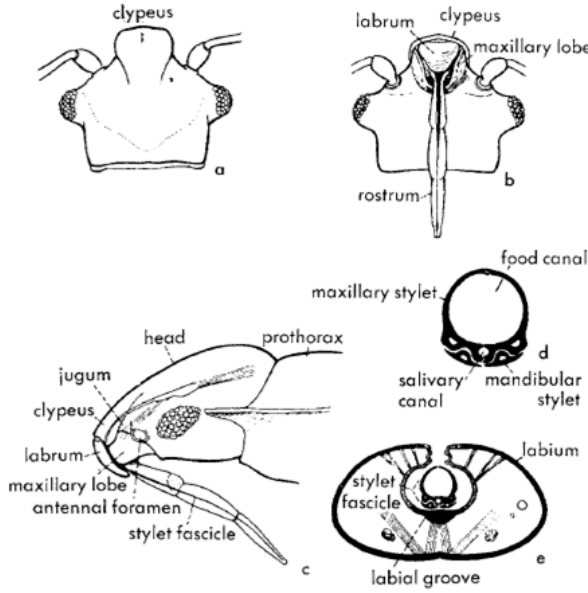
Şekil 3. *Cimex lectularius*'a ait gözlerin 3 boyutlu (3D) görüntüleri: (A) Ergin erkek, (B) Ergin dişi, (C) Ommatidyumlar arası setalar (McNeill vd., 2016).



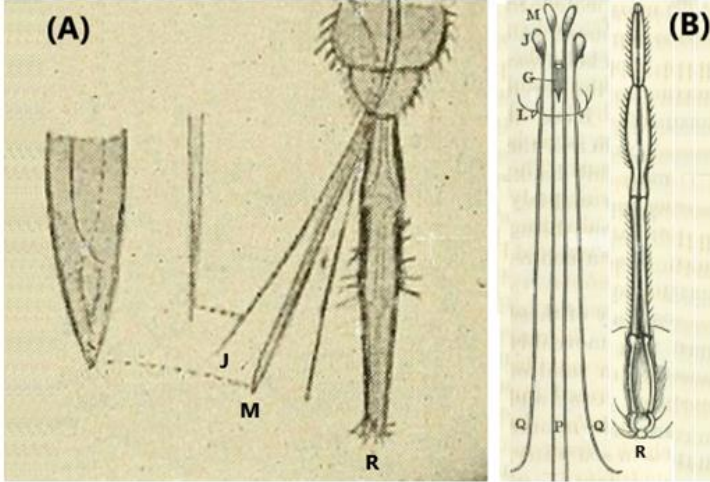
Şekil 4. *C. lectularius* antenin ventral (karın tarafı) görünümündeki Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü; antenal ablasyonların (A2, A1.5 ve A1) konumları (kesikli çizgiler) ve pedisel segmentinin arka distal kenarındaki duyu bölgenin yeri (bkz. Şekil 3B). Sağ alt köşede, soldan sağa doğru protoraks (ön göğüs), bileşik göz ve probosis (emici ağız parçası) görülmektedir (Olson vd., 2014).



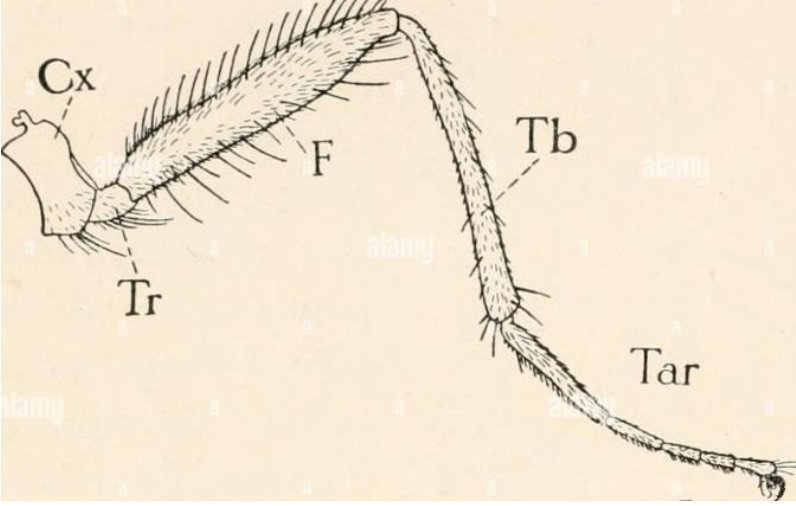
Şekil 5. Erkek *C. lectularius* pediselinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri; yeni keşfedilen düz kıllar (E3) ve bir distal duyu bölge (SP) gösterilmektedir. (A) Sol pediselinin dorsal (sırt tarafı) görünümü; çok sayıda tırtıklı kıl ve beş adet düz kıl (oklar) görülmektedir. (B) Sol pediselinin distal yansıma posterior (arka) görünümü; tırtıklı kıllar, bir adet düz kıl ve duyu bölge görülmektedir. (C) Sol pediselinin iki E3 kılımlı gösteren yakın çekim görüntüsü (oklar). (D) C, D ve F tipi sensillaları (duyu kılları) içeren duyu bölgenin yakın çekim görüntüsü. Ölçek çubukları = 10 µm (Olson vd., 2014).



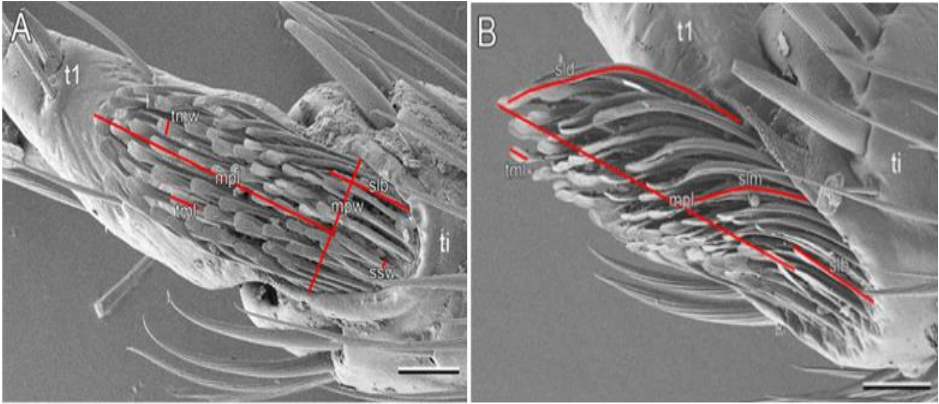
Şekil 6. *Cimex lectularius*'un baş ve rostrum detayları. Baş dorsal (a), ventral (b), lateral görünüm (c). Maksiller ve mandibuler stiletler ile tükürük ve besin kanallarının labiumdaki konumları (d). Labium/proboscis transversal kesitinde anatomik yapılar (e) (Snodgrass 1944).



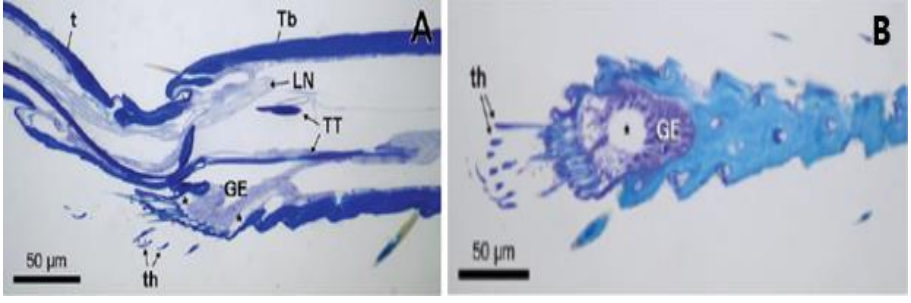
Şekil 7. (A): *Cimex lectularius*'ta delici-emici stiletlerin (mandibul ve maksil) km (labium) içerisindeki konumu (Marlatt, 1916). **(B):** *Cimex lectularius*'un delici-emici ağız yapısının (proboscis/rostrum) longitudinal görünümü. M: Maksiller iğne/stylet distal ucu. J: Mandibular stilet distal ucu. G: Maksiller kanallı birleşme bölgesi. L: Mandibular stilet üzerindeki geriye dönük dişler (serrations). P: Maksiller stilet distal ucu. Q: Sağ ve sol mandibular stilet proksimal ucu. R: Rostrum/Labium (Snodgrass, 1944).



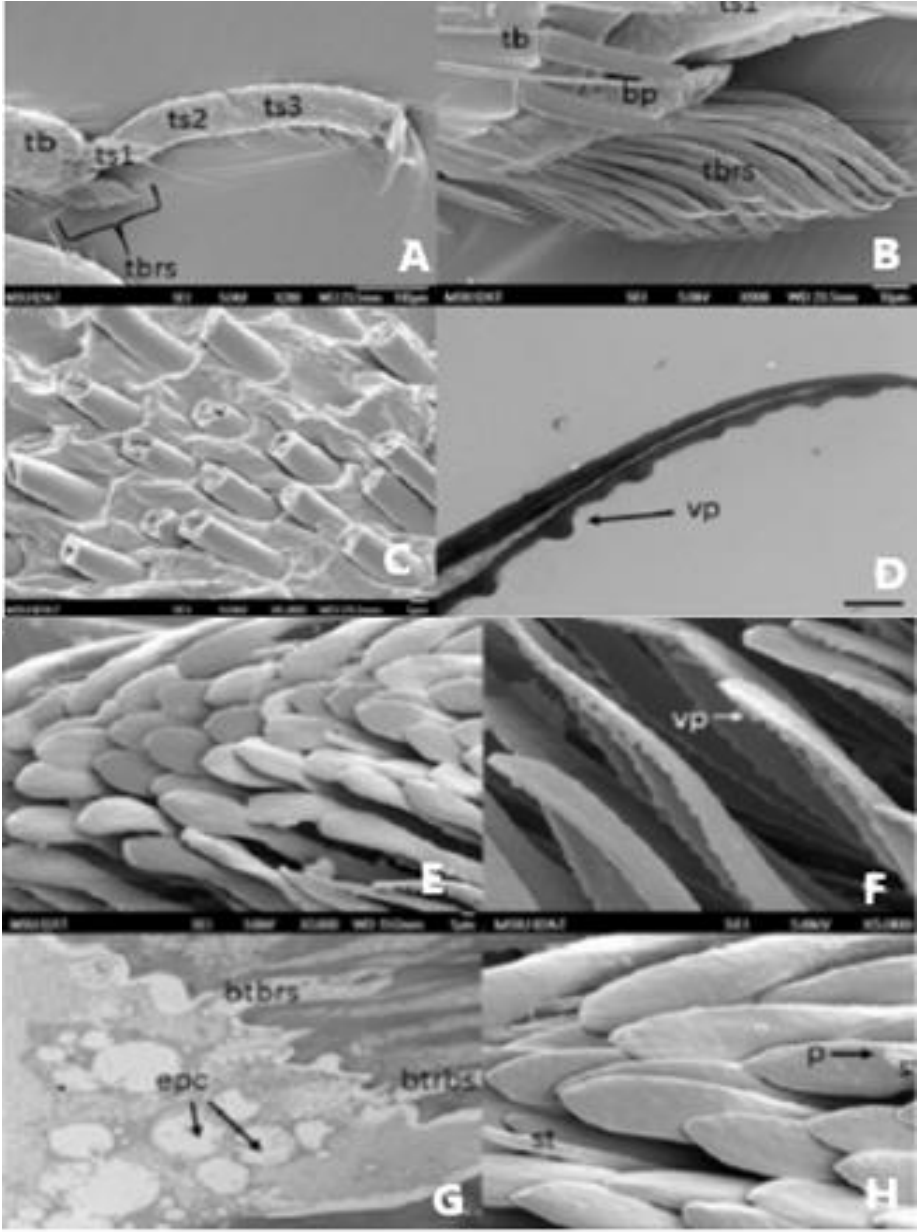
Şekil 8. *Cimex lectularius* türünde 5 segmentli bacak yapısı. Cx: Coxa (Koksa), Tr: Trochanter (Trokanter), F: Femur, Tb: Tibia, Tar: Tarsus (Crosby, 1913).



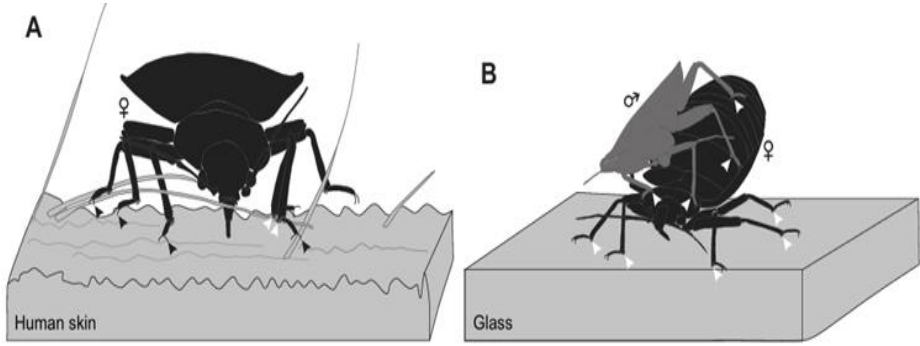
Şekil 9. Yetişkin *Cimex lectularius* Tibial Tutunma Ayakları (TAP) ventral ve lateral görünümü. A: Dişi ön ayağı. B: Erkek ön ayağı. Setaların uzunluğundaki gradyanın distal yönde arttığına dikkat edin. mpl: TAP'ın maksimum uzunluğu. mpw: TAP'ın maksimum genişliği. Slb: TAP'ın taban bölgesindeki seta uzunluğu. Tmw: seta ucunun maksimum genişliği. Tml: seta ucunun maksimum uzunluğu. Ssw: seta gövdesi genişliği. Slm: TAP'ın orta kısmındaki seta uzunluğu. Sld: distal taraftaki seta uzunluğu. t1: birinci tarsomer. Ti: tibia. Ölçek çubukları: 20 μ m (Reinhardt vd., 2019).



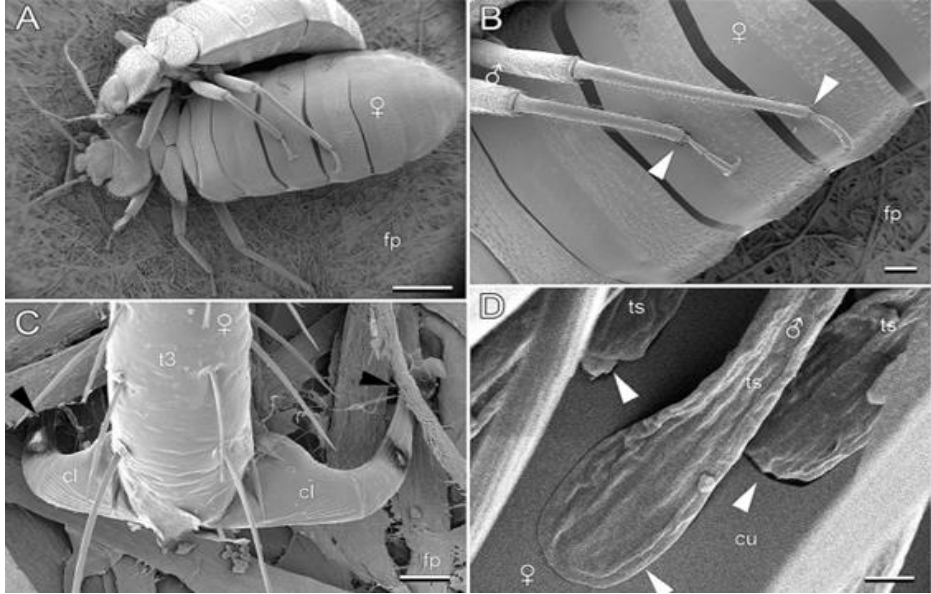
Şekil 10. *C. lectularius* (A, erkek orta bacak) tibial yastığının uzunlamasına kesiti, bez epitelyumunu (GE), deri altı boşluğunu (yıldız işaretleri) ve içi boş tenent kollarını (th) göstermektedir. Tibia'nın iki tibial tendon (TT) içerdiğine dikkat edin; bunlardan ventral olanı bez epitelyumuna yakındır. B'deki (*C. lectularius* dişi arka bacak) kesit düzlemi, A'dekine diktir ve tibia'nın ventral yüzeyine aşağı yukarı paraleldir. LN: bacak siniri, t: tarsomerler, Tb: tibia. Tüm bacaklardaki histolojik organizasyon benzerdir; bu şekilde gösterilen fotoğraflar, mevcut en iyi görüntüler oldukları için seçilmiştir (Kim vd., 2017).



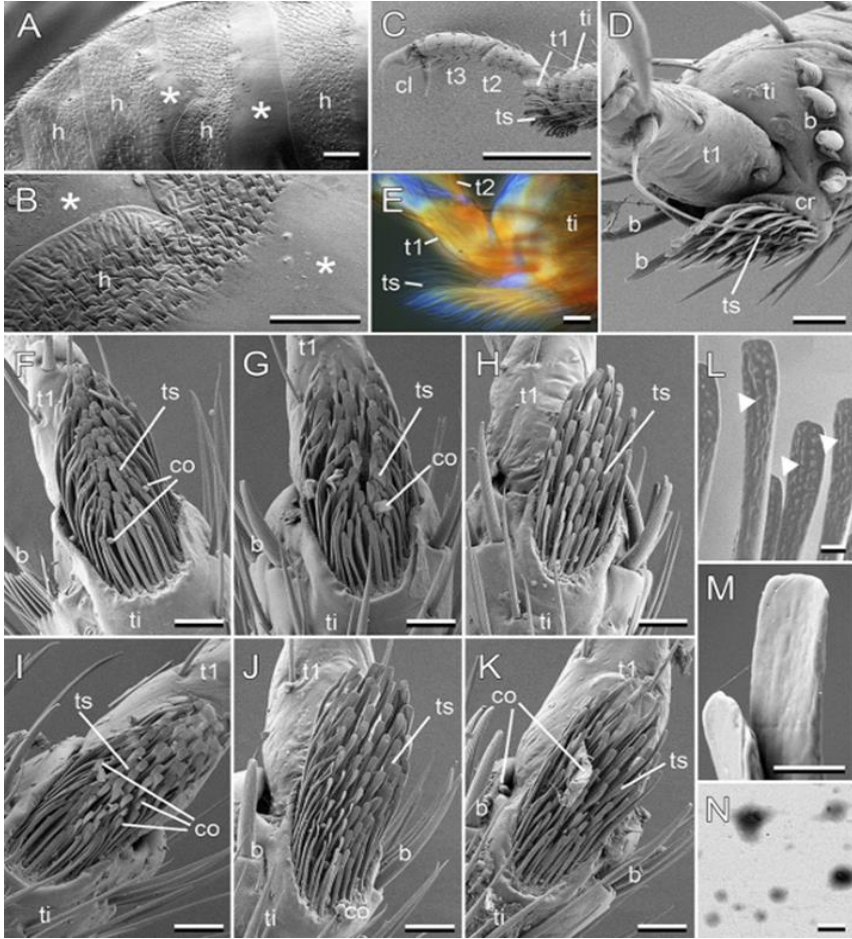
Şekil 11. Fossula spongiosa'yı (tibial yastık) oluşturan tibial fırça kıllarının SEM ve TEM görüntüleri. A: Dişi tahtakurusu I. bacağı. B: Tibial fırça kılları (tbrs). C: İçi boş tibial fırça kılları. D: Çıkıntılara sahip, içi boş tibial fırça kılı ucu. E: Sırt (dorsal) yüzeyi. F: Karın (ventral) yüzeyi. G: İçi boş tibial fırça kılı tabanının epitel hücreleri ile teması. H: Tibial fırça kılları arasındaki trikoid duyu kılı. Bp: taban yastığı, btbrs: tibial fırça kılı tabanı, epc: epidermal hücre, p: gözenek, st: trikoid duyu kılı (sensillum trichodeum), tb: tibia, tbrs: tibial fırça kılı, ts: tarsus, vp: ventral çıkıntı (Baker ve Goddard, 2018).



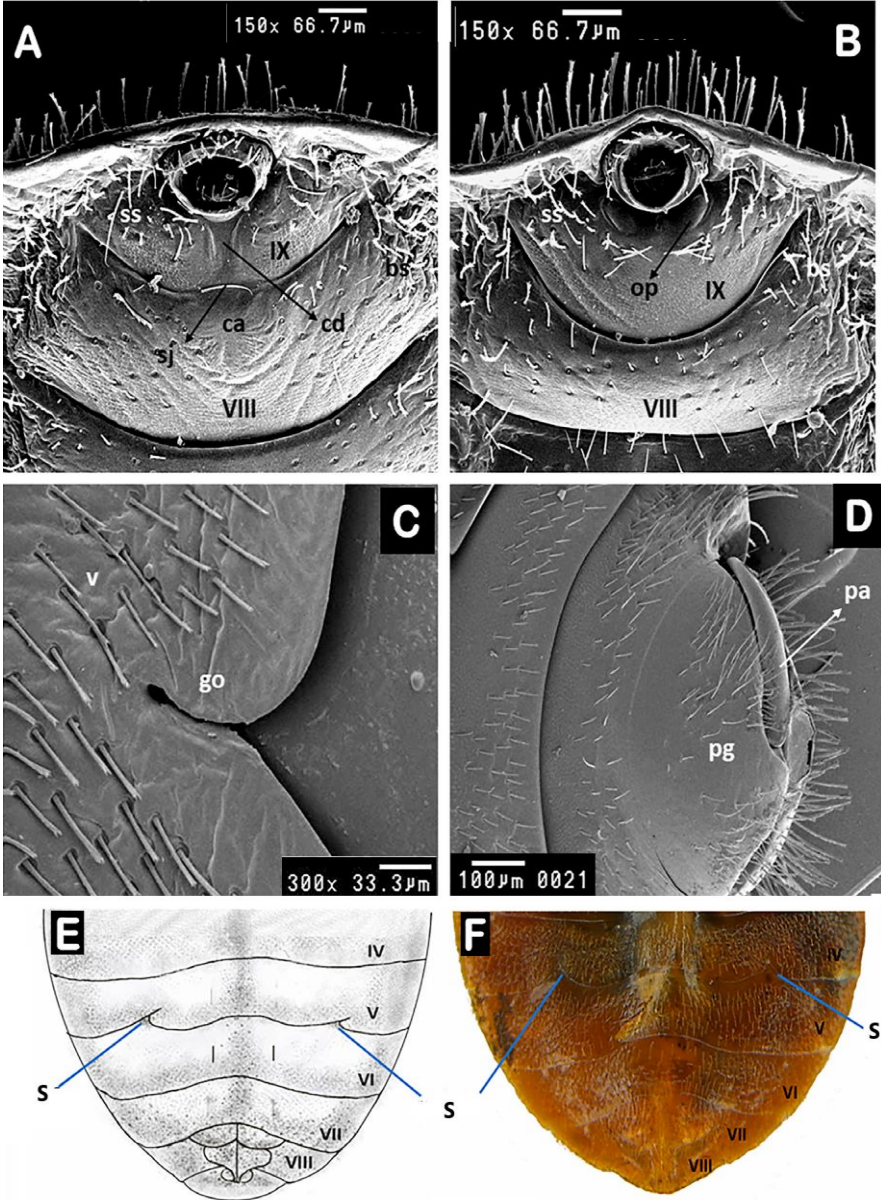
Şekil 12. *C. lectularius* erkek ve dişilerde ayak pozisyonuna ilişkin şematik diyagram. Tahtakurularının insan derisine (A) ve cam yüzey ile dişi integümentine (B) tutunması gösterilmiştir. Beyaz ok uçları, Tibial Tutunma Ayakları (TAP)'nın substratla temas halinde olduğunu göstermektedir. Siyah ok uçları ise insan kılları ve deri kıvrımlarıyla birbirine kenetlenmiş pençeleri göstermektedir (Reinhardt vd., 2019).



Şekil 13. Çiftleşme sırasında *C. lectularius* tutunma bölgelerinin kriyo-taramalı elektron mikroskobu (cryo-SEM) görüntüleri. A: Dişi, pençeleriyle substrata (filtre kâğıdı) tutunmuştur. Erkek, sol orta ve arka bacağı dişinin abdomenine yerleştirerek tutunur. B: A'nın detay görüntüsü; beyaz ok uçları, erkek TAP'lerinin dişinin dorsal abdomenindeki pürüzsüz kutikulası üzerine yerleştiğini göstermektedir. Pençeler substratla temas etmez ve dişiye kavramada kullanılmaz. C: Dişi pençelerinin (cl) filtre kâğıdı substratının lifli ağı ile kenetlenmesinin detay görüntüsü (siyah ok uçlarıyla gösterilmiştir). D: TAP'e ait setaların spatulat uçlarının dişi epikutikular yüzeyiyle yakın teması. t3: 3. Tarsomer. ts: tenent setalar. Ölçek çubukları: A, 1 mm; B, 200 µm; C, 20 µm; D, 2 µm (Reinhardt vd., 2019).



Şekil 14. Ergin *C. lectularius* dorsal abdomen, tarsus ve tutunma pedleri. A: Çiftleşme sırasında erkek tutunma sisteminin substratı, dişi abdomeninin epikutikular yüzeyi, enine setal bantlar (h) ve bunlar arasında yer alan pürüzsüz bantlar (yıldızlar). B: A'nın detay görüntüsü; pürüzsüz bantlar şişkin, genişlemiş dişilerde görülür ve erkek TAP'lerinin tenent setalarla birlikte en önemli tutunma bölgeleridir. C: Dişi ön bacak tibiası ve tarsusunun ventro-lateral görünümü. D: Dişi ön bacağında tibio-tarsal eklemin detay görüntüsü. E: Tarsal setaların uçlarında ve intersegmental bağlantıları çevreleyen membranöz alanlarda resilin varlığını gösteren floresans mikroskobu görüntüsü (mavi). Dişi ön bacak (F), orta bacak (G) ve arka bacakta (H) TAP'in detayları. Erkek ön bacak (I), orta bacak (K) ve arka bacakta (K) TAP'in detayları. Terminal TAP'in detayları: Dorsal görünüm (L), ventral görünüm (M); ok uçları setaların terminal spatulalarının oluklu dorsal yüzeyini göstermektedir. (N) Düz, altın kaplı bir yüzeyden TAP setaların ayrılmasından sonra kalan ayak izleri. b: dikenimsi kıl, cl: tırnak, cr: kutikular çıkıntı, co: kontaminasyon, h: setalı bant, t1–t3: tarsomer 1–3, ti: tibia, ts: tutunucu setalar. Ölçek çubukları: A–C, 200 µm; D–K, 20 µm; L–N, 2 µm. Tüm görüntüler E hariç kriyo-SEM mikrograflarıdır (Reinhardt vd., 2019).



Şekil 15. *Cimex lectularius* ventral görünümü ve abdomenin terminal segmentleri. A. Dişi. B. Erkek. C. Dişide genital açıklık. D. Erkek genital organı. E. Ergin *Cimex lectularius* dişisinde çift genital açıklıklar/spermathegenin şematik gösterimi. F. Genital açıklıkların optik mikroskopi görüntüsü. Kısaltmalar: V-IX: V-IX.

Abdominal segmentler. cd: Merkezi çöküntü. sj: 8. ve 9. segmentlerin merkezi kısımdaki birleşme sınırı. ca: 8. segmentin merkezi ve posterior kısmında yer alan çevrelenmiş alan. ss: Ucu düz ve sivri duyu organları. bs: Üzeri dikencikli duyu organları. op: Oval psödo-segment. go: Genital açıklık. pg: Pigofor, IX. abdominal segment, genital kapsül. pa: Paramer, erkek çiftleşme organı kancası (Shinti Kawasima vd. 2022).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yatak tahtakurusu *Cimex lectularius* morfolojik özellikleri üzerine gerçekleştirilen bu derleme çalışma, bu türün zorunlu hematofag yaşam biçimine uyum sağlamış yapısal modifikasyonlar geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Baş bölgesindeki rostrum ve stilet kompleksinin, epidermisi en az mekanik hasarla delmeye ve kan emme sırasında uygun bir beslenme kanalı oluşturmaya yönelik özelleşmesi; antenlerde bulunan çeşitli sensilla tiplerinin konakçı kaynaklı kimyasal ve fiziksel uyarıların algılanmasındaki rolleri; bileşik gözlerin ışık şiddeti ve hareket algısına katkısı ile bacaklarda bulunan tarsal tırnaklar ve tibial adezyon yapılarının farklı yüzeylerde tutunmayı kolaylaştırması, türün konak bulma, beslenme ve barınma davranışlarıyla doğrudan ilişkilidir. Özellikle son yıllarda taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve konfokal mikroskopi gibi ileri görüntüleme tekniklerinin kullanılması, daha önce ışık mikroskobuyla ayrıntılı olarak değerlendirilemeyen çok sayıda mikromorfolojik karakterin tanımlanmasını sağlamış ve bu yapıların olası fonksiyonları hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Bununla birlikte, farklı araştırmalarda sensilla tiplerinin sınıflandırılması, terminolojisi ve homolog yapıların isimlendirilmesinde tam bir görüş birliğinin bulunmaması, çalışmalar arasında doğrudan karşılaştırma yapılmasını güçleştirmektedir. Ayrıca, bazı morfolojik karakterlerin cinsiyet, gelişim evresi ve beslenme durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği bildirildiğinden, gelecekte gerçekleştirilecek çalışmaların standart örnek hazırlama protokolleri, ortak terminoloji ve nicel morfometrik analizlerle desteklenmesi büyük önem taşımaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak, ışık ve elektron mikroskobu destekli morfolojik çalışmalar yalnızca *C. lectularius* biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına değil, aynı zamanda Cimicidae üyelerinin taksonomik ayrımının güçlendirilmesine, istilacı popülasyonların doğru tanımlanmasına ve morfolojik verilerin moleküler filogenetik bulgularla bütünleştirilmesine de önemli katkılar sağlayacaktır.

REFERANSLAR

- Baker, G. T., & Goddard, J. (2018). Structure and number of tibial brush setae making up the fossula spongiosa in bed bugs, *Cimex lectularius* L.(Hemiptera: Cimicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 120(2), 251-254.
- Crosby, C. R. (1913). *Elementary Entomology*. By E. Dwight Sanderson and CF Jackson. Ginn & Co. 1912. Pp. vii+ 372. *Science*, 37(945), 220-223.

- Dickerson, G., & Lavoipierre, M. M. J. (1959). Studies on the Methods of Feeding of Bloodsucking Arthropods: II.—The Method of Feeding Adopted by the Bed-Bug (*Cimex Lectularius*) When Obtaining a Blood-Meal from the Mammalian Host. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 53(3), 347-357.
- Kim, D. Y., Billen, J., Doggett, S. L., & Lee, C. Y. (2017). Differences in climbing ability of *Cimex lectularius* and *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of economic entomology*, 110(3), 1179-1186.
- Krinsky WL. (2002). True bugs (Hemiptera). In “Medical and Veterinary Entomology”, 2nd Ed. (G.R. Mullen & L.A.Durden, eds). Academic Press, London, p. 80-87
- Krinsky, W. L. (2019). True bugs (Hemiptera). In *Medical and veterinary entomology* (pp. 107-127). Academic Press.
- McNeill, C. A., Pereira, R. M., Koehler, P. G., McNeill, S. A., & Baldwin, R. W. (2016). Behavioral responses of nymph and adult *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) to colored harborages. *Journal of Medical Entomology*, 53(4), 760-769.
- Olson, J. F., Moon, R. D., Kells, S. A., & Mesce, K. A. (2014). Morphology, ultrastructure and functional role of antennal sensilla in off-host aggregation by the bed bug, *Cimex lectularius*. *Arthropod structure & development*, 43(2), 117-122.
- Panagiotakopulu, E., & Buckland, P. C. (1999). *Cimex lectularius* L., the common bed bug from Pharaonic Egypt. *Antiquity*, 73(282), 908-911.
- Pereira, R. M., de Carvalho Campos, A. E., Justi, J., & Lage, M. R. (2018). The bed bug resurgence in Latin America. *Advances in the biology and management of modern bed bugs*, 51-57.
- Reinhardt K, Siva-Jothy MT. (2007). Biology of the bed bugs (Cimicidae). Annual Review of Entomology. 52(1):351–374.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.040306.133913>
- Reinhardt, K., Voigt, D., & Gorb, S. N. (2019). Evidence for a sexually selected function of the attachment system in bedbugs *Cimex lectularius* (Heteroptera, Cimicidae). *Journal of Experimental Biology*, 222(12), jeb206136.
- Shinti Kawasima, E., Fernandes Depaiva, V., Belintani, T., Garcia Justino, H. H., Nascimento, J. D., Pinotti, H., ... & Da Rosa, J. A. (2022). Morphological studies of *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae). *Revista Chilena de Entomología*, 48(4), 695-705.
- Shinti Kawasima, E., Fernandes Depaiva, V., Belintani, T., Garcia Justino, H. H., Nascimento, J. D., Pinotti, H., ... & Da Rosa, J. A. (2022). Estudios morfológicos de *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae). *Revista chilena de entomología*, 48(4), 695-705.
- Singh, R. N., Singh, K., Prakash, S., Mendki, M. J., & Rao, K. M. (1996). Sensory organs on the body parts of the bed-bug *Cimex hemipterus* Fabricius (Hemiptera: Cimicidae) and the anatomy of its central nervous system. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 25(1-2), 183-204.
- Snodgrass, R.E. (1944). *The feeding organs of insects*. Smithsonian Miscellaneous Collections, 104(2), 1–113.
- Usinger, R. (1966). Monograph of Cimicidae. Thomas Say Foundation, vol. 7. Entomological Society of America, College Park, MD.

Triazol Türevi Bazı Fungusitlerin Alan Güçlendirilmiş Örnek Enjeksiyonu İle Kapiler Elektroforez Tayini

**Tufan GÜRAY^{1*},
Ulku Dilek UYSAL²**

1* Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, F-5 blok, 26480 Eskişehir, Türkiye
tufanguray@gmail.com ORCID No: 0000-0002-7509-7260

2, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 26470, Eskişehir, Türkiye
uysalulkudilek@gmail.com ORCID No: 0000-0003-1572-9753

ÖZET

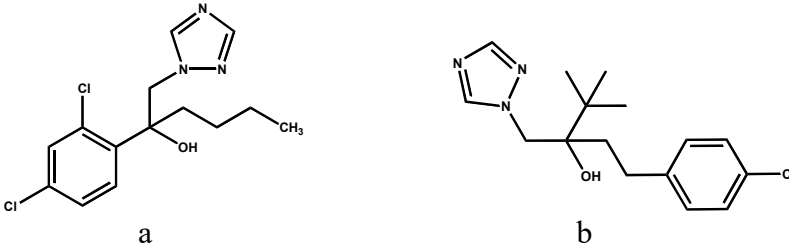
Kapiler elektroforez yöntemiyle triazol türevi fungusit olan hegzakonazol ve tebukonazol kalıntılarının tayini için bir yöntem geliştirilmiştir ve bu iki fungusitin toplam miktarı belirlenmiştir. 7,5 mM NH_4HCO_2 çözeltisi ve %10 (h/h) metanol (pH=2,1) içeren bir arka plan elektroliti kullanılarak; 50 cm etkin uzunluğa ve 50 μm iç çapa sahip, kaplanmamış bir erimiş silika kapiler kolon üzerinde, 25 kV potansiyel uygulanıp 200 nm dalga boyunda ve 30 °C sıcaklıkta ölçüm yapılarak kapiler elektroforetik ayırım gerçekleştirilmiştir. Hassasiyeti artırmak amacıyla, 3 saniyelik hidrodinamik su tapası enjeksiyonu ve 25 saniyelik elektrokinetik numune enjeksiyonu “çevrimiçi numune zenginleştirme” yöntemlerinden olan “alan güçlendirilmiş örnek enjeksiyonu” tekniği (AGÖE) tekniğinden yararlanılmıştır. Ayrıca, numune çözücüsü olarak 1:1 hacim oranında metanol-su karışımı kullanılmıştır. Bu yöntemle, toplam miktar için en düşük tespit sınırı 0,0303 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tayin sınırı ise 0,101 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem, ICH tarafından belirlenen kılavuz ilkelerine göre doğrulanmıştır. Doğrulanmış bu yöntem, çevrimiçi ön zenginleştirme teknikleri ile kapiler elektroforezi birleştirerek hegzakonazol ve tebukonazolün eş zamanlı ölçümünü sağlayan, bilginiz dahilindeki ilk yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Hegzakonazol, tebukonazol, fungusit, kapiler elektroforez, çevrimiçi numune zenginleştirme, alan güçlendirilmiş örnek enjeksiyonu.

GİRİŞ

Tarımda, mantar istilalarının yol açtığı bitki hastalıklarıyla mücadele etmek amacıyla fungusitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fungusitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri kamuoyunda endişe yaratmaktadır. Bu nedenle, toprak, su ve tarımsal ürünler dahil olmak üzere birçok matristeki fungusit kalıntılarının miktarını ve hareketliliğini dikkatle izlemek önemlidir (Sakamoto ve ark., 2004). Fungusitler, yaygın kullanımları nedeniyle mahsulleri ve doğal su kaynaklarını kirletmektedir. Triazol türevleri; çeşitli bitki hastalıklarını önleme, tedavi etme ve ortadan kaldırma konusundaki üstün yetenekleri nedeniyle günümüzde mevcut olan en önemli fungusit sınıfı olarak kabul edilmektedir (Wu ve ark., 2001). Triazol ailesinin bir üyesi hegzakonazol (HEK)'dür. Triazollerin; ergosterol sentezi için gerekli olan sitokrom P-450 aracılı oksidatif demetilasyon süreçlerini ve gibberellin biyosentez yolunda kaurenin kaurenolik aside dönüşümünü engellediği bilinmektedir. (RS)-2-(2,4-diklorofenil)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)heksan-2-ol olarak da bilinen hegzakonazol, iki enantiyomerden oluşan güçlü bir triazol fungusittir; bunlardan (-)-enantiyomer, (+)-enantiyomere kıyasla daha yüksek fungusidal aktiviteye sahiptir (Şekil 1) (Wang ve ark., 2005). İlk kez 1986'da piyasaya sürülen bu bileşik; meyveler, sebzeler, tahıllar ve tarla bitkileri

üzerinde yapraktan uygulanan bir fungusit olarak kullanım onayı almıştır (Paredes ve Munos, 2002; Navarro ve ark., 2000). (RS)-1-(p-klorofenil)-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol yapısındaki tebukonazol (TEB); yer fıstığı ve diğer mahsullerde yaprak ve toprak kaynaklı hastalıklarla mücadelede kullanılan, geniş uygulama alanına sahip bir triazol fungusittir. Tebukonazol, Şekil 1'de gösterildiği gibi bir kiral karbon atomuna ve bir çift enantiyomere sahiptir. Tebukonazol sıklıkla tarımsal toprağa uygulanan bir tohum kaplama maddesi olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla, biyoyararlanım açısından yararlı organizmalar olan toprak solucanları, doğrudan yüksek dozda tebukonazole maruz kalabilir (Dingyi ve ark., 2012).



Şekil 1: a) HEX ve b) TEB'in kimyasal yapıları

Bu fungusitlerin ve diğer pekçok pestisitlerin tayinine yönelik çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar arasında HPLC (Carmona ve ark., 2020; Ekiert ve ark., 2010; Huang ve ark., 2012) ve GC yöntemleri (Ekiert ve ark., 2010; Cserhádi ve Szögyi, 2012) yer almaktadır. Geleneksel analitik yöntemlere bir alternatif olarak, kapiler elektroforez (CE) büyük bir potansiyel sunmaktadır. Voeten ve ark. (2012)'na göre; bölge elektroforezi, izotakoforez, izoelektrik odaklama ve elektrokinetik kromatografi gibi CE ayırma modlarının uyarlanabilirliği sayesinde, farklı boyut ve özelliklere sahip çok sayıda bileşiğin tayini yapılabilmektedir.

Literatür, pestisit kalıntılarının ayrılması ve tayininde CE yöntemlerinin geçerliliğine dair genel bir bakış sunmaktadır (Pico ve ark., 2003; Bol'shakova ve Amelin, 2016). Bununla birlikte, CE yönteminin dezavantajları arasında sınırlı sayıda seçici dedektör bulunması ve nispeten yüksek bir saptama sınırı yer almaktadır (Pico ve ark., 2003). Ayrıca, çevrimdışı veya çevrimiçi numune ön zenginleştirme işlemleri, CE'nin düşük hassasiyetinden kaynaklanan bu dezavantajı daha da artırabilir.

Bu çalışmada, eser düzeydeki tebukonazol ve heksakonazol fungusitlerinin toplam miktarını belirlemek amacıyla, çevrimiçi ön zenginleştirme yöntemini içeren doğrulanmış bir kapiler elektroforez (CE) yöntemi kullanılmıştır.

MALZEME VE YÖNTEM

Kapiler kolonun sıcaklığı 25 °C'ye ayarlanmıştır ve kapiler; sırasıyla 1,0 mol L⁻¹ NaOH, 0,1 mol L⁻¹ NaOH, H₂O ve hareketli faz kullanılarak 15 dakika boyunca sürekli olarak koşullandırılmıştır. Kapiler; her iki enjeksiyon arasında iki dakika süreyle deiyonize suyla ve ardından beş dakika süreyle hareketli fazla yıkanmıştır. Kontaminasyonu önlemek amacıyla, her enjeksiyondan önce membran filtreler (0,45 µm gözenekli RC) kullanılmıştır. Enjeksiyon işleminden önce, tüm numuneler ve çözeltiler beş dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. HEK + TEB ve iç standart (IS) için 200 nm dalga boyundaki migrasyon süreleri sırasıyla 9,42 ve 2,21 dakika olarak belirlenmiştir.

Analitlerin pik normalizasyon değeri (PN_{analit} veya PN_{std}), IS'in pik normalizasyon değerine (PN_{IS}) bölünerek her bir deney için pik normalizasyon alan oranları (rPN) hesaplanmıştır.

$$rPN = PN_{Std} / PN_{IS}$$

Her bir alan, Standart ve IS alıkonma sürelerine bölünerek, Standart ve IS için en iyi pik normalleştirme alan oranı değerleri belirlenmiştir.

$$PN_{Std} = \text{Pik Alan}_{Std} / \text{Alıkonma Zamanı}_{Std}$$
$$PN_{IS} = \text{Pik Alan}_{IS} / \text{Alıkonma Zamanı}_{IS}$$

Bu hesaplama sonuçlarına göre, en yüksek rPN değerini ve en iyi pik morfolojisini veren elektroferogramlar dikkate alınarak optimum koşullar belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

İncelenen Fungusitler İçin Yöntem Optimizasyonu

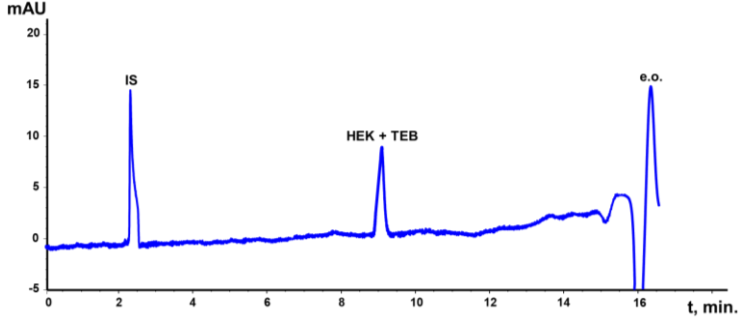
Öncelikle, çalışmada kullanılacak çalışma elektrolit türünü belirlemek amacıyla asidik çözeltilerle deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler; KCl-HCl tamponu, sodyum dihidrojen fosfat-fosforik asit tamponu, asetik asit-asetat tamponu ve formik asit-amonyum format elektroliti kullanılarak yürütülmüştür. En iyi sonuçlar, formik asit-amonyum format elektroliti ile çalışıldığında elde edilmiştir. Çalışma elektroliti türü belirlendikten sonra, bu elektrolitin pH değeri optimize edilmiştir. İncelenen fungusitlerin 8,0 x 10⁻⁵ M nihai derişimini ve 1,0 x 10⁻⁵ M iç standardı (IS) içeren çözelti, Tablo 1'de belirtilen optimum pH değerlerinde sisteme enjekte edilmiştir. Tablo, çalışmada en yüksek rPN değerlerine sahip olan bu fungusitlerin sonuçlarının birbirine oldukça yakın olduğunu göstermekle birlikte; pH 2,14 değerinin en iyi morfolojiyi sağladığı ve belirgin şekilde daha üstün olduğu görülmektedir.

Tablo 1: Çalışılan fungusitlerin $8,0 \times 10^{-5}$ M standart çözeltilerinin, çalışma elektrolitinin pH değerine bağlı rPN değerleri (200 nm'de)

Çalışma elektrolitinin pH değeri	Standartların rPN değerleri
1,80	0,245
2,05	0,252
2,14	0,273
2,26	0,232

İncelenen fungusitlerin karışımından oluşan ve $8,0 \times 10^{-5}$ M nihai konsantrasyon ile $1,0 \times 10^{-5}$ M iç standart (IS) içeren çözelti; pH 2,14'e ayarlanmış, farklı konsantrasyonlarda (0,5-15 mM) hazırlanan NH_4HCO_2 tampon çözeltileriyle enjekte edilmiştir. Ancak, tampon çözeltisi konsantrasyonunun 7,5 mM'yi aştığı durumlarda kolon sürekli olarak tıkanmıştır. Bu nedenle, optimum konsantrasyon olarak 7,5 mM amonyum format (NH_4HCO_2) seçilmiştir. Elektroferogramda daha iyi pik çözünürlüğü elde etmek amacıyla, tampon çözeltisinin viskozitesini artırmak için çözeltiye organik çözücüler eklenmiştir. Bu amaçla en sık kullanılan çözücüler asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH)'dür. Bu doğrultuda, sabit konsantrasyonlarda ($8,0 \times 10^{-5}$ M) hazırlanan standart fungusit karışım çözeltisi analiz edilmiştir. Fungusitler için en iyi rPN değerlerini sağlayan MeOH oranı %10 (h/h) olarak belirlenmiş ve uygun analiz süresi açısından bu konsantrasyon seçilmiştir. Potansiyel 10 kV'dan 30 kV'a kadar artırılmış ve uygun analiz süresi göz önünde bulundurularak çalışma potansiyeli olarak 25 kV belirlenmiştir. MeOH ile çözülerek hazırlanan stok çözeltilerin seyreltilmesiyle elde edilen standart çözeltiler, önce hidrodinamik modda, ardından elektrokinetik modda enjekte edilmiştir. Standartlar, düşük iletkenliğe sahip sulu bir çözelti içinde büyük hacimlerde kapilere enjekte edilip konsantre bir çalışma elektroliti hazırlandığında; yüksek elektrik alanı etkisiyle numune bölgesinde hızla hareket eden iyonlar tampon bölgesine ulaştıklarında (elektrik alanının azalması nedeniyle) aniden yavaşlamakta, sıkışmakta ve tampon sınırında yoğunlaşmaktadır. Böylece, standartların elektrokinetik enjeksiyonu için uygulanan voltaj ve süre ile hidrodinamik moddaki su basıncı ve süresi ayrı ayrı optimize edilmiştir. Fungusitlerin $8,0 \times 10^{-5}$ M'lık standart çözeltileri; pH 2,14, 7,5 mM NH_4HCO_2 konsantrasyonu, %10 (h/h) MeOH içeren tampon ortamı, 25 kV uygulama voltajı ve 10 kV elektrokinetik enjeksiyon voltajı koşullarında hazırlanmıştır. 25 saniyelik uygulama süresi boyunca 50 mbar hidrodinamik basınçla yapılan su enjeksiyonu sonucunda 200 nm'de elde edilen pikler için en iyi rPN değerleri gözlemlendi. Nihai derişimi $8,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hazırlanan fungusit standart çözeltileri için kolon sıcaklığı, yukarıda önerilen koşullar altında optimize edildi. En iyi rPN değerini ve pik morfolojisini sağlayan sıcaklığın 30 °C olduğu belirlenmiştir.

Optimum koşullar altında elde edilen elektroferogram Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2: Optimum koşullar altında (pH=2,1; 7,5 mM NH_4HCO_2 tamponu; %10 metanol; 50 mbar, 3 s su ve 10 kV; 25 s standart karışım enjeksiyon süresi; 200 nm dalga boyu; 30 °C kolon sıcaklığı ve 25 kV) $8,0 \times 10^{-5}$ M son derişimdeki HEK+TEB ve $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimdeki IS'ye ait elektroferogram.

Fungusitlerin Tayin Yönteminin Validasyonu

Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) kriterleri doğrultusunda, incelenen fungusitlerin doğrusallık, tespit sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), kesinlik ve doğruluk parametreleri değerlendirilerek geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi doğrulanmıştır.

Yöntemin doğrusallığı; altı noktalı bir kalibrasyon eğrisi ve her biri $1,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} nihai derişime sahip iç standart (IS) ve standart fungusit çözeltisi kullanılarak incelenmiştir.

Fungusitler için, 200 nm dalga boyunda $3,00 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} ile $4,00 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} derişim aralığındaki çözeltiler kullanılmış ve üç ayrı günde altı tekrarlı enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, analitin pik normalizasyon değerinin IS pik normalizasyon değerine bölünmesiyle pik normalizasyon oranları (rPN) hesaplanmıştır [$\text{rPN} = \text{PN}_{\text{Std}}/\text{PN}_{\text{IS}}$]. Aşağıdaki denklem kullanılarak, kalibrasyon eğrisinden yöntemin (LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir:

$$\text{LOD} = 3.3 \times s/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times s/m$$

Bu hesaplamalarda, analit çözeltisinin standart sapma değeri için en düşük konsantrasyonu temsil eden “s” ve kalibrasyon denkleminin eğim değeri olan “m” kullanılmıştır.

Fungusitlere ilişkin tayin aralığı sonuçları ile LOD ve LOQ değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Fungusitlerin için kalibrasyon verileri

	I. Gün, n=6	II. Gün, n=6	III. Gün, n=6	Günler arası, n=18
m ^a	0,0618	0,0618	0,0618	0,0618
n ^b	-0,0378	-0,0367	-0,0379	-0,0379
R ^{2c}	0,9990	0,9991	0,9990	0,9990
s _m ^d	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011
LOD ^e µg mL ⁻¹	0,0406	0,0354	0,0521	0,0303
LOQ ^f µg mL ⁻¹	0,1354	0,1180	0,1735	0,1010

^a m eğim^b n kesim noktası^c R korelasyon sabiti^d s_m kalibrasyon eğrisinin standart sapmasıdır. ($s_m = \sqrt{\frac{s_y^2}{s_{xx}}}$), s_r regresyon sabitinin standart sapmasıdır.^e LOD tayin limiti^f LOQ en küçük tayin edilebilirlik sınırı

Yöntemin kesinliği, hem gün içi hem de günler arası gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik deneyleri ile değerlendirilmiştir.

Üç set standart çözelti hazırlamak amacıyla 1,00 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ M IS eklendi. Enjeksiyonlar, birbirini takip eden 3 gün boyunca 6 kez (n = 6) gerçekleştirilmiştir. Kesinlik sonuçları Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3: 9,00 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ fungusitlerin (2,83 µg mL⁻¹ HEK, 2,77 µg mL⁻¹ TEB) günler arası ve gün içi sonuçları

	I. Gün, n=6	II. Gün, n=6	III. Gün, n=6	Günler arası, n=18
$\bar{X}$ ^b	0,321	0,322	0,323	0,322
s ^c	0,006	0,005	0,006	0,005
RSD% ^d	1,749	1,509	1,757	1,624
CL ^e	0,006	0,006	0,007	0,005

^a n is the number of experiments.^b is the mean ratio of peak normalization.^c s is the SD of the mean response.^d RSD% is relative standard deviation, %^e CL confidence limit, (ts/√n)

SONUÇ

Bu çalışmada önerilen ve HEK ile TEB'in eş zamanlı tayinini amaçlayan CE yöntemi; düşük maliyet, doğruluk, seçicilik, güvenilirlik ve çevre dostu olma gibi önemli avantajlara sahiptir. Bilgimiz dahilinde bu doğrulanmış yaklaşım, kapiler elektroforez ve çevrimiçi ön zenginleştirme yöntemleri kullanılarak HEK ve TEB ölçümünün yapıldığı ilk örnektir. Geliştirilen yöntemin doğrulanmasında ICH kılavuzu esas alınmıştır ve tüm ICH parametreleri olumlu sonuçlar vermiştir.

REFERANSLAR

Bol'shakova, D., ve Amelin, V. (2016). Determination of pesticides in environmental materials and food products by capillary electrophoresis *Journal of Analytical Chemistry*, 71(10), 965-1013.

Carmona, K.M., Maciel, E.V.S., ve Lanças, F.M. (2020). Miniaturized liquid chromatography applied to the analysis of residues and contaminants in food: A review. *Electrophoresis*, 41(20), 1680-1693.

Cserháti, T., ve Szögyi, M. (2012). Chromatographic determination of fungicides in biological and environmental matrices New achievements. *Biomedical Chromatography*, 26(3), 276-282.

Ekiert, R., Krzek, J., ve Talik, P. (2010). Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents—a review. *Talanta*, 82 (4), 1090-1100.

Huang, Q., Zhang, K., Wang, Z., Wang, C., Peng, X. (2012). Enantiomeric determination of azole antifungals in wastewater and sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403 (6), pp. 1751-1760.

Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., Vela, N., ve Oliva J. (2000). Multiresidue method for the rapid determination in grape, must and wine of fungicides frequently used on vineyards. *Journal of Chromatography A*, 882, 221–229.

Paredes, B.S.G., ve Munos, F.R. (2002). Effect of different fungicides in the control of colletotrichum acutatum, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection*, 21, 11–1.

Pico, Y., Rodriguez, R., ve Manes, J. (2003). Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *TRAC-Trends Analytical Chemistry*, 22 (3), 133-151.

Sakamoto, M., ve Tsutsumi, T. (2004). Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *Journal of Chromatography A*, 1028, 63-74.

Voeten, R.L.C., Ventouri, I.K., Haselberg, R., ve Somsen, G.W. (2018). Capillary electrophoresis: trends and recent advances. *Analytical Chemistry*, 90 (3), 1464-1481.

Wang, Q.X., Qiu, J., Wang, P., Jia, G.F., Wang, P., Li, J.L., ve Zhou Z.Q. (2005). Stereoselective kinetic study of hexaconazole enantiomers in the rabbit. *Chirality*, 17, 186–192.

Wu, Y.S., Lee, H.K., ve Li, S.F.Y. (2001). High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 912, 171-179.

Yu, D., Li, J., Zhang, Y., Wang, H., Guo, B., ve Zheng, L. (2012). Enantioselective bioaccumulation of tebuconazole in earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Environmental Sciences*, 24(12), 2198–2204.

