

İşlenmiş Derilerde Pentaklorofenol Analizine Özgü Gaz Kromatografisi Esasına Dayanan Bir Yöntem Uyarlaması Üzerinde Çalışmalar

Seyfullah O. ARSLAN¹

ÖZET

Pentaklorofenol (PCP) dünya çapında geniş kullanım alanı olan genel bir biyosit ajandır. Deri sanayinde antifungal ve antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. Vücuda ağız, solunum ve deri yoluyla kolay bir şekilde alınan PCP, akut ve kronik zehirlenmelere yol açabilmektedir.

Bu çalışmada; gaz kromatografisi ile, işlenmiş derilerde PCP kalıntılarının saptanabileceği oldukça pratik, duyarlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, örneklerin asitle hidroliz, n-hekzan ekstraksiyonu ve ECD/GC'de okunması esasına dayanmaktadır. Deri ürünlerinde PCP geri kazanım oranı ortalama % 81.3, saptama limiti ise 25 ppb olarak elde edilmiştir. Geri kazanma değerlerinin değişim katsayısı % 3.2-7.9 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pentaklorofenol, Analiz, Giysilik deri.

SUMMARY

Studies About the Adaptation of a Method for the Determination of Pentachlorophenol in Leather by Gas Chromatography

Pentachlorophenol (PCP) is a general biocide used throughout the world. It is used as a fungicide and a bactericide in the leather industry. Acute and chronic poisoning may occur by dermal absorption, inhalation or ingestion.

In this paper, a practical, sensitive, reliable, and economic method for the determination of PCP in leather by gas chromatography is adapted. The procedure is based on extraction of PCP into n-hexan and acid hydrolisis. PCP is quantitated directly by ECD/GC. Recovery of PCP in leather is 81.3 %, detection limit is 25 ppb, and the coefficients of variation are in the range 3.2 and 7.9 %.

Key Words: Pentachlorophenol, Analysis, Leather.

GİRİŞ

Pentaklorofenol (PCP), insektisit, fungusit, bakterisit vb. etkileri nedeniyle sanayide geniş kullanım alanı bulmaktadır. Dünyada çoğunlukla ağaç ve ağaç ürünleri sanayinde kullanılan PCP, Türkiye'de fungusit ve bakterisit etkinliğinden yararlanmak amacıyla deri sanayinde kullanılmaktadır (1).

PCP' nin geniş kullanım alanının olması, toprak (2) atık sular (3,4) ve hava (5,6) ile çok çeşitli sanayi ürünlerinde (7,8) ve gıdalarda (9,10,11) kalıntılarının bulunmasına yol açmaktadır.

PCP, vücuda ağız, solunum, deri ve diğer tüm yollardan kolaylıkla alınabilmektedir (6). Çoğu organik klorlu bileşikler gibi PCP de canlı organizmada toksik etkilere sahiptir. Bunlar arasında deri, solunum ve gastrointestinal sistemin tahriş edilmesiyle ortaya çıkan sorunlar, karaciğer ve bubreğ fonksiyonlarında bozulma, kan biyokimyasında değişimler, bağışıklık sisteminin baskılanması, sinirsel belirtiler sayılabilir (12). Bu belirtilerin ortaya çıkışında, ticari PCP'deki kirliliklerin (hexa-, hepta-, octa-, dibenzo-p-dioxin ve furanlar) arttırıcı yönde etkileri vardır (6).

¹ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, VAN.

İnsanlarda kabul edilebilir maksimum PCP düzeyleri serumda 150 ppb, idrarda 60 ppb olarak bildirilmektedir (13). Sağlık riski oluşturabilecek miktarlar mesleki uğraş nedeniyle alınabildiği gibi (5,6,13,14), normal insanların idrar (15,16), kan (17), yağ doku (18,19) ve hematopoetik dokularında (20,21) da rastlandığı çeşitli araştırmalarda açıklanmaktadır.

Vücuda deri yoluyla çok kolay bir şekilde alınabilen PCP (1); deride, enfeksiyonlarla sonuçlanabilecek küçük kızarıklardan akneye varan çeşitli semptomlara ve nihayet kronik olaylarda ürtikerlere neden olmaktadır (22).

Araştırmacıların, çevresel bir kirlenici olan PCP'nin kullanımının yasaklanması ya da sınırlandırılması yönünde öneriler sunmaları karşısında; bir çok sanayileşmiş ülkede çeşitli önlemler alınmıştır. ABD'de gıdalardaki kalıntının sıfır olması istenirken (23), Kanada'da maksimum 0.1 ppm olabileceği belirtilmektedir (24). En son olarak Almanya hükümeti PCP kullanımını tamamen yasaklamakla birlikte, belirli düzeylere (Örneğin deri ürünlerinde 5 ppm'e kadar) izin vermektedir (25). Bu kararlar, Türkiye'de üretilen deri ürünlerinin ihracatlarında çeşitli zorlukları beraberinde getirmiştir. Bütün bu nedenler, PCP'nin deri ve deri ürünlerinde, ekonomik, pratik, duyarlı ve güvenilir bir analiz yönteminin geliştirilip yerleştirilmesini zorunlu kılmıştır.

MATERYAL

Alet ve Malzemeler:

1. Gaz Kromatografi (GC): Packard 427, Ni⁶³ elektron-tutucu dedektör (ECD).
2. Yazıcı, Du Pont 204316
3. Gaz kromatografi kolonu: %1 SP 1240 DA, 0.2 mm X 2 m (Supelco, SA)
4. Mikro enjektör (Hamilton)
5. Santrifüj (Heraeus 0902)
6. Tüp çalkalayıcı (Elektromag m 16)
7. Su banyosu (Köttermann)
8. Hassas terazi (Sauther 2723, Mettler 1210)
9. Değirmen
10. Cam malzemeler

Kimyasal Maddeler:

1. Na-Pentaklorofenol Merck 972052
2. 2-Propanol Merck 995
3. n-Hekzan Merck 4368
4. Sülfürik asit Merck 713
5. Aldrin BDH 15177 2D

6. Sülfürik asit çözeltisi (12 M H₂SO₄: 66 ml konsantre H₂SO₄ 330 ml distile suya yavaş yavaş ilave edilerek hazırlandı).

PCP Standart Çözeltileri:

1. 1 mg/ml Na-PCP/2-Propanol
2. 20 ppm (1'den 0.5 ml alınıp n-hekzan ile 25 ml'ye tamamlandı).
3. 2'den n-hekzan ile 5-1000 ppb aralığında değişik konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlandı.

Çalışmada kullanılan örnekler işlenmiş giysilik derilerden alınmıştır.

METOT

Bu çalışmada; Gillard ve arkadaşları (26) ile Hughes ve arkadaşlarının (27) hayvansal dokularda ve Yip'in (28) jelatine gerçekleştirdikleri yöntemlerden bazı uyarlamalar yapılarak işlenmiş derilerde PCP analizlerinin yapılabileceği bir yöntem geliştirilmektedir.

Ekstraksiyon:

İşlenmiş deri örneğinden 100 gram alınarak, küçük parçalara ayırdıktan sonra değirmende öğütüldü. Bundan 1 gram miktarında tartılan örnekler alınıp ağız kapaklı tüplere konuldu. Üzerlerine 12 M H₂SO₄ çözeltisinden 2.5 ml ilave edildi. Tüpler 100 ° C ısıda su banyosuna konarak bir saat boyunca 10'ar dakika aralıklarla çalkalamak suretiyle hidroliz işlemi gerçekleştirildi. Su banyosundan alınan tüpler oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğuyan tüplere 5'er ml n-hekzan ilave edildi. Her biri 15 dakika tüp çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra santrifüj tüplerine aktarma yapılarak organik çözücü tabakanın ayrılması için santrifüj edildi. Üstteki n-hekzan tabakasının 2 ml'si bir başka ağız kapaklı tüpe aktarıldı. Üzerine 0.5 ml yoğun H₂SO₄ ilave edildi. Her bir tüp 2 dakika çalkalandı. Bir saat beklendi. Üst fazdan 1 ml alınarak 1 µl'si analiz için koşulandırılmış GC'ne verildi.

Gaz Kromatografinin Çalışma Koşulları:

Enjeksiyon ısısı	: 180 °C
Kolon ısısı	: 155 °C
Dedektör ısısı	: 280 °C
Taşıyıcı gaz	: Azot
Akış hızı	: 40 ml/dk
ECD	: 5
Attenuation	: 64
Kağıt hızı	: 0.25 cm/1k.

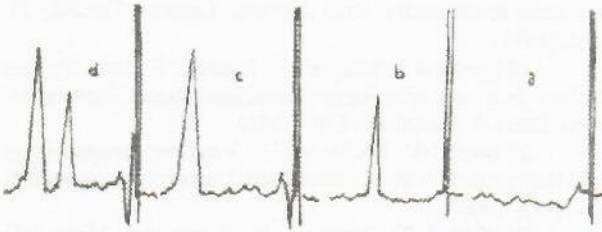
Sonuçların Değerlendirilmesi:

5-200 ppb aralığında değişik derişimlerdeki PCP standartlarının gaz kromatografisinde pikleri alınarak alanları hesaplandı. Geri kazanma denemeleri 5 ayrı dozda yapılarak elde edilen piklerin alanları hesaplandı. Ekstraksiyonda 5 katı dilüsyon yapıldığından geri kazanmadaki pik alanlarının 5 katı alındı. Sonuçlar, standart pik alanları ile orantılanarak değerlendirildi.

BULGULAR

Değişik derişimlerdeki pentaklorofenol standartları, analiz için koşullandırılmış elektron tutucu dedektörlü gaz kromatografisine 1 µl enjekte edilerek standartların okunma aralığı 5-200 ppb olarak saptandı. Yöntemin analiz aralığı ise 25-1000 ppb olarak bulundu. Bu analiz aralığı ekstraksiyonda dilüsyon arttırılmasıyla daha az duyarlılık aralığına çekilebilmektedir.

Pentaklorofenol analizinde elde edilen kromatogramlar Şekil-1'de gösterilmiştir. Şekil 1a organik çözücü, b-internal standart Aldrin, c-PCP, d-PCP + Aldrin kromatogram örnekleridir. Alıkonma zamanı Aldrin için 12 dk, PCP için 18 dk'dır.



Şekil 1. Pentaklorofenol Analizinde Elde Edilen Kromatogram Örnekleri (a-Organik çözücü, b-Aldrin, c-PCP, d-Aldrin + PCP).

Gerri kazanma çalışmalarında, öğütülmüş 1 gram deri örneklerine, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppb düzeylerinde PCP ilave edilerek her biri için 10'ar adet olmak üzere toplam 50 adet analiz yapılmıştır. Elde edilen bulgular; ortalama değer (\bar{x}), standart sapma (S), ortalama değer in standart hatası ($S\bar{x}$), değişim katsayısı (DK) ve geri kazanma yüzdesi (R%) olarak Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Deri Örneklerinde PCP Gerri Kazanımı (ng/g).

	50	100	200	500	1000
\bar{x}	41.1	81.6	161.4	405.6	806.6
S	2.25	5.7	12.8	25.6	26
$S\bar{x}$	0.7	1.83	4.06	8.12	8.25
DK %	5.5	7.1	7.9	6.3	3.2
R %	82.2	81.6	80.7	81.3	80.6

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan literatür araştırmasında deri ürünlerinde PCP kalıntı analizi için yeterince yöntem geliştirilmediği gözlenmiştir. Bununla beraber Secchieri ve arkadaşları (8) özel bir UV spektroskopik aleti (second derivative) ile deri örneklerinde 1-40 ppm aralığında ve % 99 geri kazanımlı bir yöntem geliştirmişlerdir.

İnsan ve hayvan doku ve sıvıları ile bir çok sanayi ürünleri ve artıklarında PCP analizleri için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Kolorimetrik (7) ve İnce Tabaka Kromatografisi (29) çok fazla hassas görülmemiştir. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile 0.1 ppm duyarlılık limiti elde edilebilmiştir (30). Diğer pestisitler için olduğu gibi, PCP için de en uygun aranma yöntemleri gaz kromatografisinde geliştirilebilmektedir. Çok duvarlı analizler için kapillar kolonlar ideal olmakla beraber, analiz süresi uzundur. PCP analizlerinde genellikle diazometan türevlendirilmesi yapılmaktadır (1).

Bu çalışmada kanserojen etkiden korunmak ve aynı zamanda rutin analizlerde pratik geçerliliği olmadığı için türevlendirme işlemi tercih edilmemiştir. Yapılan çalışmada, % 100 1240 DA dolgu maddesi içeren, 0.2 mm x 2 m boyutlarında, sadece çıkış ucuna çok az miktarda fosforik asit içeren cam pamuğu konulmuş düz cam kolon kullanılmıştır.

Yöntemin temeli, örneklerin asitle hidroliz, n-hekzan ekstraksiyonu ve son olarak yoğun asit muamelesine dayanmaktadır. Gillard ve arkadaşlarının (26) çalışmasından geliştirilen yöntemde, örneklerin ve ekstraksiyonda kullanılan organik çözücülerin miktarları yarıya indirilmiştir. Organik çözücü olarak siklohekzan yerine n-hekzan tercih edilmiştir. Gaz kromatografisinin çalışma şartlarında bazı değişiklikler yapılmıştır.

ECD/GC'de aynı kolon ile türevlendirmesiz olarak Gillard ve arkadaşlarının (26) farklı hayvan türlerinin karaciğer dokularında PCP kalıntı tayini çalışmalarında; duyarlılık limiti 50 ppb, geri kazanma oranı 75.7-91.4, tekrarlanabilirlik ve geçerlilik amacıyla yapılan geri kazanmaların değişim katsayıları istatistiksel hesaplamalarında % 2.8-8.5 arasında değişen değerler elde edildiği bildirilmektedir. Hughes ve arkadaşları (27) ise 100 ppb duyarlılık elde ettiklerini bildirmektedir.

Bu çalışmada, PCP'nin tutunma zamanı 18 dakika olarak belirlenmiştir. Yöntemin duyarlılık limitininin 25 ppb'ye indirilmesi başarılmıştır. Analiz aralığı 25-1000 ppb'dir. Bu aralık, GC'ne enjeksiyon için hazırlanan son ekstraktın dilüe edilmesiyle yukarı

alınabilir. Yöntemin geçerliliği ve tekrarlanabilirliğinin ortaya konulması amacıyla 5 ayrı düzeyde 10'ar adet geri kazanma çalışması yapılmıştır. Elde edilen bulgular ve istatistik değerlendirmeleri Tablo 1'de sunulmuştur. Geri kazanma oranı ortalama % 81.3 bulunmuştur. Değişim katsayısı % 10'dan daha düşük olan 3.2-7.9 arasında değişen değerlerde hesaplanmıştır. Bu istatistiksel değerlerin, yöntemin oldukça güvenilirlik içinde olduğunu gösterdiği belirtilmektedir (31).

Bu araştırmada kullanılan ekstraksiyon işlemi oldukça basit olup, fazla zamana gereksinim duyulmamaktadır. Ayrıca ekstraksiyonda düşük miktarlarda organik çözücü kullanıldığı için ekonomik olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, deri ve deri ürünlerinde PCP analizlerinin yapılabileceği oldukça duyarlı, pratik, ekonomik ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Arslan O: eneyssel olarak, deri yoluyla Pentaklorofenol (PCP) uygulanan ratların, doku ve idrarlarında, kalıntı düzeylerinin gaz kromatografi yöntemiyle araştırılması. Doktora Tezi, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (1995).
2. Wall AJ, Stratton GW: Effects of moisture content on the extractability of pentachlorophenol from soil. *Chemosphere*, 23 (7):881, (1991).
3. Ingram LL, McGinnis GD, Parikh SV: Determination of pentachlorophenol in water by mass spectrometric isotope dilution. *Analytical Chemistry*, 51(7):1077, (1979).
4. Weeman RC, Hofstel AWM: Chlorophenols in surface waters on the Netherlands (1976-1977). *Water Research*, 13:551 (1979).
5. Wild SR, Jones KC: Pentachlorophenol in the UK environment. II: Human exposure and an assesment of pathways. *Chemosphere*, 24(7): 847, (1992).
6. Williams PL: Pentachlorophenol, an assesment of the occupational hazard. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 43: 799, (1982).
7. Beynon KI, Crosby DG, Korte F, Still GG, Vonk JW, Greve PA: Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Applied Chemistry* 53:1051, (1981).
8. Secchieri M, Benassi CA, Pastore S, Semenzato A, Bettore A, Levorato M, Guerrato A: Rapid pentachlorophenol evaluation in solid matrixes by second derivative UV spectroscopy for application to wood and leather samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74(4):674, (1991).
9. Borsetti AP: Determination of pentachlorophenol in milk and blood of dairy cattle. *J. Agric. Food Chem.*, 28:710, (1980).
10. Frank R, Braun HE, Sirons GH, Ward GG: Organochlorine and organophosphorus insecticides and industrial pollutants in the milk supplies of Ontario-1983. *J. Food Protection*, 48 (6): 499, (1985).
11. Muino MAF, Lozano JS: Mass spectrometric determination of pentachlorophenol in honey. *Analytica Chimica Acta*, 247: 121, (1991).
12. Arslan O, Akman N: Pentaklorofenol zehirlenmesinin genel tip pratiğindeki önemi. *Y.Y. Ü. Tıp Fak. Derg.*, 4: 88, (1994).
13. Triebig G, Csuzda I, Krekeler HJ, Schaller KH: Pentachlorophenol and the peripheral nervous system: a longitudinal study in exposed workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 44: 638, (1987).
14. Gallagher RP, Threlfall WJ: Cancer and occupational exposure to chlorophenols. *Lancet*, 86: 81, (1984).
15. Atuma SS, Okor DI: Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in human blood and urine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 35: 406, (1985).
16. Gomez-Catalan J, To-Figueras J, Planas J, Rodamilans M, Corbella J: Pentachlorophenol and hexachlorobenzene in serum and urine of the population of Barcelona. *Human Toxicology*, 6: 397, (1987).
17. Cline JR, Hill RH, Phillips DL, Needham LL: Pentachlorophenol measurements in body fluids of people in log homes and workplaces. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 475, (1989).
18. Ohe T: Pentachlorophenol residues in human adipose tissue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 287, (1979).
19. Shafik TM: The determination of pentachlorophenol and hexachlorophene in human adipose tissue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 10: 57, (1973).
20. Mussalo-Rauhamaa H, Pyysalo H, Antervo K: The presence of chlorophenols and their conjugates in Finnish human adipose and liver tissues. *The Science of the Total Environment*, 83: 161, (1989).
21. Wagner SL, Durand LR, Inman RD, Kiigemagi U, Deinzer ML: Residues of pentachlorophenol and other chlorinated contaminants in human tissues: Analysis by electron capture gas chromatography and electron capture negative ion mass spectrometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21: 596, (1991).
22. Lamberd J, Schepens P, Janssens J, Dockx P: Skin lesions as a sign of subacute pentachlorophenol intoxication. *Acta. Derm. Venereol.* 66: 170, (1986).
23. Booth NH, McDonald LE: Veterinary pharmacology and therapeutics. 6 th ed., Iowa State University Press/AMES, pp:1195, (1988).
24. McNeil JD, Patterson JR, Fesser AC, Martz VK: Determination of pentachlorophenol in animal tissues: A canadian perspective. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73 (6): 838, (1990).
25. Afşar A: Pentaklorofenol yasağı üzerine. *Türkiye Deri Sanayicileri Derneği Dergisi, Deri*, 73: 18, (1990).
26. Gillard D, Epstein RL, Ashworth RB, Curry K, Nathan Q: Validation study of gas chromatographic determination of pentachlorophenol in animal liver. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (5): 926, (1988).
27. Hughes BJ, Forsell JH, Sleight SD, Kuo C, Shull LR: Assesment of pentachlorophenol toxicity in newborn calves: Clinicopatology and tissue residues. *J. Animal Science*, 62 (6): 1587, (1985).
28. Yip G: Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in gelatin: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68 (3): 419, (1985).
29. Davies JR, Thuraisingham ST: The detection and estimation of pentachlorophenol in natural latex by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.*, 35: 43, (1968).
30. Mundy DE, Machin AF: Determination of pentachlorophenol and related compounds in animal materials by high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatog.*, 216: 229, (1981).
31. Hayran M, Özdemir O: Bilgisayar istatistik ve tıp. *Hekimler Yayın Birliği, Ankara*, (1995).