

TOZ ZİRAİ MÜCADELE İLÂÇLARINDA BİYOLOJİK YOL İLE AKTİF MADDE TAYİNİ

Talip ÖDEN¹ Adnan TEMİZER² Gürol ALTINAYAR³ Emine ŞAHİN⁴

GİRİŞ

Bir mevsim içinde kullanılmayan toz ziraî mücadele ilâçları, memleketimizin değişik iklim şartları altında kısa veya uzun bir müddet için çok farklı şekillerde depo edilmektedir. Satın alındıkları mevsim veya normal depolama müddetleri içinde kullanılmayan ilâçların, biyolojik aktivitelerinde bir azalmanın olabilmesi her zaman mümkündür. Biyolojik aktivitedeki değişiklik, fiziki vasıfların değişmesi, aktif maddenin azalması veya her ikisinin birden meydana gelmesi sureti ile olur. Bu gibi ilâçların, kullanmadan evvel aktif madde miktarını bilmek, tatbikatta başarılı bir mücadele için, doz tesbitinde önemli bir rol oynamaktadır.

Memleketimizde, ziraî mücadele ilâçlarının kimyevi tahlillerini yapabilen Tarım Bakanlığına bağlı yalnız bir müessesenin olması, uzun müddet depo edilmiş ilâçların, kullanmadan hemen evvel tahlilini her zaman mümkün kılmamaktadır. Bu çalışmada izah edilen metod ile, muhtelif bölgelerdeki müesseselerin, bozukluğundan şüphe ettikleri ilâçlarda aktif madde miktarını tesbit mümkün olabilecektir.

Bir ziraî mücadele ilâcının, ihtiva ettiği aktif madde miktarını fiziki, kimyevi veya biyolojik metodlar ile tayinde genel prensip aynıdır ve tahlil edilmesi istenen ilâcın muayyen reaksiyonu, belli miktarda ki ilâcın aynı reaksiyonu ile mukayese edilerek tesbit edilir. Biyolojik metodlar ile aktif madde tayininde, canlı bir organizmanın ilâç ve standardın tatbikine karşı gösterdiği reaksiyonlar (ölüm, paraliz gibi) mukayese edilmektedir. Bu metodlar ile yapılan tayinlerde, yalnız biyolojik olarak aktif olan madde tesbit edildiğinden, bazan kimyevi analizler ile arasında bir ilgi görülmeyebilir. Meselâ, DDT tayininde biyolojik metod, ancak p,p"-DDT ve BHC tayinin de ise gamma isomer miktarını işaret eder. Fakat, preparatta ki diğer isomerlerin, biyolojik olarak aktif olan bu isomerler üzerine her hangi bir tesiri olduğu müddetçe de, neticeler yanlış fikir verebilir. Aynı durum, spesifik olmayan metodlar ile yapılan kimyevi analizler için de mevzu bahisdir.

Canlı organizma olarak, çeşitli materyaller kullanılabilir. Kolay ve bol elde edilmeleri, ilâç tatbikine karşı gösterecekleri reaksiyonun tesbit edile-

¹ Ziraî Mücadele İlaç ve Aletleri Enstitüsü İnkisid Deneme Laboratuvarı Şefi

^{2, 3, 4} Ziraî Mücadele İlaç ve Aletleri Enstitüsü İnkisid Deneme Laboratuvarı Asistanı

bilir olması ve bu reaksiyonun popülasyon içinde normal dağılmış olması, dikkat edilecek en önemli hususlardır.

Bir çok araştırmacılar aktif madde tayininde, biyolojik metodları uygulamışlardır. Şentürk (1959) *Tribolium confusum* Duv, erginini kullanarak parathion'lu bir preparatta aktif maddeyi tesbit etmiştir. Bu denemede, preparat ve standart olarak kabul edilen ilâç, doğrudan doğruya asetonda eritildiği için, preparat ve standardın farklı eritici ve emülse edici madde ihtiva etmesi ve bunların deneme neticelerine tesir etmesi her zaman mümkündür. Meltzer (1952) *Tribolium confusum*'u gamma BHC tayininde kullanmış, fakat başka ilâçlara tatbik etmemiştir. Bovingdon (1950) gamma BHC tayininde, saf ve teknik maddeyi eterde eritip kil ile formüle etmiş ve bu formülasyonları buğday ile karıştırıp *Calandra granaria* L. ile denemeler yapmıştır ki bu metodun preparatlara tatbiki zordur.

Çalışmamızda genel olarak, Meltzer (1952) in takip ettiği metod uygulanmış ve bunun BHC ve DDT li toz preparatlara tatbik imkânı araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Tribolium confusum Duv. un yetiştirilmesi : Kepek ve un 1 : 10 oranında iyice karıştırılıp, büyük kavanozlar içinde otoklavda sterilize edildikten sonra, yarım litrelik kavanozlara takriben 200 gr konmuş ve her kavanoza 75 adet *Tribolium* ergini ilâve edilerek ağızları tülbent ile kapatılıp, 25°C ve takriben % 60-70 nisbi rutubette muhafaza edilmişlerdir. Bir buçuk ay sonra, kültürlerde ki 75 er adet ergin ile yeni çıkmış olanlar uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma, kavanoz muhtevasını kepek ve böceğin geçemeyeceği bir sıklıkta ki tel elek ile elemek, un kısmını ayrı bir kaba ve geri kalan kısmı geniş bir tepsiye dökmek ve masa lâmbası altında yumuşak bir fırça ile erginleri toplamak suretile yapılmıştır. Larf ve pup ihtiva eden kepek kısmı, kendi unu ile karıştırılıp kavanozuna dökülmüş ve aynı şartlar altında bir hafta muhafaza edilmiştir. Bir hafta sonunda, yeni çıkan erginler aynı şekilde ayıklanıp, toplanmış ve yarısına kadar un kepek karışımı ihtiva eden bir litrelik kavanozlara konarak aynı şartlarda saklanmıştır. Aynı işleme diğer haftalarda da devam edilmiştir. Böcekler birer hafta ara ile toplanıldığından, toplanıldıkları anda 0-7 günlük yaşadırlar. Ertesi hafta bunlar 7-14 günlük yaşta ve yeni toplananlar da gene 0-7 günlük yaşta olacaklardır. Denemelerimizde 14-21 günlük yaşta olan erginler kullanılmıştır. Her on beş günde 6 kültür hazırlanmış, bu suretle her hafta 14-21 günlük yaşta 3000 civarında *Tribolium confusum* ergini elde edilmiştir.

Standart ve nümune ilâçların hazırlanışı : Nümunede ki aktif madde miktarı, standart ve nümune ilâcın doz-ölüm kürvelerininin mukayesesi sureti ile yapıldığından, bu kürveleri elde etmek için asgarî üç farklı dozun seçilmesi lâzımdır. Asgarî ve azamî dozlar takriben % 10-90 ölüm verecek şekilde olmalı ve diğer dozlar bunlar arasında uygun olarak dağıtılmalıdır. Saf gamma BHC için asgarî ve azamî dozlar, 20 ve 50 mg/lt tesbit edildi.

ğinden, ara dozlar olarak 25-30- ve 40 mg/lt seçilmiştir. Bu dozları hazırlamak için, evvelâ saf gamma BHC den 25 mg 50 cc aseton içinde eritilmiş (500 mg/lt) ve temiz aseton ile istenilen dozlara sulandırılmıştır. Nümuneler de ise, aktif madde miktarı bilinmemekte, fakat her hangi bir miktar tahmin edilmektedir. Meselâ, bozukluğundan şüphe edilen % 1 gamma BHC toz preparatında tahmin edilen miktar % 1 gamma BHC dir. Nümuneyi hazırlamak için, iyice karıştırılmış 1 gr nümune ağzı kapaklı cam balon veya erlen içinde 50 cc aseton ile (20,000 mg/lt) zaman zaman çalkalamak suretile 24 saatte ekstrakt edilmiştir. Her hangi bir şekilde ki süzme esnasında, asetonun uçarak konsentrasyonu değiştirme ihtimali olduğundan, ana mahlülden yapılacak diğer konsentrasyonlar dibe çöken dolgu maddesi, mahlülü bulandırmayacak şekilde üst kısımdan belirli hacim mahlül almak ve bunu temiz aseton ile sulandırmak sureti ile yapılmıştır. Ana mahlülün litresi 20,000 mg nümune veya tahmini olarak 200 mg gamma-BHC ihtiva ettiğinden, litrede 20-25-30-40 ve 50 mg gamma-BHC ihtiva edecek konsentrasyonlar, litrede 2000-2500-3000-4000 ve 5000 mg nümune ilâç ihtiva edecek şekilde hazırlanmıştır. DDT li nümunelerin ve standardının hazırlanışı da aynı esaslar dahilinde yapılmış, fakat değişik konsentrasyonlar kullanılmıştır.

Denemenin yapılışı : Standart ve nümunelerin düşük konsentrasyonundan başlamak ve sırayı takip etmek suretile, 9 cm çapındaki petriyer içine 1 cc mahlül konmuş ve düz bir satıh üzerinde petriyi sallamakla asetonun uçması temin edilmiştir. Her konsentrasyon iki tekerrürlü yapılmış, kontroller yalnız temiz aseton ile ilâçlanmıştır. İlâçlamadan takriben 10 dakika sonra, her petriye 25 adet 14-21 günlük yaşta *Tribolium* ergini konarak 25°C ve % 60-70 nisbi rutubette, açık petriyerde, muayyen müddet ilâçlı satıh ile temas etmeleri sağlanmıştır. Temas müddeti gamma BHC de 6 saat ve DDT de 3 gündür. Bu müddetlerin sonunda böcekler, temiz beyaz bir kâğıt üzerinde ki cam halkalar içine nakledilmiş ve gıda olarak verilmiştir. Aynı şartlar altında gamma BHC de 3 ve DDT de 4 gün muhafaza edildikten sonra, undan ayrılarak kontrolleri yapılmıştır. Hafif ısıtıldığı zaman, yürümeye muktedir olamayan böcekler ölü olarak kabul edilmiştir.

Kıymetlendirme : Nümunelerde ki aktif madde miktarı, her nümune nin LD₅₀ ni standardın ki ile mukayese etmek suretile bulunmuştur. Probit analiz metodunu (Finney, 1952) kullanarak regresyon hattının (toksikite formülünü), LD₅₀ nin hesabı ile nümune de ki aktif madde miktarının tayinine ve emniyet sınırlarının tesbitine ait bir misal cetvel 1 ve 2 de gösterilmiştir. Bu nümune de beklenen gamma BHC miktarı % 1 olup, kromatografik metod ile % 1,03, biyolojik metod ile % 1,08 bulunmuştur. Emniyet sınırları olarak p = 0.05 için % 0,98 ve % 1,2 tesbit edildiğinden, gerek beklenen ve gerekse kimyevi metod ile bulunan miktar bu emniyet sınırları içindedir.

Neticelerin probit analiz metodu ile, işlenmesinde takip edilecek yol, aşağıda kısaca izah edilmiştir :

CETVEL 1

Standardın regresyon hattı ve LD₅₀ nin tayini

Doz mg/lt	x log doz	n	% ölü	P prob.	Y Exp. pr.	y work. pr.	w	wx	wy	wxy	wx ²
Kont.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	1,30	45	5	3,35	3,4	3,35	10,710	13,923	35,878	46,641	18,099
25	1,40	49	22	4,23	4,0	4,25	21,511	30,115	91,421	127,989	42,161
30	1,48	53	42	4,80	4,6	4,80	31,853	47,142	152,894	226,283	67,770
40	1,60	51	51	5,03	5,4	5,00	30,651	49,041	153,255	245,208	78,465
50	1,70	51	84	5,99	6,1	5,99	20,655	35,113	123,723	210,329	59,692
							115,380	175,334	557,171	856,450	268,187

$$\bar{x} = \frac{\sum wx}{\sum w} = \frac{175,334}{115,380} = 1,51962$$

$$\bar{y} = \frac{\sum wy}{\sum w} = \frac{557,171}{115,380} = 4,82900$$

$$b = \frac{(\sum wxy - \bar{x}\sum wy)}{(\sum wx^2 - \bar{x}\sum wx)} = 5,59106$$

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \quad y = 5,59x - 3,66$$

CETVEL 2

Numunenin regresyon hattı ve LD₅₀ nin tayini

2000	3,30	52	15	3,96	3,7	4,01	17,472	57,657	70,062	231,204	190,268
2500	3,40	49	27	4,39	4,4	4,38	27,342	92,962	119,757	407,173	316,070
3000	3,48	53	38	4,69	4,9	4,69	33,602	116,934	157,593	548,423	406,930
4000	3,60	51	61	5,28	5,7	5,22	27,132	97,675	141,629	509,864	351,630
5000	3,70	53	96	6,75	6,4	6,67	16,006	59,222	106,760	395,012	219,121
							121,554	424,450	595,801	2,091,676	1,484,019

$$\bar{x} = 3,49186$$

$$\bar{y} = 4,90153$$

$$y = 5,90x - 15,72$$

$$b = 5,90684$$

1. Birinci sütuna denenen ilâcın dozu yazılır (9 cc çapındaki petrilere 1 cc olarak tatbik edilen aseton mahlülünün konsantrasyonu mg/lt olarak, 20 ... 5000 mg/lt).

2. Dozların logaritması bulunarak x sütununa yazılır, virgülden sonra iki hane olabilir (1,30 ... 3,70). Dozlar, sıfır tam sayılı olduğu zaman, logaritmaları negatif olacağından, pozitif yapmak için dozlar 10 veya katları ile çarpılır, veya dozlar büyükse bölünür. Fakat hakiki LD₅₀ i tesbit için bulunan değer, tekrar 10 veya katlarına çarpılır veya bölünür.

3. n sütununa her doz için kullanılan böcek adedi yazılır (50 ... 53).

4. Ölümler % deye çevrilir, kontrolde ölüm varsa, tashih edilerek en yakın sayıya iblağ edilir (5 ... 96). Böcek adedi 200 den fazla ise virgülden sonra bir hane alınabilir.

5. Cetvellerden % ölümlerin probit değerleri bulunarak P sütununa işaret edilir (3,35 ... 6,75).

6. Log-probit veya normal grafik kâğıdında, ampirik probitlere (P) karşı, log doz (x) göz yardımı ile ve noktalara uygun olarak çizilir.

7. Her doz için hat üzerinde ki ordinat okunur. Bunlar beklenen (expected) probitlerdir. Virgülden sonra bir haneye kadar Y sütununa yazılır (3,4 ... 6,4).

8. Cetvellerden Y ve % ölüme tekabül eden working probitler okunarak y sütununa işaret edilir (3,35 ... 6,67).

9. Her Y için tekabül ettiği weighting coefficient cetvellerde bulunur ve böcek adedi ile çarpılarak w sütununa yazılır (10,710 ... 16,006).

10. Diğer sütunlar cetvel 1 ve 2 de gösterildiği gibi doldurulur.

11. w, wx, wy, wxy ve wx² sütunları toplanır.

$$\begin{aligned} 12. \quad x &= \frac{Swx}{Sw} & y &= \frac{Swy}{Sw} \\ b &= \frac{(Swxy - xSwy)}{(Swx^2 - xSwx)} \\ y &= \bar{y} + b(x - \bar{x}) \end{aligned}$$

formüllerinden hesap edilir.

İki ilâcın LD₅₀ lerinin mukayesesi için, paralel regresyon hatlarına, yani aynı b kıymetine malik olmaları icap eder. Halbuki bu durumda, standart ve nümunenin eğimleri farklıdır, 5,59 ve 5,90 dır. Hatların paralel yapılması için, b lerin pay ve paydaları toplanarak pay paydaya bölünür.

$$b_{ns} = \frac{11,223 + 9,762}{1,900 + 1,746} = 5,75562 \text{ bulunur. Şimdi, müşterek b kıymetini}$$

(5,75) toksisite formülünde yeniden kullanırsak;

$$y_n = 5,75 x - 15,19 \text{ (nümune için)}$$

$y_s = 5,75 x - 3,91$ (standart için) tesbit edilir. LD₅₀ ler, % 50 ölümün probiti olan 5 değerini y lerin yerine koymak ve bulunan x lerin antilogaritmasını bulmak sureti ile hesap edilir. Nümune ve standardın LD₅₀ lerinin arasındaki fark M dir ve iki ilâcın toksisitesi arasındaki farkın ölçüsüdür. Bu farktan nümunedeki ki % de aktif madde miktarı bulunur.

$M = 3,51234 - 1,54956 = 1,96278$ bunun antilogaritması 91,79 ve nümune de ki aktif madde miktarı $100/91,79 = \% 1,08$ dir. Bulunan % de aktif maddenin emniyet sınırları, M in varyansı vasıtası ile tesbit edilir;

$$V_m = \frac{1}{b_{ns}^2} \left(\frac{1}{Sw_n} + \frac{1}{Sw_s} + \frac{[(\bar{x}_n - \bar{x}_s) - M]^2}{b_{ns} \text{ in paydası}} \right)$$

$V_m = 0,00051$ ve $p = 0,05$ için sonsuz serbestlik derecesinde t değeri 1,96 olduğundan;

$$M_1 = 1,96278 + 1,96 \sqrt{V_m} = 2,00688$$

$M_2 = 1,96278 - 1,96 \sqrt{V_m} = 1,91868$ bunların antilogaritmaları ile 100 ti bölersek, $p = 0,05$ için emniyet sınırları olarak % 0,98 ve % 1,2 aktif madde bulunur.

SONUÇ

BHC ve DDT li toz preparatlardan elde edilen deneme neticeleri, izah edilen probit analiz metoduna göre işlenmiş ve bulunan aktif madde miktarları cetvel 3 de gösterilmiştir. Tesbit edilen % de aktif madde miktarları, beklenenlerden büyük bir ayrılık göstermemekte ve emniyet sınırları içinde bulunmaktadır. Gamma BHC li ilâçlarda biyolojik ve kimyevî metodlarla yapılan analizler arasında çok yakın bir mütabakat olduğu görülmektedir. Meltzer (1952) de gamma BHC tayininde biyolojik ve kimyevî metod arasında aynı mütabakata işaret etmektedir.

DDT nünunelerinde biyolojik metod ile tesbit ettiğimiz miktar p,p' — DDT olduğundan, organik klor metodu ile yapılan kimyevî analiz arasında ilk bakışta bir ayrılık gözükmemektedir. Organik klor metodu total teknik DDT yi veya organik olarak bağlı kloru belirttiğinden böyle bir farkın olması normaldir.

Preparatın imalinde kullanılan teknik DDT nin p,p' — isomer miktarı bilindiği takdirde, nümunenin DDT muhtevası tesbit edilebilir. Memleketimize ithal edilen teknik DDT ler için, % 70 civarında p,p' — isomer ihtiva etmesi kabul edildiğinden, bu esasa göre hesap edilirse DDT nünuneleri de % 10 civarında teknik DDT ihtiva etmektedir.

Ancak o,p — DDT temin edebildiğimizden, bunun, yalnız ve p,p' — DDT ile birlikte aktivitesinin tetkikinde, hiç bir biyolojik müessiriyete malik olmadığı ve p,p' — isomere her hangi bir şekilde tesir etmediği tesbit edilmiştir. Genel olarak BHC nin diğer isomerleri de biyolojik olarak aktif olmadığından, biyolojik yol ile gamma BHC tayinine önemli derecede tesir etmeyebilir.

DDT ve gamma BHC li toz preparatlara tatbik ettiğimiz izah edilen metodun, diğer toz preparatlara da tatbiki her zaman mümkündür.

CETVEL 3

Numunelerde bulunan aktif madde miktarı

Beklenen	Biyolojik yol ile bulunan aktif madde %	P = 0.05 için emniyet sınırları %	Kimyevi metod ile bulunan %
% 1 gamma BHC	1,08 gamma BHC	0,98 — 1,20	1,03
% 1,5 » »	1,72 » »	1,53 — 1,91	—
% 0,65 » »	0,71 » »	0,62 — 0,80	0,62
% 3 » »	3,02 » »	2,81 — 3,24	—
% 6,5 » »	6,36 » »	5,88 — 6,89	—
% 6,5 » »	6,60 » »	5,91 — 7,11	—
% 10 DDT	8,40 p,p' — DDT	6,57 — 10,70	—
» » »	6,89 » »	6,42 — 7,41	—
» » »	8,35 » »	6,61 — 10,54	—
» » »	6,95 » »	6,44 — 7,50	—
» » »	7,19 » »	5,84 — 8,85	—
» » »	7,86 » »	7,10 — 8,36	—
» » »	6,75 » »	5,20 — 8,30	10,7

Ö Z E T

Toz DDT ve BHC formülasyonlarında aktif maddenin biyolojik yol ile tayini için yapılan bu çalışmada, numunelerin aseton ekstraktları, aseton ile sulandırılarak bunlardan 1 ml 9 cm çapındaki petrilere pipet edilmiş ve petrilere düz bir satır üzerinde çalkanarak asetonun uçması temin edilmiştir. İlaçlanmış petrilere ile *Tribolium confusum* Duv. erginleri muayyen müddet temasta tutulmuş ve sonra temiz vasata alınarak sabit ısıda muhafaza edilmiş, belirli gün sonra her konsantrasyonun verdiği % ölümler tesbit edilmiştir. İlaçların saf maddelerini asetonda eritmek suretile hazırlanmış standard ile aynı şekilde yapılan deneme ve numunelerden elde edilen neticeler probit analiz ile işlenerek numunelerde ki % aktif madde miktarı bulunmuştur. Biyolojik ve kimyevi metodlar ile yapılan analizler arasında iyi bir mutabakat bulunmuştur.

Denemelerimize geniş ölçüde yardım eden ve bilhassa böceklerin standard olarak yetiştirilmesini sağlayan Turgut Sarıuçak ve Şakir Ünal'a kıymetli yardımları için teşekkür ederiz.

SUMMARY

DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENT CONTENT OF DUST INSECTICIDE FORMULATIONS BY MEANS OF BIOASSAY

After a long storage period, it is necessary to know the amount of active material of insecticides for calculating right dosage to obtain a good

control. For this, chemical method is the best way, but, it is sometimes difficult to do that because of lack of laboratory facilities. Bioassay is also another method of determination of active material content of insecticides. In this paper, using adults of *Tribolium confusum* Duv. for residual film method, determination of p,p' — DDT and gamma BHC in dust formulatins are explained. Good correlations obtained between the results of bioassay and chemical methods.

LİTERATÜR

- BOVINGDON, H.H.S. 1950. A bioassay technique using *Calandra granaria* for the determination of the percentage of pure insecticide in a crude preparation. Proc. İnt. Congr. Ent., Stockholm (1948), 8, 878, 1950.
- FINNEY, D. J. 1952. Probit analysis 2.nd edition, 318 sayfa. Cambridge Univ. Press.
- MELTZER, J. 1952. Determination of the insecticide content of preparations by means of *Tribolium confusum* Duv. 111e Congrès International de Phytopharmacie, Paris 1952 45-51.
- ŞENTÜRK, İ. 1959. Bioassay ile parathionlu bir m stahzarda aktif madde tayini. Bitki Koruma Bülteni. 1 (2). 23-25.