

**Türkiye'de Kullanılan Dipridil Grubu Herbisitlerin Analitik
Toksikoloji Açısından İncelenmesi***

Analytical Toxicological Study for Dipyridylum Herbicides Which
are Being Used in Turkey

Nevin VURAL**

Sema BURGAZ***

GİRİŞ

Tarım sektöründe yabancı otlar, bitki hastalıkları ve böceklerin verdiği zararların toplamına yakın bir zarara neden olmaktadır (10). Bu nedenle yabancı otların yok edilmesi için kimyasal maddelerin (= herbisitler) üretimi ve kullanılması dünyada son 10 yıl içerisinde önemli ölçüde artmıştır ve bu açıdan insektisitlerle yarış halindedir (9, 15). Yabancı otlara karşı kullanılan herbisitlerin dünyadaki bu geniş ölçeklerdeki kullanımı bazı sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (15, 18).

Kullanımları giderek artan dipridil grubu herbisitler içinde dikuat ve parakuat en çok bilinenleridir ve genel herbisit grubuna göre bir karşılaştırma yapıldığında toksisitesi hemen hemen en yüksek bileşiklerdir (15). Dipridil grubu herbisitlerle meydana gelen akut zehirlenmelerin çoğu kazaen ve intihar amacıyla ortaya çıkmaktadır ve ölüm oranının % 25-50 arasında olduğu tahmin edilmektedir.

Redaksiyona verildiği tarih: 13 Haziran 1983

* Ecz.Sema Burgaz'ın "Türkiye'de Kullanılan Dipridil Grubu ve Klorlu Fenoksiasetik Asit Grubu Herbisitlerin Analitik Toksikoloji Açısından İncelenmesi" isimli doktora tezinin bir bölümüdür Sınav Tarihi: Ocak 1983.

** Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

*** Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi.

1978'e kadar ölümlerle sonuçlanan ortalama 600 parakuat zehirlenmesi bildirilmiştir ve bunun % 60'ı da intihar maksadıyla olanlardır (16). Dipridil grubu bileşiklerle zehirlenmelerde ilgi çekici bir özellik; bileşiğin büyük bir kısmı kısa sürede organizmadan atılabilmesine rağmen akut toksik etkilerin ve ölümün 2-24 gün gecikebilmesidir (8, 13). Bu nedenle dipridil grubu herbisitlerle meydana gelen akut zehirlenmelerde zehirlenme etkeninin: a) Gerçekten alınıp alınmadığını göstermek için (nitel analiz), b) Vücuda alınmasından sonra uzun bir süre geçmişse (örn; 4-5 gün) zehirlenmiş şahsın tehlikede olup olmadığını belirlemek amacıyla vücut sıvılarındaki miktarının tayin edilmesi (nicel analiz) için idrarda kısa sürede sonuç alınabilecek, duyarlı, kesin ve her laboratuvar koşuluna uyarlanabilecek bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

DENEYSEL KISIM

Materyal ve Gereç: Türkiye'de kullanılan dipridil grubu herbisitlerden Dikuat dibromür monohidrat (I.C.I) ve Parakuat diklorür (I.C.I)'ün analitik standartları katılmış normal bireylerden alınan idrar örnekleri üzerinde çalışılmıştır.

Çalışmamızda aşağıdaki farmasötik kalitede maddeler kullanılmıştır: Carbowax 20M (Alltech Associates), Chromosorb-W-AW DMCS (60-80 mesh-Varian), Etil viyolojen diiyodür (I.C.I), Dowex 50AGW-X8 (100-200 mesh-Sigma), Zerolit 225 SRC14(52-100 mesh-BDH), Sodyum borohidür (Merck), Sodyum ditiyonit (Merck), Silikajel-G (Merck), Sellüloz MN300 (Macherey Nagel).

YÖNTEM

I a) Dipridil Grubu Herbisitlerin İnce Tabaka Kromatografisi'ne ait Çalışmalar: Parakuat diklorür ve dikuat dibromürmonohidrat'ın sırasıyla 3 mg/ ml ve 4 mg/ ml (iyon cinsinden hesaplanan) konsantrasyonda sudaki çözeltileri hazırlandı. Püskürtme belirteçleri olarak, Dragendorf ve İyodoplatinat belirteci kullanıldı (1, 11, 17, 20). Silikajel-G ve Sellüloz 300 MN ile kaplı plaklarda, Silikajel-G kaplı mikropaklarda metanol/6N H₂SO₄ (20:30 ve 40:10 oranlarında) ve metanol/6N HCl (20:30 ve 35:15 oranlarında) ile developpe edildikten sonra (1, 17, 20) tanktan çıkarılan plaklar oda sıcaklığında ku-

rutuldu. Üzerine daha sonra üstteki belirteçler püskürtülerek oluşan lekeler ve renkler kaydedildi. Her bileşiğin Rf değeri hesaplandı. Dipridil grubu herbisit örnekleri değişik miktarlarda plaklara tatbik edilerek sonuç veren en küçük herbisit miktarları saptanarak duyarlılıkları tayin edildi.

b) Dipridil Grubu Herbisit Standartlarının Katyon Değiştirici Reçine ile Ekstraksiyonuna ait Bazı Parametrelerin İncelenmesi: "Batch" ve "kolon" tekniği uygulamalarının ekstraksiyon verimine etkisi araştırıldı. Bu amaçla bu bölümde sadece parakuat diklorür ile çalışıldı. Katyon değiştirici reçine olarak Dowex 50AGW-X8 kullanıldı (3, 6). Parakuat diklorür'ün "batch" tekniği ile katyon değiştirici reçineden ekstraksiyon veriminin saptanması için 10 ml parakuat çözeltisi (10 µg/ml iyon cinsinden suda) 30 ml NHC1 ile homojenize edilerek 2g Dowex 50AGW-X8 bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika karıştırıldı. Üstte kalan çözelti atıldı. Daha sonra sırasıyla reçine 20 ml distile su, 50 ml 2N HCl ve 20 ml distile su ile yıkandı. En sonunda parakuat'm elüsyonu amacıyla 50 ml 6N HG1 ile 1000 rpm'de 5 dakika karıştırıldıktan sonra üstte kalan çözelti kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 10 ml doymuş amonyum klorürde çözüldükten sonra 2 ml % 1 sodyum ditiyonit ilavesiyle 600 nm'de absorbansı okundu ve konsantrasyonlar kalibrasyon grafiği yardımıyla saptandı. % Verimlerin ortalaması bulundu. "Kolon" tekniği uygulanırken Şekil 1'de görülen 250 X 8 mm boyutlarında cam kolon kullanıldı. Kolonda 3-4 ml/dak hızla yukarıda anlatılan işlemlerin aynisi elüsyon basamağına kadar uygulandı. Daha sonra parakuat'ın elüsyonu için 50 ml 6 N HCl 0.5-1 ml/dak hızla kolondan geçirildi. Eluat kuruluğa kadar uçulduktan sonra "batch" tekniğinde uygulanan işlemler uygulandı ve % verimlerin ortalamaları bulunarak karşılaştırıldı.

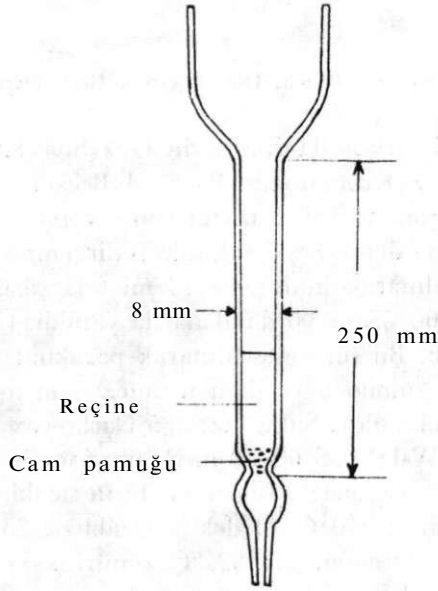
c) Dipridil Grubu Herbisitlerin İdrardan Ekstraksiyonu: Bu işlemde katyon değiştirici reçine olarak Zeo-Karb 225 (H⁺) kullanıldı (4, 11, 23). Bu amaçla Zeo-Karb 225 (Na⁺) 6N HCl ile H⁺ şekline çevrilerek cam kolona yerleştirildi ve parakuat ve dikuat'ı ihtiva eden 10 ml'lik idrar örnekleri (10 µg/ml) (b) de uygulanan kolon tekniği ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar İ.T.K.'ne ve mikroplaklara uygulandı ve ekstraktların renk belirteci ile verdikleri lekeler üzerinde yaklaşık verimleri incelendi.

II a) Dipridil Grubu Herbisitlerin Gaz Sıvı Kromatografisi'ne ait Çalışmalar (Gaz Kromatograf-Packard Becker Model 419): Bu bileşiklerin gaz kromatografik tayinlerinin yapılması için sodyum borohidrür (NaBH_4)den yararlanılarak indirgenme işlemi yapıldı. Model parakuat alınarak indirgeme işlemi oda sıcaklığında (21 ± 2 °C) 5, 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakikalarda yapıldı. Optimum reaksiyon süresi saptandı. Bu süre esas alınarak parakuat ve dikuat'ın indirgenme ürünleri (monoen ve dien ürünler) için aşağıdaki kromatografik koşullar kullanıldı: Sabit faz: %5 Carbowax 20M/%5 KOH "Chromosorb WAW-DMGS 60-80 mesh üzerinde", Dedektör: FID, Taşıyıcı gaz (azot) akış hızı: 20 ml/dak, Fırın sıcaklığı: 180 °C, Enjeksiyon giriş sıcaklığı: 210°C, Dedektör sıcaklığı: 230°C, Kaydedici hızı: 0.5 cm/dak, Attenuation: 32. Çözünürlük ve kimyasal yapı benzerlikleri nedeniyle etil viyolojen diiyodür iç standart olarak kullanıldı. Herbisit standartlarının indirgeme işleminden sonra 3 μ - madde enjekte edilerek alıkonma zamanları belirlendi. FID dedektöre cevap veren en küçük herbisit miktarları saptandı.

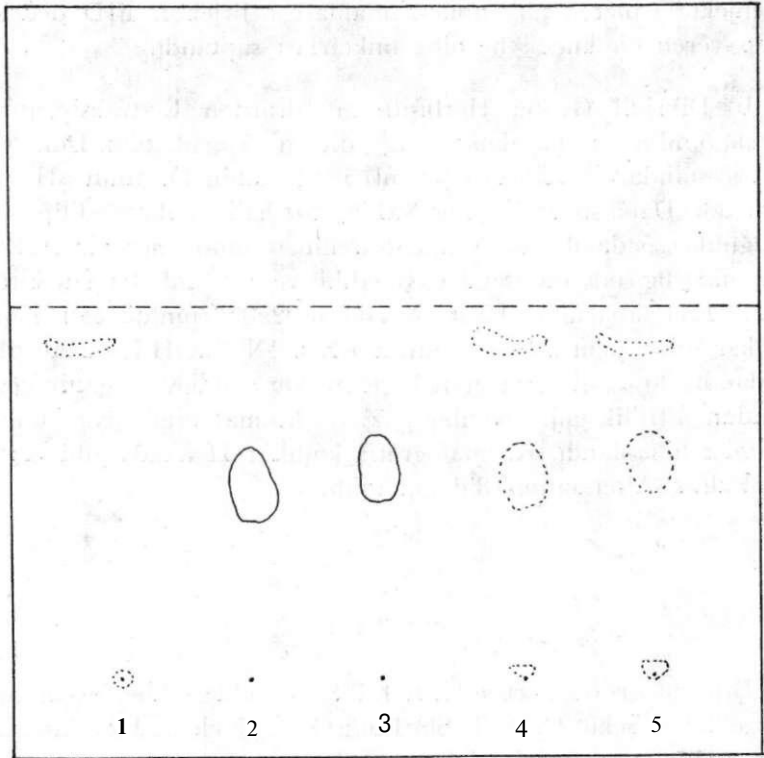
b) Dipridil Grubu Herbisitlerin İdrardan Ekstraksiyonu: Bu amaçla 5 ml idrara parakuat (5 μ g), dikuat (5 μ g) katıldı. Daha sonra 1 ml iç standart çözeltisi (1 μ g/ml) ilave edildi. Ortamın pH'sı 11'e ayarlandı. Daha sonra 150 mg NaBH_4 toz halinde ilave edilip oda sıcaklığında 75 dakika bekletildi. Sürenin sonunda her bir reaksiyon karışımına 8g sodyum asetat ilave edildi ve 2 X 9 ml eter ile ekstrakte edildi. Eter tabakaları 0.5 ml N HCl ile 2500 rpm'de çalkalanarak eter kalıntıları uçuruldu. Çözeltinin pH'sı 4N NaOH ile alkali pH'ya ayarlandı, 30 μ l diklorometan ile ekstrakte edildi ve organik çözücü fazından 3 μ l'lik enjeksiyonlar gaz sıvı kromatografa uygulandı. % Verimler hesaplandı. Kromatografik koşullar II a'daki gibi yürütüldü. Yalnız Attenuation 8'de çalışıldı.

BULGULAR

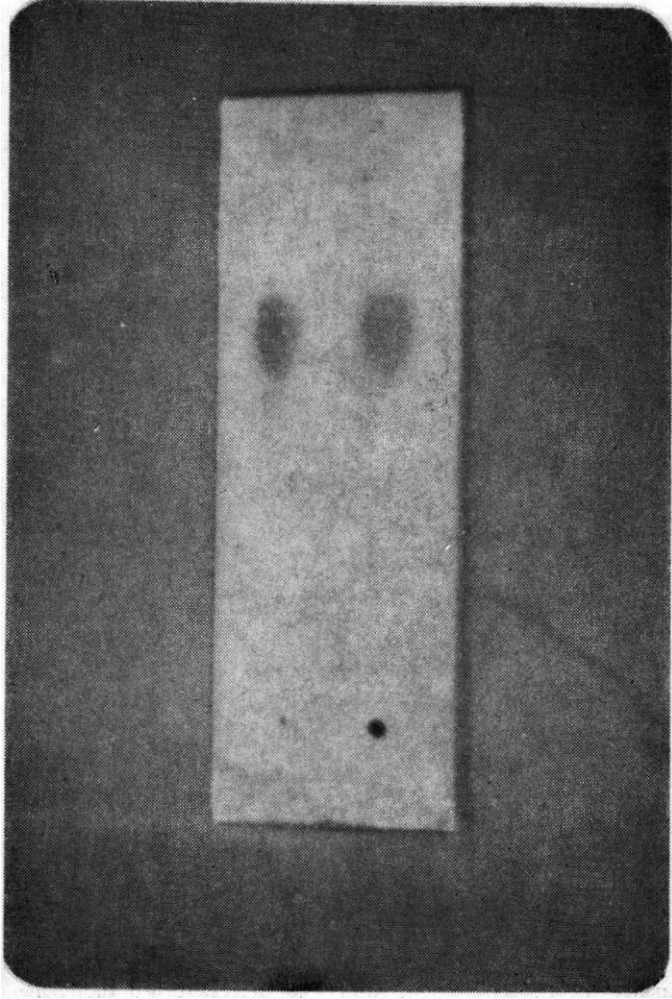
Dipridil grubu herbisitlerin İ.T.K. ile elde edilen kromatografik özellikleri Şekil 2,3 ve Tablo I'de; GSK ile elde edilen kromatografik özellikler ise Şekil 4,5'te gösterilmiştir.



Şekil 1. Cam Kolon.

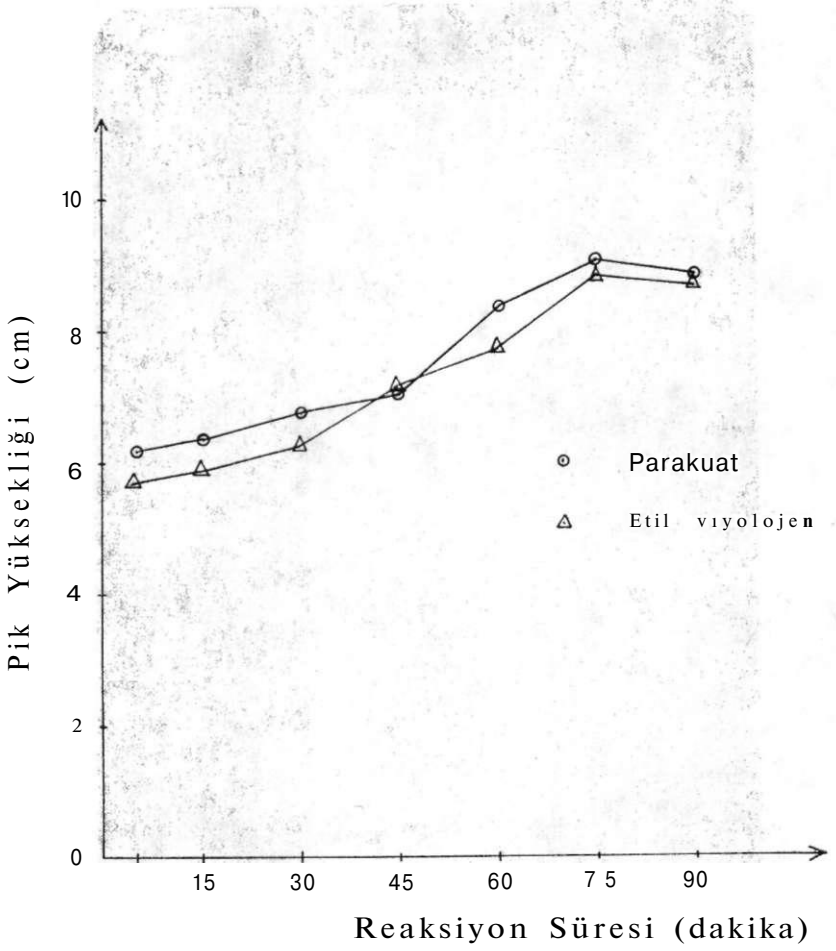


Şekil 2. Parakuat ve Dikuat'ın İdrar Örneği Ekstraktlarının İ.T.K'daki Kromatogramı. Sabit Faz: Silikajel-G, Hareketli Faz: Metanol/6N H₂SO₄ (20:30), Renk Belirteci: Dragendorff, 1. Boş idrar ekstraktı, 2. Parakuat (20 µg), 3. Dikuat (20 µg), 4,5. İdrar ekstraktları.

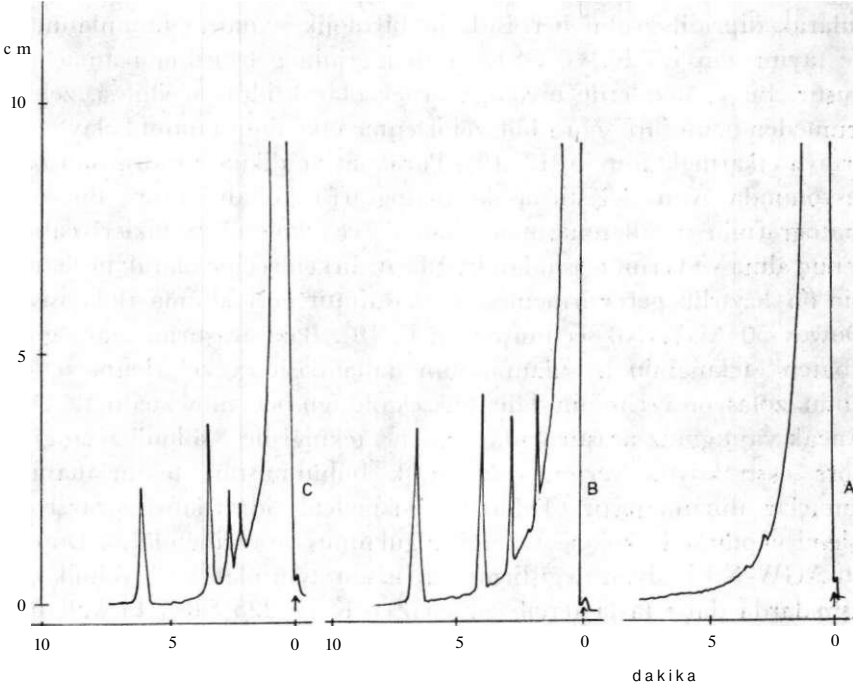


Şekil 3. Parquat'm İdrar Örneği Ekstraktının İ.T.K'daki Kromatogramı-Mikroplaklar üzerinde.

Sabit Faz: Silikajel-G, Hareketli Faz: Metanol/6N H₂SO₄ (20:30), Renk Belirteci: Dragendorff, 1. Parquat (20 µg), 2. İdrar ekstrektı.



Şekil 4. Parakuat Ve Etil viyolojen'in NaBH_4 ile Gerçekleştirilen İndirgeme Reaksiyonunun Süresinin Pik Yüksekliklerine Etkisi.



Şekil 5. Parakuat Ve Dikuat'ın İdrar Örneği Ekstraktlarının Gaz Kromatogramları.

A: Boş İdrar ekstraktı, B: Parakuatlı idrar ekstraktı (0.5 µg), C: Dikuatlı idrar ekstraktı (0.5 µg).

Tablo I. Parakuat diklorür'ün Katyon Değiştirici Reçineden % Ekstraksiyon Verimleri.

| | Batch Tekniği % Verimi | Kolon Tekniği % Verimi |
|----------|---------------------------|---------------------------|
| Parakuat | 46.98 ± 1.12 | 85.12 ± 1.62 |

TARTIŞMA

Dipridil bileşiklerden özellikle parakuat'ın insanları sinsi bir şekilde öldürmesi klinik toksikologların ilgisini çekmektedir. Gerçekten de akciğer toksisitesi ile ilgili şiddetli belirtiler ortaya çıktığı zaman bu etkiler ortadan kaldırılamamakta ya da etkili tedavi yöntemlerine rağmen iyileşme olmamaktadır (8, 13, 14). Bu nedenle bu araştırmamızda, daha önceki yapılmış olan çalışmalarda gözönünde bulundu-

rularak dipridil grubu herbisitlerin biyolojik sıvılarda tanımlanması ve tayini için İ.T.K. ve GSK yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemlerde biyolojik örnek olarak idrar seçilmesi, zehirlenmeden uzun süre sonra bile zehirlenme etkeninin tanımı kolaylığını ortaya çıkarmaktadır (5, 13, 19). Parakuat ve dikuat'ın idrardan izolasyonunda iyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır. Bu kromatografinin uygulanmasında "batch" ve "kolon" teknikleri çabuk sonuç alma ve verim açısından karşılaştırılırken reçine olarak herhangi bir ön hazırlık gerektirmemesi ve kantitatif geri alınma dolayısıyla Dowex 50 AGW-X8 seçilmiştir (4, 6, 19). Bazı araştırmacılara göre "batch" tekniğinin uygulanmasının daha basit ve zehirlenme etkeninin izolasyon veriminin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (2, 20). Ancak yaptığımız araştırmada "batch" tekniği ile "kolon" tekniğine göre ekstraksiyon verimi çok düşük bulunmuştur, tekrarlanabilir sonuçlar alınamamıştır (Tablo I). Bu nedenle idrardan ekstraksiyon işlemi yapılırken "kolon" tekniği uygulanmış ve reçine olarak Dowex 50 AGW-X8 ile iyon değiştirme kapasitesi aynı olan ve biyolojik çalışmalarda daha fazla tercih edilen Zeo-Karb 225 SRC 14 kullanılmıştır (4, 23). İdrardan gelen safsızlıklar 2 N HCl ile giderildikten sonra parakuat ve dikuat diğer araştırmacıların (11, 20) aksine başka herhangi bir çözelti ile muamele etmeden 6N HCl çözeltisi ile elde edilmiştir. İdrardan izolasyondan sonra bileşikler tanımlamak için İ.T.K. ile yapılan çalışmada (Şekil 2) polaritesi fazla organik çözücü ve asit kombinasyonları kullanılarak kuyruksuz ve düşük olmayan Rf değerleri elde edilmiştir. Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi renk belirteçleri ile yapılan çalışmada parakuat ve dikuat'ı 0.25-0.50 µg duyarlıkta ayırtmak mümkün olmuştur. Bu bileşiklerin idrar ekstraktları mikropaklar ile 10 dakikalık bir sürede tanımlanmıştır (Şekil 3). Böylece bu bileşiklerin biyolojik materyalden toplam 2 saati geçmeyecek bir süre içinde analizleri gerçekleştirilebilmektedir.

Bu bileşiklerin bazik ortamda NaBH_4 ile indirgenmesiyle elde edilen ürünler organik çözücü ile ekstrakte edildikten sonra gaz sıvı kromatografisiyle analizi yapılabilmektedir. Bu indirgeme işleminin biyolojik örneklerde de uygulanabileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (7, 21, 22). Bu amaçla, indirgeme işlemi parakuat ve dikuat'ı içeren idrar örneklerine uygulanmıştır. Optimum indirgeme süresi Şekil 4'te de görüldüğü gibi 75 dakikalık reaksiyon süresinde

elde edilmiştir. Sonuçlarımız reaksiyonun 70 dakikada % 90'ının tamamlandığını belirten çalışma (7) ile uygunluk göstermektedir. Yöntemimizde kullanılan FID dedektöre bileşiklerin duyar olan en küçük miktarları 50 ng olarak saptanmıştır. Kolorimetrik yöntemlere göre duyarlık 10-20 kat daha fazladır (3, 6, 12). İdrar örneklerine oda sıcaklığında NaBH_4 ile reaksiyon uygulandıktan sonra indirgenme ürünlerinin ekstraksiyonu için plazma örneklerinde geliştirilen yöntem (7) uyarlanarak temiz ekstraktlar elde edilmiştir (Şekil 5).

Bu bileşiklerin ekstraksiyon verimlerinin GSK yöntemiyle elde edilen değerleri parakuat ve dikuat için % 83.64 ± 3.04 ve % 79.13 ± 2.06 dır. Bu durumda geliştirdiğimiz yöntemde 1 litre idrarda 0.2 mg dipridil bileşiği olduğunda kesin tanım ve miktar tayini yapılabilmektedir.

ÖZET

Yurdumuzda kullanılmakta olan dipridil grubu herbisitlerin (parakuat ve dikuat) idrardan nitel ve nicel analizleri için kısa sürede sonuç alınabilen, duyarlı ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir.

Dipridil grubu herbisitlerin idrardan izolasyonu için Zeo-Karb 225 (H^+) reçinesi ile ekstraksiyon yöntemi, nitel analiz için İ.T.K. yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon yönteminde "kolon" ile "batch" tekniği karşılaştırılırken parakuat model olarak alınmıştır ve reçine olarak da Dowex 50 AGW-X8 kullanılmıştır. Parakuat ve dikuat'ın idrardan ekstraksiyonunda daha yüksek verim elde edildiği için "kolon" tekniği uygulanmıştır. İ.T.K.'de çeşitli renk belirteçleri ile dipridil bileşikleri 0.25-0.50 µg; duyarlıkta ayırdetmek mümkün olmuştur.

Parakuat ve dikuat'ın GSK ile nicel tayininde NaBH_4 ile oda sıcaklığında 75 dakikada indirgeme işlemi yapılmıştır. Etil viyolojen iç standart olarak kullanılmıştır. % 5 Carbowax 20M/ % 5 KOH kolon sistemi ve FID dedektör kullanarak indirgenme ürünlerinin birbirlerinden iyi bir şekilde ayrılmaları sağlanmıştır. Bu yöntemle 1 litre idrarda 0.2 mg dipridil bileşiğinin kesin tanım ve miktar tayini mümkün olmuştur.

SUMMARY

Methods for the qualitative and quantitative urinalysis of dipyriddylium herbicides (paraquat and diquat) which are being used in Turkey were developed.

Dipyridylium herbicides in urine were concentrated with the ion-exchange resin Zeo-Karb and identified by TLC. The cation-exchange resin, Dowex 50 AGW-X8, was tried to concentrate paraquat -selected as a model herbicide-from urine by applying "batch" and "column" operations. The column operation was used for the isolation of paraquat and diquat from urine, as it was more efficient. The sensitivity was found to be between 0.25-0.50 μg for paraquat and diquat on TLC. NaBH_4 was used for the reduction of paraquat and diquat for GLC analysis of these compounds. Optimum reduction time was determined 75 minutes at the room temperature. Ethyl viologen was used as an internal standard and the herbicides were efficiently separated by GLC using columns packed with 5% Carbowax 20M/ 5% KOH and FID. By using our developed method it was estimated that 0.2 mg dipyriddylium herbicide in one liter urine can be determined by GLC.

LİTERATÜR

- 1- Abou-Doma, M.B., Komeil, A.A.: *J.Chromatogr.* 152: 585-588 (1978).
- 2- BDH Chemicals Ltd.: Ion exchange resins. 5th Ed.England (1977).
- 3- Berry, D.J., Grove, J.: *Clin.Chim.Acta.* 34: 5-11 (1971).
- 4- Calderbank, A., Yuen, S.H.: *Analyst.* 90: 99-106 (1965).
- 5- Carson, D.J.L., Carson, E.D.: *Forensic Sci.* 7: 151-160 (1976).
- 6- Daniel, J.W., Gage, J.C., *Brit.J.Ind.Med.* 23: 133-136 (1966).
- 7- Draffan, G.H., Clare, R.A., Davies, D.L., Hawksworth, G., Murray, S., Davies, D.S.: *J.Chromatogr.* 139: 311-320 (1977).
- 8- Fairshter, R.D., Dabır-Vazırı, N., Smith, W.R., Glauser, F.L., Wilson, A.F.: *Toxicology.* 12: 259-266 (1979).
- 9- Foy, C.L., Bingham, S.W.: *Res.Rev.* 29: 105-135 (1969).
- 10- Güneyli, E.: Yabancı Ot Mücadele ve Araştırma Metodları. Ankara (1973).
- 11- Heyndrickx, A.: Paraquat. 1.1'-dimethyl-4.4'-dipyridylium ion. "Progress in Chemical Toxicology"de. Ed.A.Stolman. Sayfa 245-246. Academic Press. New York. London (1969).

- 12- Khanna, S., Fang, S.C.: *J.Agr.Food Chem.* 14: 500-503 (1966).
- 13- Malone, J.D.G., Carmody, M., Keogh, B.: *J.Irish.Med.Assoc.* 64: 59-68 (1971).
- 14- Masterson, J.G., Roche, W.J.: *Ibid.* 63: 261-264 (1970).
- 15- Murphy, S.D.: Pesticides. "Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons. 2nd Ed." da.Ed.J.Doull, C.D. Klaassen, M.O.Amdur.Sayfa 357-408. Macmillan Publishing Co.Inc. New York (1980).
- 16- Russell, L.A., Berniece, E.S., Rooney, P.A.: *Clin Toxicol.* 18: 915-928 (1981).
- 17- Sharp, W.C.M., Ottolenghi, A., Posner, H.S.: *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 22: 241-251 (1972).
- 18- Tarım ve Orman Bakanlığı: Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Çalışmaları Brifing Notları. Ankara (1981).
- 19- Tompsett, S.L.: *Acta Pharmacol.et Toxicol.* 28: 338-345 (1970).
- 20- Tsunenari, S.: *Forensic.Sci.* 5: 61-67 (1975).
- 21- Ukaı, S., Hirose, K., Kawase, S.: *J.Hyg.Chem.* 19: 281-286 (1973).
- 22- Van Dijk, A., Ebberink, R., De Groot, G., Maes, R.A.A, Dauze, J.M.C., Van Heyst, A.N.P.: *J.Anal.Toxicol.* 1: 151-154 (1977).
- 23- Van Dijk, A., Maes, A.A.R., Dröst, R.H., Douze, J.M.C., Van Heyst, A.N.P.: *Arch.Toxwol.* 34: 129-136 (1975).