

DOMATESLERDE YÜKSEK PERFORMANS LİKİT KROMATOGRAFİSİ (HPLC) İLE KALINTI 2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT (2,4-D) TAYİNİ

DETERMINATION OF THE RESIDUES OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D) IN TOMATOES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Vural GÖKMEN, Jale ACAR

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), herbisit olarak Türkiye’de kullanılmasına izin verilen bir maddedir. Ancak bu maddenin kontrolsüz bir şekilde, bazı sebzelerin serada yetiştirilmesinde büyüme düzenleyici olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Buna karşılık bugüne kadar Türkiye seralarında yetiştirilen bu sebzelerde kalıntı 2,4-D miktarının belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Bazı bitkisel ürünlerde 2,4-D tayini amacıyla kullanılan gaz kromatografik yöntemlerde örneğin temizlenmesi ve esterifikasyonu uzun zaman aldığından ve fazla miktarda kimyasal kullanımını gerektirdiğinden bu araştırmada, domateslerdeki 2,4-D’ nin serbest asit formunda analiz edilebildiği yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) için bir yöntem geliştirmeye çalışılmıştır. Bu amaçla bitkisel materyallerde gaz kromatografisi (GC) ile 2,4-D’ nin metil esteri formunda tayinine uygun bir yöntem esas alınmıştır ve HPLC’ ye uyarlanmaya çalışılmıştır. Domatese ilave edilen 0,5 ve 4 mg/kg 2,4-D sırasıyla %90,6-93,6 ve %62,85-74,65 olarak geri kazanılabilmektedir.

SUMMARY: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is permitted to be used only as a herbicide in Turkey, but It is well known that it is also used ignorantly as growth regulator during the growth of some vegetables in greenhouses. Unfortunately, no study has been carried out to determine the residues of 2,4-D in greenhouse vegetables.

In most of the methods in which gas chromatography (GC) was used for the determination of the residues of 2,4-D in plant materials, cleaning-up of the sample and esterification of 2,4-D have appeared as very complex treatments increasing the time and the total cost of analysis. Therefore, it has been the purpose of this study to develop an high-pressure liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of 2,4-D residues in tomatoes. A gas chromatographic method offered for the determination of 2,4-D residues in plant materials as methyl ester form was accepted as the basis and modified for HPLC. Quantitative analyses were carried out by HPLC as free acid form. % recoveries corresponding to the added 0.5 and 4 mg/kg of 2,4-D were found out to be 90.6-93.6%, 62.85-74.65%, respectively.

GİRİŞ

Son yıllarda artış gösteren örtü altı sebze tarımında domates önemli bir yere sahiptir. Dış satımın önem kazanması nedeniyle bu yer giderek genişleme eğilimindedir. Buna rağmen, örtü altı sebze yetiştiriciliğinde bazı sorunlar bulunmaktadır. Bunların en önemlisi seralarda düzenli ve yeterli bir ısıtma yapılamaması sebebiyle meyve tutumunun yetersiz olmasıdır. Her ne kadar soğuk kış aylarında günlük ortalama sıcaklıklar bitki gelişimi için yeterli ise de, gece sıcaklıklarının düşük olması, çiçek tozu oluşumunu engellemekte ve normal meyve tutumu gerçekleşmemektedir. Don ve düşük sıcaklıklardan korunmak amacıyla yapılan ısıtma ise, toplam üretim maliyetini artırdığından meyve tutumu için pratik bir çözüm olarak görülmemektedir. Bu nedenle örtü altı domates ve diğer bazı sebzelerin yetiştirilmesinde, hormon olarak bilinen bitki büyüme düzenleyici kimyasalların kullanımı zorunlu hale gelmiş ve son yıllarda kullanımı giderek artmıştır.

Yaygın olarak kullanılan 2,4-D bir herbisit olup; yine bu amaçla kullanılmak üzere Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’ nca imaline 07.08.1964, ithaline ise 17.05.1971 yılından beri izin verilmektedir. Aynı amaçla 2,4-D ester halinde de kullanılabilmektedir. 2,4-D esterinin imaline ise 02.01.1973’ den beri izin verilmektedir (ANONYMOUS, 1992).

Ashnda herbisit olan bu maddeler bitkilerde büyüme düzenleyici kimyasal olarak da kullanılabilmektedir. Ancak kullanımdaki bilgi ve deneyim eksikliği nedeniyle, yanlış ve yüksek dozda 2,4-

* Bu çalışma Vural Gökmen’in, Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı tarafından desteklenen master tezinin bir bölümüdür.

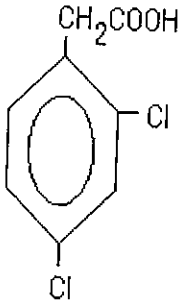
D uygulanması sonucu özellikle domates meyvelerinde koflaşmalar ve şekil bozuklukları gözlenmektedir. Diğer taraftan kanserojen olarak nitelenen bu tür maddelerin, domateslerin tüketilmesi ile insan sağlığını olumsuz etkileyebileceği de bildirilmektedir.

Klorlu fenoksiasetik asit grubunda yer alan 2,4-D ile insan hücre kültürleri üzerinde yapılan in-vitro çalışmalarda, bu bileşiğin düşük konsantrasyonlarda bile DNA hasarı meydana getirdiği ve dolayısıyla 2,4-D'nin genetik hasar oluşturma potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir. 2,4-D ile yapılan kanserojenite testlerinde bu etkinin değerlendirilebilmesinin yetersiz olduğu, ancak bu maddenin ko-kanserojenik etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalara göre de tümör oluşumunu hızlandırdığı belirtilmektedir (BURGAZ, 1982). 2,4-D'nin hayvanlar üzerinde oral öldürücü dozunun (LD₅₀) 300-1000 mg/kg olduğu bildirilmektedir (ANONYMOUS, 1981).

Birleşmiş Milletler Gıda Tarım Teşkilatı (FAO) ve Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ortak komisyonu (Codex Alimentarius Commission), 1986 yılı şubat ayında 2,4-D için bazı gıdalarda bulunabilecek en yüksek düzey ile ilgili sınırlamalar getirmiştir. Buna göre arpa, buğday ve çavdarda 0,5 mg/kg, turunçgillerde 2 mg/kg, et, süt ve yumurtada 0,05 mg/kg ve otlarda 0,5 mg/kg düzeyine kadar 2,4-D kalıntı düzeyine izin verilmiştir. Almanya ve diğer Avrupa ülkeleri ise kendi standartlarında bu miktarları buğday ve diğer hububat için 0,1 mg/kg olarak sınırlarken, taze meyve ve sebze için 0,2 mg/kg sınırını koymuşlardır (GILSBACH ve THIER, 1982; EBING ve ark., 1985; MEEMKEN ve ark., 1987).

Ülkemizde 2,4-D'nin herbisit olarak kullanımına yasal olarak izin verildiği halde, 2,4-D uygulanmış ürünlerde 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesine yönelik kapsamlı bir çalışma henüz yapılmamıştır.

2,4-D klorlu fenoksiasetik asit grubunda yer alan ve herbisit olarak kullanılan bir maddedir. Erime noktası 138°C olan 2,4-D, benzen, alkol, eter, kloroform vb. organik çözücülerde çözünürken; suda çok az çözünen beyaz kristal bir tozdur (BURGAZ, 1982). 2,4-D'nin sudaki çözünürlüğü, 25°C'de 0,07 ppm'dir (ANONYMOUS, 1981). 2,4-D'nin kimyasal açık formülü Şekil 1'de verilmiştir (BURGAZ, 1982).



Şekil 1. 2,4-D'nin kimyasal açık formülü

Bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler genel olarak şu aşamalardan oluşmaktadır:

i. Ekstraksiyon; ii. Ekstraktın temizlenmesi; iii. Derivatizasyon; iv. Kantitatif veya kalitatif tayin

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, 2,4-D'nin bitkisel materyal bünyesindeki formuda göz önüne alınarak, ekstraksiyondan önce asit veya alkali hidrolizi uygulandığı veya örnekteki kalıntının doğrudan seyreltik alkali ile ekstrakte edilmeye çalışıldığı görülmektedir.

Uygulanan ekstraksiyon yöntemi ne olursa olsun, ekstraktın mutlaka temizlenmesi gerekir. Genellikle ekstrakta uygulanan ilk temizleme işlemi asit/baz ayırmadır. Bunun için asitlendirilmiş organik ekstrakt, seyreltik sulu alkali çözeltisi ile ekstrakte edilir. Böylelikle renkli organik faz atılırken, daha az renkli, 2,4-D içeren sulu faz ayrılmış olur (MUNRO, 1972; CESSNA, 1980; JENSEN ve GLAS, 1981; BRISTOL ve ark., 1982; COOK ve ark., 1983; ERNER ve COGGINS, 1989).

Ekstraktın daha etkin bir şekilde temizlenmesi için ise çoğunlukla kolon veya jel kromatografisi kullanılmaktadır.

Kolon kromatografisi daha çok örnek derivatize edildikten sonra uygulanan bir temizleme işlemidir. Kolon dolgu maddesi olarak silikajel, alüminyum oksit, asidik alüminyum veya florisil kullanıldığı görülmektedir (POPOV, 1979; SAMOİLOV ve ark., 1979; CESSNA, 1980; SPECHT ve TILLKES, 1981; BRISTOL ve ark., 1981; BRISTOL ve ark., 1982; ROSEBOOM ve ark., 1982; SEKITA ve ark., 1982; COOK ve ark., 1983).

Bazı çalışmalarda ise kolon dolgu maddesi olarak polistiren jel yapıdaki maddelerin kullanıldığı bilinmektedir. Bunlar arasında Amberlite XAD-2, Separon SE sorbent ve polistirendivinilbenzen kopolimeri yer almaktadır (PIETRZYK ve CHU, 1977a; PIETRZYK ve CHU, 1977b; SMITH ve HAYDEN, 1979; SPECHT ve TILLKES, 1981; SMITH ve PIETRZYK, 1983; KLEMENT ve ark., 1986). SPECHT ve TILLKES (1981), 11 fenoksialkanoik herbisitinin tayininde, ekstraksiyondan sonra jel kromatografik temizleme uygulamışlardır. Araştırmacılar, dolgu maddesi olarak Bio Beads S-X3'ü kullanmışlar ve başarılı sonuç almışlardır.

Son 20 yıldır, bitkisel materyallerdeki kalıntı 2,4-D ve benzeri asidik herbisitlerin tayinine yönelik geliştirilen yöntemlerin hemen tamamen gaz kromatografik yöntemler olduğu dikkati çekmektedir (YIP, 1971; MUNRO, 1972; RENBERG, 1974; LOKKE, 1975; SMITH ve HAYDEN, 1979; CESSNA, 1980; BRISTOL ve ark., 1981; MOYE, 1981; SPECHT ve TILLKES, 1981; BRISTOL ve ark., 1982; COOK ve ark., 1983; SELL ve MAITLEN, 1983; SPECHT ve TILLKES, 1985; WALISZEWSKI ve WALISZEWSKI, 1987; ALLANDER, 1989; ERNER ve COGGINS, 1989; STEINWANDTER, 1989; CESSNA, 1990; BRONDZ ve OLSEN, 1992). Ancak 2,4-D gibi yüksek polariteye sahip bileşikler, gaz kromatografik tayinlerinden önce mutlaka derivatize edilmek zorundadırlar (MIERZWA ve WITEK, 1976; JENSEN ve GLAS, 1981; ROSEBOOM ve ark., 1982; AKERBLUM ve LINDGREN, 1983; WALISZEWSKI ve SZYM CZYNSKI, 1985; ALLANDER, 1989; FAYYAD ve ark., 1989).

Fenoksikarboksilik asit herbisitlerin derivatizasyonu amacıyla geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında metilasyon, pentaflorobenzilasyon, etilasyon ve trikloroetilasyon sıklıkla rastlanılan yöntemlerdir (JENSEN ve GLAS, 1981; ROSEBOOM ve ark., 1982; WONG, 1982; BRONDZ ve OLSEN, 1992). Ancak metilasyon, reaksiyonunun kolaylığı ve verimi açısından daha çok tercih edilmektedir (ROSEBOOM ve ark., 1982).

Bununla birlikte, 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asitlerin gaz kromatografik olarak tayinlerinde uygulanan derivatizasyon işleminin bazı dezavantajları bulunmaktadır (MOYE, 1981). Bu dezavantajlar şöyle sıralanabilir:

1. Derivatizasyon sırasında oluşan yan ürünler, kromatografik tayinde aranılan maddenin separasyonunu engelleyerek yöntemin duyarlılığını düşürmektedir.

2. Derivatizasyon reaksiyonunun verimi uygulanan yönteme göre değişmekte ve her zaman aynı oranda gerçekleşmemektedir. Bu da yöntemin tekrar edilebilirliğini engellemektedir.

3. Derivatizasyon sırasında oluşan reaksiyon yan ürünlerinin temizlenmesi için uygulanan ek işlemler hem yöntemin süresini uzatmakta, hem de yöntemin maliyetini yükseltmektedir.

Buna karşılık, fenoksikarboksilik asit herbisitler, serbest asit formunda, derivatizasyona gerek duyulmadan HPLC ile analiz edilebilmektedir. Bu, analizi önemli ölçüde basitleştirip, hızlandırmaktadır. Bu tür maddelerin HPLC ile analizlerindeki en büyük problem ise duyarlılığın düşük olmasıdır.

Bitkisel materyallerde gaz kromatografik yöntemlerle 2,4-D kalıntılarının saptanması konusunda çalışan bazı araştırmacılar kullandıkları yöntemin bazı modifikasyonlarla HPLC'ye uyarlanabileceğini bildirmektedirler (SPECHT ve TILLKES, 1981). Ayrıca çeşitli fenoksikarboksilik asitlerin serbest asit formunda HPLC ile tayin edilmesi konusunda geliştirilen bir yöntemin, bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntılarının belirlenmesinde de kullanılabilmesi ileri sürülmektedir (ROSEBOOM ve ark., 1982).

Bu çalışmanın amacı, daha önce SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından bitkisel materyallerdeki çeşitli fenoksikarboksilik asit kalıntılarının belirlenmesi amacıyla geliştirilen ve domatesler için uygun olduğu da yapılan ön denemelerle saptanan gaz kromatografik yöntemin modifiye edilerek, domateslerdeki 2,4-D kalıntılarının HPLC ile saptanabilmesi olanaklarının araştırılmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırma materyali: Denemelerde Ankara piyasasından yaz aylarında sağlanan, 2,4-D uygulanmamış tarla domatesleri materyal olarak kullanılmıştır. Domates örnekleri analiz edilinceye kadar, polietilen torba içinde -18 C'deki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar ve diğer yardımcı maddeler: Denemelerde kullanılan tüm organik çözücüler HPLC kullanımı içindir. 2,4-D standart çözeltileri 0,5, 1, 2, 3 ve 4 ng/ μ l konsantrasyonlarında olacak şekilde 1000 ng/ μ l'lik stok çözeltiden izopropil alkol:su (75:25, v/v) karışımı içinde hazırlanmıştır.

Yöntem

Çalışmada Varian Star model likit kromatografi cihazı kullanılmıştır. Bunun için izokratik çalışmalarda Varian 9001 model ve gradiyent çalışmalarda 9010 model pompa, Rheodyne model 7125 altı

yollu, 10 µl kapasiteli örnek tutma hücresi bulunan enjeksiyon valfi ve 280 nm'de çalıştırılan Varian 9050 model, dalga boyu ayarlanabilir UV-VIS dedektör ile bağlanmıştır. Çalışmada paslanmaz çelikten yapılmış, 15 cm x 4,6 mm (iç çap) boyutlarında, oda sıcaklığında çalışan, 5 µm partikül büyüklüğündeki oktadesil (C₁₈) grupları ile doldurulmuş kolon kullanılmıştır. Kolon, analizden önce en az 2 saat mobil faz ile kondisyonlanmıştır. Ayrıca analitik kolonun kullanım ömrünü uzatmak için hat üzerine 4 cm x 4,6 mm iç çap boyutlarında bir koruyucu kolon monte edilmiştir. Kromatografik sonuçlar Varian 4400 model integratör ile kaydedilmiştir.

2,4-D tayini için mobil faz seçimi: Araştırmanın başlangıcında izokratik pompa ile çalışılmış ve 3 ayrı mobil faz kullanılarak, HPLC'de standart çözeltilerde 2,4-D tayini yapılmıştır. Kullanılan mobil fazların bileşimleri şöyledir:

I. 0,001 M PO₄⁻³ ve 0,005 M hegzadesiltrimetilamonyumbromid (setrimit) içeren metanol: su (75:25, v/v) karışımı (ROSEBOOM ve ark., 1982)

II. Asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı (LARSON ve HOUGLUM, 1991)

III. Asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı

Çalışmaya daha sonra gradiyent pompa ile devam edilmiş ve aşağıda verilen gradiyent program kullanılmıştır:

	<u>t = 0. dak.</u>	<u>t = 3. dak.</u>	<u>t = 7. dak.</u>
Asetonitril	%40	%50	%50
%2 asetik asit	%60	%50	%50

Kullanılan mobil fazların pH değerleri Schott CG 840 model pH-metre ile ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada Kullanılan Mobil Fazlara Ait pH Değerleri

Mobil Faz	pH
Metanol: Su (0,001 M PO ₄ ⁻³ , 0,005 M Setrimit;75:25)	5,62
Asetonitril: % 2 asetik asit (75:25)	3,50
Asetonitril: % 2 asetik asit (50:50)	3,00
Asetonitril: % 2 asetik asit (gradiyent)	2,80-3,00

Kullanılan mobil faz karışımlarının 1,0 ve 1,5 ml/dak akış hızlarında 2,4-D tayinine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca 2,4-D analizlerinde en iyi sonuçların alındığı asetonitril : %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50, v/v) ile tekrar edilebilirlik denemeleri yapılmıştır.

Domates örneklerinde kalıntı 2,4-D miktarının belirlenmesi: Bu amaçla, SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından bitkisel

materyallerde GC yardımıyla 2,4-D tayini için önerilen yöntem önce hiçbir farklılık yapmadan olduğu gibi uygulanmış ancak örneklerde metilasyon yapılmamıştır. Daha sonra elde olunan sonuçlar incelenmiş ve bu konudaki diğer kaynaklar da gözönüne alınarak belirtilen yöntemde bazı değişiklikler gerçekleştirilmiştir.

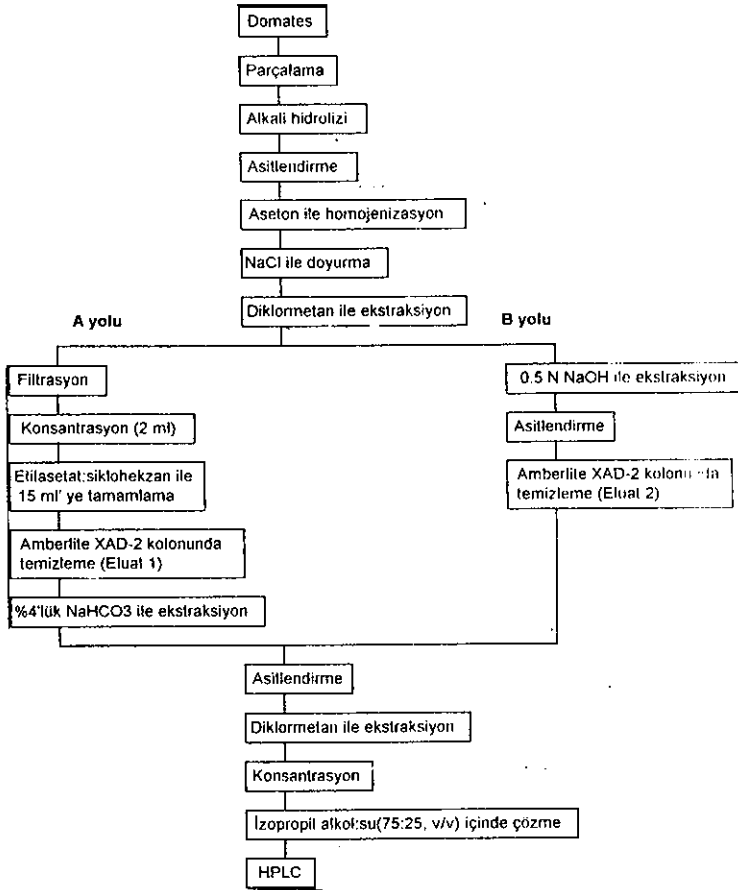
Önce parçalanmış domates örneklerine 0,0 (kontrol), 0,5 ve 4,0 mg/kg olacak şekilde 2,4-D ilave edildikten sonra SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından önerilen yöntem gereğince örnekler temizlenmiş, ardından esterifikasyon uygulanmadan HPLC yardımıyla 2,4-D tayini yapılmıştır. Bu yöntemde yapılan tüm değişiklikler ve yöntemin uygulanışı akım şeması halinde Şekil 2'de verilmiştir. SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından yeşil bitkilerde 2,4-D için 2,4-DME formunda gaz kromatografik olarak tayini yöntemi öncelikle doğrudan kullanılmış (Şekil 2'de A yolu) ancak örneklerde metilasyon uygulanmadan doğrudan 2,4-D'nin HPLC'de miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan akım şemasında bazı değişiklikler uygulanarak (B yolu) örneklerde 2,4-D'nin serbest asit formunda HPLC'de analizi yapılmıştır. B yolu ile çalışıldığında daha iyi sonuç alındığından domateste geri kazanma denemelerinde bu akım şemasına göre çalışılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bitkisel materyallerdeki 2,4-D kalıntı düzeyinin belirlenmesinde çoğunlukla GC kullanılmaktadır. Ancak 2,4-D ve diğer fenoksikarboksilik asitler gibi yüksek polariteye sahip bileşiklerin gaz kromatografik olarak analiz edilebilmeleri için mutlaka esterleştirilmeleri gerekmektedir. HPLC kullanıldığında ise bu bileşiklerin esterleştirme yapılmadan serbest asit formunda analizleri mümkündür. Aşağıda farklı mobil faz kombinasyonları ve akış hızlarının standart çözeltilerde, asit formunda 2,4-D tayinine etkileri verilmektedir.

İzokratik 0,001 M PO_4^{3-} ve 0,005 M setrimit içeren metanol:su (75:25, v/v) karışımının etkileri

Mobil faz olarak 0,001 M PO_4^{3-} ve 0,005 M setrimit içeren metanol:su (75:25,v/v) karışımı kullanıldığında yayvan biçimli 2,4-D pikleri elde edilmiştir. 0,5 ng/ μ l konsantrasyonunda pik gözlenmesine karşılık, 1 ng/ μ l'nin altında duyarlılığın düşük olduğu saptanmıştır. Tayin edilebilen en düşük 2,4-D miktarı yaklaşık 0,5 ng/ μ l 2,4-D olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. Domateslerde kalıntı 2,4-D tayini için kullanılan yöntemlerin akım şeması

saptanmıştır. Asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılarak 1,0 ve 1,5 ml/dak akış hızlarında elde edilen 2,4-D kromatogramları Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmiştir.

Denemelerde keskin ve iyi ayrılmış piklerin elde edilmesi, duyarlılığın yüksek olması yanında istatistiksel analiz sonuçları da bu mobil faz karışımının 2,4-D tayinindeki etkinliğini ortaya koymaktadır. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre 1,0 ve 1,5 ml/dak akış hızları için konsantrasyon ile pik yüksekliği arasındaki ilişki önemli bulunmuş ($p < 0,05$) ve korelasyon katsayısı yüksek çıkmıştır. Elde edilen 2,4-D standart eğrileri Şekil 5'de verilmiştir.

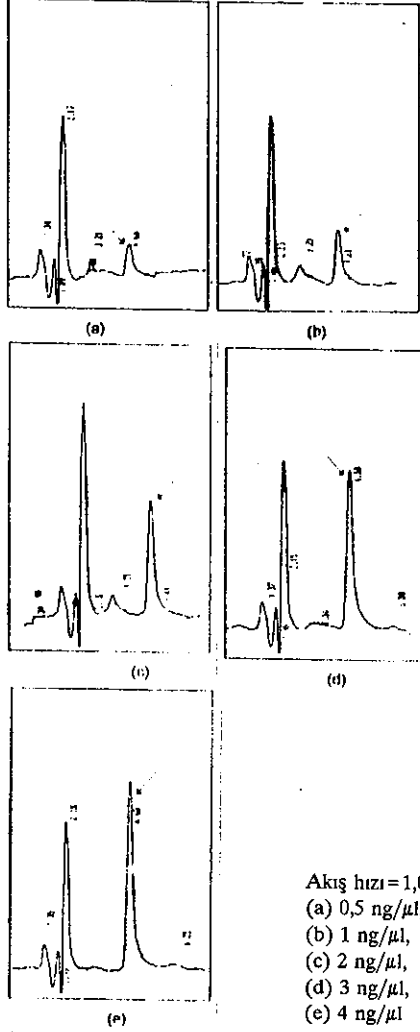
Asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanıldığında tekrar edilebilirlik düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla analizler yaklaşık bir ay ara ile tekrar edilmiştir. 1,0 ml/dak akış hızında tekrar edilebilirliğin yüksek olduğu saptanmıştır. Buna karşılık 1,5 ml/dak akış hızında ikinci kez yürütülen denemelerde 2,4-D'nin ayrılma düzeyinin oldukça düştüğü görülmüş ve 1 ng/ μ l 2,4-D içeren örnekler dışında ayrılmanın yeterli olmadığı saptanmıştır.

İzokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımının etkileri

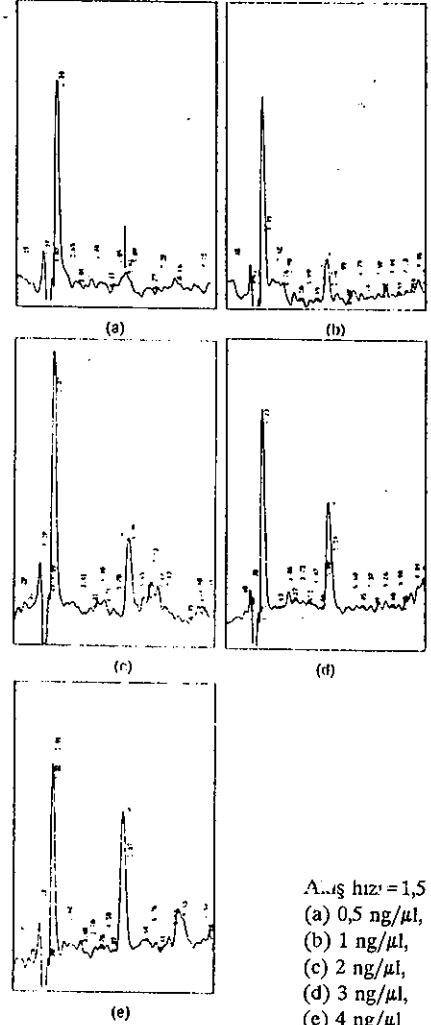
Asetonitril: %2 asetik asit içeren su (75:25, v/v) karışımı mobil faz olarak kullanıldığında keskin ve dik pikler elde edilmiştir. Ancak bu kez de 2,4-D pikinin diğer piklerden ayrılma derecesinin düşük olduğu ve 1 ng/ μ l'nin altında duyarlılığın düştüğü gözlenmiştir.

İzokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının etkileri

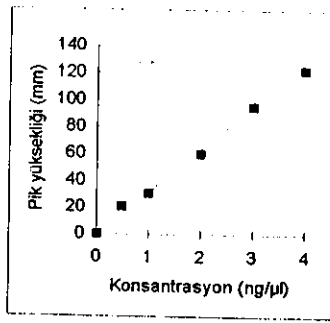
Pik şekli ve ayrılma derecesi açısından yürütülen ilk denemelerde asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımının mobil faz olarak kullanılmasıyla iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bu mobil faz karışımının kullanılması ile diğer karışımlara oranla duyarlılığın da yüksek olduğu görülmüştür. Bu mobil faz karışımı ile duyarlılığın 0,5 ng/ μ l'den daha düşük olduğu saptanmıştır. Akış hızının 1,5 ml/dak düzeyine çıkarılmasıyla, 1,0 ml/dak akış hızında görülemeyen bazı piklerin de bulunduğu



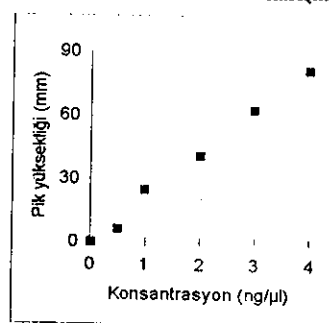
Şekil 3. 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: İzokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı.



Şekil 4. 2,4-D kromatogramları. Mobil faz: Gradyent asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı.



(a)



(b)

Şekil 5. 2,4-D kalibrasyon eğrisi. Mobil faz olarak izokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılmıştır. (a) Akış hızı = 1,0

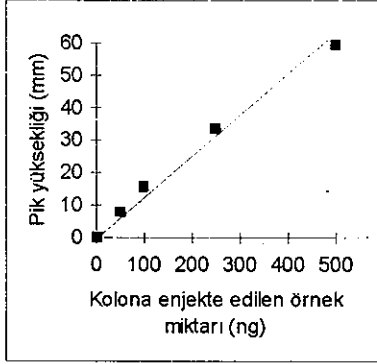
Gradyent asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımının etkileri

Zaman programı Bölüm 2.2.1'de verilen gradyent asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı kullanıldığında izokratik karışımlara oranla duyarlılığın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 0,5 ng/μl'lik 2,4-D piki izokratik karışımların çoğunda keskin ve dik bir şekilde gözlenemezken, gradyent karışım ile 0,5 ng/μl'lik 2,4-D pikinin de net

bir şekilde elde edildiği görülmüştür. Ancak çözeltideki 2,4-D miktarı arttıkça ayırma düzeyi olumsuz etkilenmiş ve piklerin netliği azalmıştır.

Bu çalışmada 2,4-D'nin serbest asit formunda HPLC ile analizinde pik şekli ve ayrılma düzeyi açısından en iyi sonuçlar 50:50 (v/v) oranındaki izokratik asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı ile elde edilmiştir. Ancak akış hızının 1,0 ml/dak'dan 1,5 ml/dak'ya çıkarılması, 2,4-D analizlerini olumsuz etkilemiştir.

2,4-D'nin domatesten % geri kazanma oranının belirlenmesi



Şekil 6. Kantitatif analizlerde kullanılan 2,4-D standart eğrisi ($r= 0,9996$, $p<0,05$)

Geri kazanma oranlarının belirlenebilmesi amacıyla, 2,4-D uygulanmadan yetiştirilen tarla domateslerine izin verilen ve daha yüksek dozlarda olmak üzere 2,4-D ilavesi yapılmıştır. Bunun için parçalanmış domates örneklerine 0,5 ve 4 mg/kg olacak şekilde 2,4-D ilave edilerek % geri kazanma oranları belirlenmiştir. 2,4-D ilave edilmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstraktın HPLC'de analizinde en iyi ayrılmış 2,4-D pikleri asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanıldığında elde edilmiştir. Bu nedenle kantitatif analizlerde mobil faz olarak asetonitril: %2 asetik asit içeren su (50:50, v/v) karışımı kullanılmıştır. 0,5 ve 4 mg/kg düzeylerinde 2,4-D ilave edilmiş domateslerden elde edilen ekstraktlar içindeki 2,4-D konsantrasyonunun 5-50 ng/ μ l aralığında olduğu saptanmıştır. Bu nedenle kantitatif analizlerde kullanılmak üzere 0-50 ng/ μ l konsantrasyon aralığında 2,4-D standart eğrisi hazırlanmıştır. Bu standart eğri Şekil 6'da verilmiştir.

Farklı düzeyde 2,4-D ilave edilen domateslerle yürütülen denemelerde 2,4-D'nin geri kazanma oranının da farklı olduğu gözlenmiştir. Denemelerde elde edilen % geri kazanma oranları Çizelge 2'de verilmiştir.

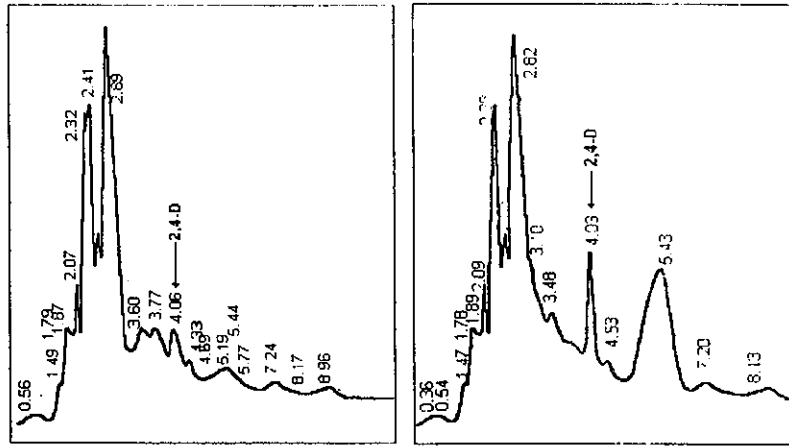
Çizelge 2'de de görüldüğü gibi domatese ilave edilen 2,4-D miktarı, başka bir deyişle domatesteki 2,4-D miktarı arttıkça geri kazanma oranında önemli düzeyde bir azalma olmakta ve yöntemin duyarlılığı düşmektedir.

Çizelge 2. Domateste farklı ilave düzeylerinde 2,4-D için elde edilen % geri kazanma oranları

İlave düzeyi (Mg/kg)	25 g örnekteki 2,4-D miktarı (ng)	Geri Kazanılan 2,4-D miktarı (ng)	Geri Kazanma (%)
0,5	12500	11324-11705	90,6-93,6
4	100500	62860-76646	62,85-74,65

B yolunda açıklanan yöntemle göre 0,5 ve 4 mg/kg ilave düzeyleri için elde edilen örnek kromatogramları sırasıyla Şekil 7'de verilmiştir.

Daha önce de belirttiği gibi turuncu meyveleri hariç, diğer taze meyve ve sebzelerde bulunabilecek maksimum 2,4-D miktarı birçok ülkede 0,2 mg/kg düzeyinde olduğundan temizleme yöntemlerinde başarılı olursa bile HPLC'nin analiz duyarlılığı bu çalışmalar için yeterli bulunmamıştır.



(a) 0,5 mg/kg, (b) 4 mg/kg. Mobil faz: 1,0 ml/dak akış hızındaki asetonitril: %2 asetik asit içeren su karışımı (50:50).

Şekil 7. Örnek kromatogramı

KAYNAKLAR

- AKERBLOM, M. and LINDGREN, B., 1983, Simultaneous determination of active ingredient and chlorophenol impurities in phenoxy acid herbicide formulations by high performance liquid chromatography with ultra-violet and electrochemical detection: *J. of Chrom.*, 258, 302-306.
- ALLANDER, W. J., 1989, Determination of chlorophenoxy herbicides in plant material exposed to spray drift: *J. Chrom. Sci.*, 27, 4, 193-196.
- ANONYMOUS, 1981, CRC Handbook of Pest Management in Agriculture, CRC Pres Inc., Vol.3, Pimentel BocaRaton, Florida
- ANONYMOUS, 1992, Ruhsatlı Zirai Mücadele İlaçları, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları., Bakanlık Basımevi, Ankara,s.43
- BRISTOL, D. W., NELSON, D. C. and COOK, L. W., 1981, Residues and dissipation of 2,4-D and 2,4-DCP in potato tubers: *American Potato J.*, 58, 144-151.
- BRISTOL, D. W., COOK, L. W., KOTERBA, M. T. and NELSON, D. C., 1982, Determination of free and hydrolyzable residues of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol in potatoes: *J. Agric. Food Chem.*, 30, 137-144.
- BRONDZ, I. and OLSEN, I., 1992, Intra-injector formation of methyl esters from phenoxy acid herbicides: *J. Chrom.*, 598, 309, 312.
- BURGAZ, S., 1982, Türkiye'de kullanılan dipidril grubu ve klorlu fenoksiasetik asit grubu herbisitlerin analitik toksikoloji açısından incelenmesi: A. Ü. Eczacılık Fak., Farmasötik Toksikoloji anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 13-14, 25, 33-35.
- CESSNA, A. J., 1980, Simultaneous extraction and detection of residues of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid and bromoxynil from wheat: *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1229-1232.
- CESSNA, A. J., 1990, The determination of residues of 2,4-D in post-emergence-treated triticale: *Pestic. Sci.*, 30, 141-147.
- COOK, L. W., ZACH, F. W., KLOSTERMAN, H. J. and BRISTOL, D. W., 1983, Comparison of free and total residues of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid and 2,4-dichlorophenol in millet resulting from postmergence and preharvest treatment: *J. Agric. Food Chem.*, 31, 268-271.
- EBING, W., RICHTARSKY, G., BOEK, K., EICHNER, M., KYPKE-HUTTER, K., FETTERROLL, B., OBERDIECK, R., GILSBACH, W., THI HANH, N., MANN, W., SPECHT, W., STIJVE, T. und WABELS, H., 1985 Zur Rückstandanalytik von Phenoxyalkansaure-Herbiciden in Getreidekörnern, *Lebensm. Chem., Gerichtl. Chem.*, 39, 126-130.
- ERNER, Y. and COGGINS, Jr., C. W., 1989, Free and bound residues of 2,4-D in "Marsh" grapefruit and "Washington" navel orange fruit: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114, 5, 846-850.
- FAYYAD, M., ALAWI, M. and EL-AHMAD, T., 1989, High-performance liquid chromatographic determination of phenoxyalkanoic acid herbicides using iron(II) 1,10-phenanthroline as a mobile phase additive: *J. Chrom.*, 481, 439-444.
- GILSBACH, W. und THIER, H.-P., 1982, Beiträge zur Rückstandanalyse von Chlorphenoxycarbonsäure-Herbiciden in Weizenmehl: *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 175, 327-332
- JENSEN, D. J. and GLAS, R. D., 1981, Analysis for residues of acidic herbicides: Analysis of Pesticide Residues, A Wiley-Interscience Publication, New York, 223-261.
- KLEMENT, J., POPL, M. and VOZNAKOVA, Z., 1988, Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil: Scientific Papers of the Prague Institute of Chemical Technology, H 22, 41-51.
- LARSON, R. D. and HOUGLUM, J. E., 1991, Liquid chromatography of pesticide formulations containing dicamba, 2,4-D, and MCPP: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 4, 679-681.
- LOKKE, H., 1975, Analysis of free and bound chlorophenoxy acids in cereals: *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 13, 6, 730-736.
- MEEMKEN, H.-A., RUDOLPH, R., und FÜRST, P., 1987, Nachweis und Bestimmung von Chlorphenoxycarbonsäuren durch Kapillar GC/MS: *D. Lebens.-Rundschau*, 83(8), 239-245
- MIERZWA, S., and WITEK, S., 1977, Gas-liquid chromatographic method with electron capture detection for the determination of residues of some phenoxyacetic acid herbicides in water as their 2,2,2-trichloroethyl esters: *J. Chrom.*, 136, 105-111.
- MOYE, H. A., 1981, High performance liquid chromatographic analysis of pesticide residues: Analysis of Pesticide Residues, A Wiley-Interscience Publication, New York, 157-197.
- MUNRO, H. E., 1972, Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in tomato plants and other commercial crops by microcoulometric gas chromatography: *Pest. Sci.*, 3, 371-377
- PIETRZYK, D. J. and CHU, C. H., 1977a, Separation of organic acids on Amberlite XAD copolymers by reversed phase high pressure liquid chromatography: *Anal. Chem.*, 49, 6, 860-867.
- PIETRZYK, D. J. and CHU, C. H., 1977b, Amberlite XAD copolymers in reversed phase gravity flow and high pressure liquid chromatography: *Anal. Chem.*, 49, 6, 757-763.
- POPOV, V. G., 1979, Determining picloram and 2,4-D in water and soil by gas-liquid chromatography: Third All-Union Conference on the analysis of Pesticide Residues-Summaries of papers., Moscow, 37-38.
- RENBORG, L., 1974, Ion exchange technique for the determination of chlorinated phenols and phenoxy acids in organic tissue, soil, and water: *Anal. Chem.*, 46, 3, 459-461.
- ROSEBOOM, H., HERBOLD, H. A. and BERKHOFF, C. J., 1982, Determination of phenoxy carboxylic acid pesticides by gas and liquid chromatography: *J. Chrom.*, 249, 323-331.
- SAMOILOV, L. N., POPOV, V. G. and CHEKRYGINA, G. N., 1979, Gas chromatographic determination of 2,4-D in plants in physiological and biochemical investigations: Third All-Union Conference on the Analysis of Pesticide Residues. Summaries of papers., Moscow, 36.
- SEKITA, H., TAKEDA, M., SAITO, Y. and UCHIYAMA, M., 1982, Studies on analysis of pesticide residues in foods. XXXVI. Analytical method for multi-residues of chlorinated-phenoxy agricultural chemicals (2,4-D, 2,4,5-T and 2,4,5-TP fenoprop) in fruits: *J. of Hygienic Chem.*, 28, 4, 219-227.

- SELL, C. R. and MAITLEN, J. C., 1983, Procedure for the determination of residues of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in dermal exposure pads, hand rinses, urine and perspiration from agricultural workers exposed to the herbicide: *J. Agric. Food Chem.*, 31, 572-575.
- SMITH, A. E. and HAYDEN, B. J., 1979, Method for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid residues in urine: *J. Chrom.*, 171, 482-485.
- SMITH, R. L. and PIETRZYK, D. J., 1983, LC enrichment, separation, and determination of chlorophenols and phenoxyacetic acids on PRP-1: *J. Chrom. Sci.*, 21, 282-287.
- SPECHT, W. and TILLKES, M., 1981, Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über Gel-chromatographie und Mini-kieselgel-säulen-chromatographie. 4. Mitteilung. Gas-chromatographische Bestimmung von 11 Herbiziden Phenoxyalkancarbonsäuren und ihren Estern in Pflanzenmaterial: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 307, 257-264.
- SPECHT, W. and TILLKES, M., 1985, Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über Gel-chromatographie und Mini-kieselgel-säulen-chromatographie. 5. Mitteilung. Methode zur Aufarbeitung von Lebensmitteln und Futtermitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft für die Multi-rückstandsbestimmung lipoid- und wasserlöslicher Pflanzenbehandlungsmittel: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322, 443-455.
- STEINWANDTER, H., 1989, Contributions to the analysis of chlorophenoxy acids. A simple method for the determination of five chlorophenoxyalkane carboxylic acids in cereals: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 334, 133-135.
- WALISZEWSKI, S. M. and WALISZEWSKI, K. N.; 1987, GC-determination of chlorophenoxy acetic herbicides (MCPA and 2,4-D) in water and soil. Reinvestigation of the technique: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 329, 489.
- WALISZEWSKI, S. M. and SZYMCZYNSKI, G. A., 1985, Modified method for the GC determination of chlorophenoxy acetic acid herbicides (MCPA and 2,4-D) in soil and water: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322, 510-511.
- WONG, Y. S., 1982, Gas-liquid chromatographic determination of 4-chloro-phenoxy acetic acid residues in mung bean sprouts: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65, 5, 1118-1121.
- YIP, G., 1971, Improved method for determination of chlorophenoxy acid residues in total diet samples: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54, 4, 966-969.