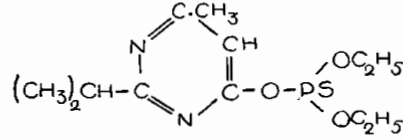


## D İ A Z İ N O N ' L A İ L Â Ç L A N M I Ş Z E Y T İ N L E R D E R E S İ D Ü T A Y İ N İ

**Dr. Ayten GÜVENER**  
Baş Asistan

Diazinon [ 0,0 - Diethyl 0 - ( 2 - isopropyl - 4 met-  
hlyl - p - pyridimidy l ) - Phosphorothioate ] terkinbinde bir  
insektisittir.



Saf halde renksiz, teknik halde kahverengi bir sıvıdır. Suda çok az, petrol eterinde çok çözünür. Alkol, aseton ve ksilen ile karışabilir. Alkali vasatta sebatlıdır, fakat su ve seyrettik asitlerle çabukça hidrolize olur. Akut oral letal doz, sıçan için 100-150 mg/kg. fare için 82 mg/kg. dır. Günde 20 mg/kg dan daha az dozlar sıçanlarda, 5-10 mg/kg. lık dozlar farelerde kumulatif bir tesir yapmazlar.

Memleketimizde zeytinler geniş çapta diazinon' la ilâçlanmaktadır. Toksik olması dolayısıyla insan sağlığı bakımından, ilâçlamadan sonra zeytinlerde kalan miktarın tespiti önemli görülerek diğer bazı fosforlu insektisitler gibi diazinon' un da ENZİMATİK METODLA tayin edilip edilemeyeceği araştırılmış ve yapılan çalışmalardan iyi neticeler alınmıştır.

Diazinon, asetik asit - hidrojen peroksit ile okside edilmiş ve insan kan plazmasındaki kolinesterazı kuvvetle inhibe ettiği görülmüştür. İnhibisyonun ölçülmesiyle de kantitatif olarak diazinon miktarı tayin edilmiştir. Metot 0,1-10 gamma arasında netice vermektedir.

### Luzumlu Malzeme :

- 1) 37°C ye ayarlanabilir ve sıcaklığı sabit kalabilen su banyosu.
- 2) 75°C ye ayarlanabilen su banyosu.

- 3) 120°C ye ayarlanabilen elektrikli ısıtıcı.
- 4) 200 cc lik ağız traşlı, dibi yuvarlak balonlar.
- 5) Balonlara uygun geri soğutucular.
- 6) 160 × 16 mm. lik ağız cam kapaklı tüpler ve ayrıca normal büyüklükte kapaksız tüpler,
- 7) 50 cc lik beherglaslar.
- 8) Soksle ekstraksiyon cihazları.
- 9) Küçük bir kromotografi kolonu.
- 10) Klett - Summerson photoelectric colorimetre'si ve 540 µm luk yeşil renkli flitre.

**Reaktifler:**

- 1) Cholinesteras menşei olarak kullanılan insan kanı, kan bankasından temin edilmiştir. İstendiği zaman şişeden bir enjektör yardımıyla steril olarak alınır ve buz dolabında aylarca bozulmadan saklanabilir.
- 2) Tampon çözelti: 3,3235 gr. Diethylbarbuturic acid 450 cc steril suyla karıştırılır. Çözünmeyi temin etmek için 18 cc 0,1 N sodium hydroxyd ilâve edilir, PH - metre ile PH sı ölçülür. PH 7,5 - 8 e ayarlanır.
- 3) Acetylcholin mahlülü: 100 mg. Acetylcholin, 138 cc steril destile suda çözülür, buz dolabında saklanır.
- 4) Acetic acid - peroxyd mahlülü: 1 kısım % 30 luk hidrojen peroxyd 5 kısım acetic acid'le kullanılacağı zaman karıştırılır.
- 5) Benzen.
- 6) Diazinon tip mahlülü: 1 cc de 10 gamma olacak şekilde benzende çözerek hazırlanır.
- 7) Parafin liquid.
- 8) Aktif kömür.
- 9) Sodium sulfate anhydrous.
- 10) Hydroxylaminhydrochlorid mahlülü % 20 lik. Buz dolabında saklanır.
- 11) Sodium hydroxyd mahlülü % 20 lik
- 12) FeCl<sub>3</sub> mahlülü: 10 gr. FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O yarı yarıya sulandırılmış 100 ml Hydrochloric asitte çözülür.
- 13) Kullanılacağı an % 20 lik sodium hydroxyd ve % 20 lik hydroxylaminhydrochlorid yarı yarıya karıştırılır.
- 14) Bir kısım tampon mahlül iki kısım su ile kullanılacağı zaman karıştırılır.

### **Numunenin Ekstraksiyonu:**

Çekirdeğinden ayrılmış zeytinlerden 10 gr. tartılır. Sokslet aparatında benzenle 4-5 saat ekstrakte edilir. Ekstrakt su ihtiva ederse S o d i u m s u l f a t ile kurutulur. S o d i u m s ü l f a t 'tan kantitatif olarak başka bir kaba aktardıktan sonra, b e n z e n su banyosunda 10-15 cc kalıncaya kadar destile edilir.

### **Ektraktın Temizlenmesi:**

İçersine aktif kömür doldurulmuş kromotografi kolonu önce b e n z e n le nemiendirilir, sonra da üç defa 20 şer cc b e n z e n 'le yıkanır. Böylece hazırlanmış kolondan ekstrakt, musluğu ayarlıyarak yavaşça geçirilir. Arkasından 3-4 defa 25 şer cc b e n z e n 'le yıkanır. Ekstrakt renksiz olarak elde edilir ve 200 cc lik dibi yuvarlak ağzı traşlı cam balona toplanır. İlâçlanmamış zeytin numunesi de aynı şekilde hazırlanmalıdır.

### **D i a z i n o n 'un oksidasyonu:**

Temizlenmiş ekstraktan b e n z e n , önce su banyosunda 3-5 cc kalıncaya kadar destile edilir. Kalamı ise vakumla çekilerek uzaklaştırılır. Nihayet birkaç damla renksiz yağlı bir sıvı elde edilmiş olur. Buna 10 cc b e n z e n ve 6 cc a c e t i c a c i d - h y d r o g e n p e r o x y d karışımı ilâve edilir, iyice karıştırılır. Geri soğutucu altında 75°C lik su banyosunda 20 dakika tutulur. Zaman bitince derhal buza batırılarak soğutulur ve soğutucudan ayrılır. Buradan cam kapaklı bir tüpe alınır, 20 cc saf su konarak çalkalanır. Su ve b e n z e n fazlarının ayrılması için bir müddet beklenir, sonra okside olmuş d i a z i n o n 'un bulunduğu b e n z e n fazından 8 cc alınarak 50 cc lik behere konur. İki damla p a r a f i n l i q u i d e ilâve edilir b e n z e n su banyosunda uçurulur ve a c e t i c a c i d kokusu duyulmayıncaya kadar sıcak banyoda tutulur. Su banyosundan alınır 10 ar cc destile su koyduktan sonra ağızları saat camıyla kapalı olarak 110°C lik ısıtıcıda 10 dakika bekletilir. Bu esnada suyun buharlaşmamasına dikkat etmelidir, buharlaşma olursa hacmi tekrar 10 cc ye getirilmelidir.

### **C h o l i n e s t e r a s e İ n h i b i s y o n u :**

Her numune ve her blank için ikişer tüp alınır. Bunlar su banyosuna girebilecek bir port tübe sıralanır. Tüpleri sıra ile 0, 1, 2, 3, 4, 5, ... numaralarla belirtirsek 0 numaralı iki tüp 3 er cc tampon mahlül, 1 numaralı iki tüp 2 şer cc kanlı tampon ve 1 cc kansız tampon 2, 3, 4, 5, ... numaralılar ise 2 şer cc kanlı tampon ve 1 er cc de III cü bölümde hazırlanmış olan numunelerden ihtiva eder. Böylece hazırlanan tüpler 37°C de 30 dakika tutulur, sonra 0 numaralı tüplere 3 er cc h y d r o x y l a m i n h y r o c h l o r i d - s o d i u m h y d r o x y d karışımından konur. Hemen akabinde kronometreyle takip ederek yarımşar dakika ara ile bütün tüplere 2 şer cc a c e t h y l c h o l i n ilâve edilir. A c e t h y l c h o l i n 'i koymaya başladığımızdan itibaren yarım saat daha banyoda tutulur, sonra yine aynı tüpten başlayarak 0 numaralı tüpler hariç olmak üzere her bir tüpe yarımşar dakikalık aralarla h y d r o x y l a m i n h y d r o c h l o r i d - s o d i u m h y d r o x y d karışımından

konur. Bu ameliye bitince tüpler banyodan alınır ve her bir tüpe 4 er cc  $FeCl_3$  mahlulü ve 2 şer cc su konup Klett tüplerine süzülür. Meydana gelen sarımtarak renk şiddeti Klett - Summerson photoelectric colorimeter'de 540  $\mu m$  luk flitre kullanılarak ölçülür.

Aletin sıfıra ayarlanması 3 cc tampon mahlül, 3 cc  $hydroxylaminhydrochlorid - sodium hydroxyd$  karışımı, 4 cc  $FeCl_3$  mahlulü ve 4 cc destile su ile hazırlanmış bir karışımla yapılır.

#### Standart Diazinon mahlülüyle eğrinin çizilmesi:

1 cc benzen'de 20 gamma diazinon bulunan mahlülden 10 cc alınır, 6 cc oksidasyon mahlulü ilâve ederek 20 dakika  $75^\circ C$  de geri soğutucu altında tutarak okside edilir. Soğutulup geri soğutucudan ayrıldıktan sonra muhteva balondan cam kapaklı tüpe aktarılır. Benzen tabakası durulduktan sonra 100 ; 50 ; 10 ; 5 ; 1 ; 0,5 gamma diazinon ihtiva eden miktarlar 50 cc lik beherlere konur ve lüzumlu miktar benzen ilâve ederek hepsinde benzenin 10 cc olması temin edilir, her behere üçer damla da parafin liquid konur. Benzen su banyosunda uçurular, ve acetic acid kokusu duyulmayıncaya kadar su banyosunda tutulur. Su banyosundan alındıktan sonra 10 ar cc saf su ilâve edilip  $110^\circ C$  de ağızları saat camıyla kapalı olarak ısıtılır. Sonra Cholinesterase inhibisyonu için yukarda bildirildiği şekilde hazırlanan tüplere 1 er cc yani 10 , 5 , 1 , 0,5 , 0,1 , 0,05 gamma konur. Yine yukarda bildirildiği şekilde  $37^\circ C$  de su banyosunda tutup reaktifleri konarak spektrocölorimetre'de okunacak hale getirilir. Her numune için iki tüp olduğu için okunanların ortalaması alınır. Bulunan değerler tablo halinde verilmiştir.

Tablo : I

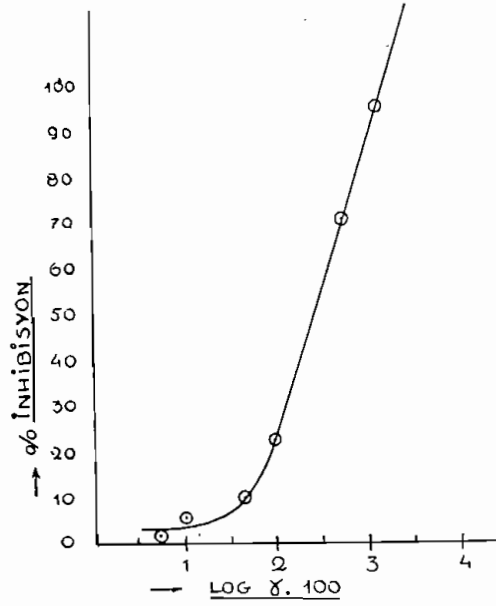
|       | İhtiva ettiği miktar | Okunan I | Okunan II | Ortalama | $\Delta$ | % Dekompozisyon | % İnhibisyon |
|-------|----------------------|----------|-----------|----------|----------|-----------------|--------------|
| Blank | Kansız tüpler        | 180      | 178       | 179      |          |                 |              |
| No: 0 | 0 gamma              | 117      | 119       | 118      | 61       | 34              |              |
| No: 1 | 10 gamma             | 178      | 177       | 177      | 2        | 1,1             | 97           |
| No: 2 | 5 gamma              | 166      | 160       | 163      | 16       | 9               | 73,5         |
| No: 3 | 1 gamma              | 130      | 134       | 132      | 47       | 26              | 23,5         |
| No: 4 | 0,5 gamma            | 126      | 124       | 125      | 54       | 30              | 10           |
| No: 5 | 0,1 gamma            | 122      | 121       | 122      | 57       | 32              | 5            |
| No: 6 | 0,05 gamma           | 120      | 118       | 119      | 60       | 33,5            | 1,5          |

$$\Delta = \text{Blank için okunan} - \text{Numune için okunan}$$

$$\% \text{ Dekompozisyon} = \frac{\Delta \times 100}{\text{Blank için okunan}}$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{\text{Numune için \% Dekompozisyon} \times 100}{\text{No: 0 için \% Dekompozisyon}}$$

Diazinon miktarlarının logaritmaları apsiste % inhibisyonlar ordinatta gösterilerek bilinen miktarlara tekabül eden noktalar bulunur ve eğri çizilir. Logaritmik çizginin düz gittiği muntika çalışılabilir en iyi sahadır. Eğrimiz tetkik edildiğinde 0,5-10 gamma arasında en iyi ölçme yapılabileceği görülür.



Diyagram bir kere çizildimi diğer bir defa diazinon miktar tayini yapılacaksa, bilinen bir miktar diazinon'u okside ettikten sonra aynı şekilde çalışarak buna tekabül eden % inhibisyon miktarını bulup diyagram üzerinde nokta işaretlenir. Bu noktadan geçmek üzere esas diyagrama paralel bir çizgi çizilir. Numuneler için bulduğumuz % inhibisyona tekabül eden değerler bu çizgi üzerinden okunur.

#### Numunelerin Hazırlanması Ve Alınan Neticefer:

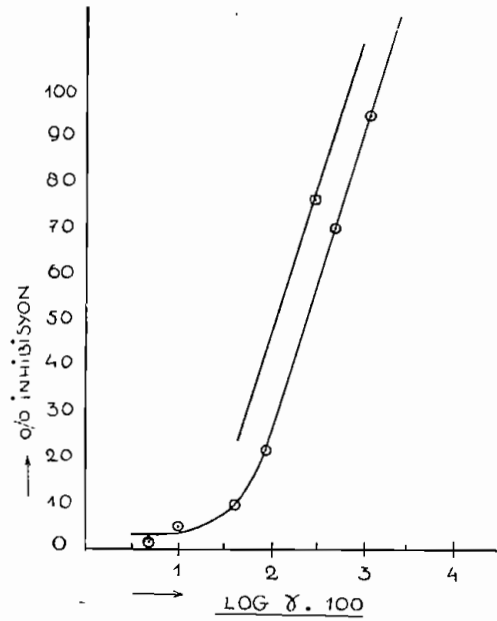
- 1) Çekirdeğinden ayrılmış 10 gr. zeytin benzen'le ekstrakte edilerek çalışıldı.
- 2) Çekirdeğinden ayrılmış 10 gr. zeytin benzen'le ekstrakte edilip ekstrakta 10 gamma diazinon ilâve edilerek çalışıldı. Muamele ve seyreltmelerden sonra 0,8 gamma bulmamamız icap ediyordu, 0,88 gamma bulundu.
- 3) 10 cc de 30 gamma diazinon ihtiva eden benzen solusyonundan 10 cc alınarak paralel çizgiyi çizmek için çalışıldı. Seyreltmelerden sonra 2,4 gamma alınmış oldu.

Bunlar için bulunan değerler tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo:2

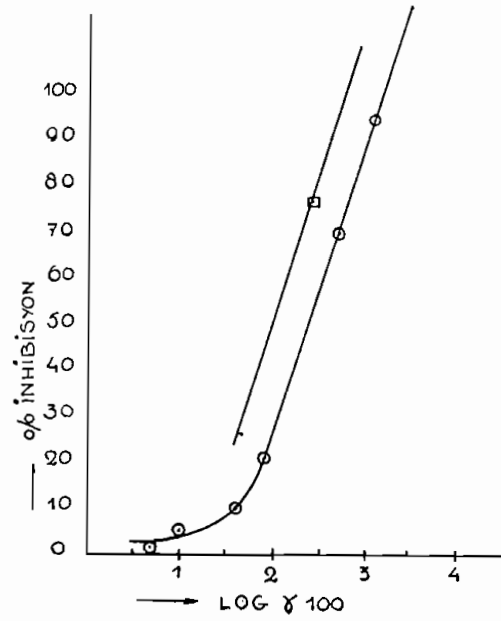
|       | Okunan I | Okunan II | Ortalama | $\Delta$ | % Dekompozisyon | % İnhibisyon |
|-------|----------|-----------|----------|----------|-----------------|--------------|
| Blank | 188      | 180       | 184      |          |                 |              |
| 0     | 106      | 105       | 105      | 79       | 43              |              |
| No: 1 | 120      | 116       | 118      | 66       | 36              | 16           |
| No: 2 | 155      | 155       | 155      | 29       | 16              | 63           |
| No: 3 | 168      | 165       | 167      | 17       | 9               | 79           |

Muamele edilmiş olan için bulunan % inhibisyondan muamele edilmemiş olan için bulunan çıkarılınca bizim ilâve ettiğimiz miktar diazinona tekabül eden % inhibisyon elde edilir. Fark  $63-16 = 47$  dir, bunun karşılığı diyagramdan 0,88 gamma okunur.



Diğer bir tecrübeye,

- 1) 10 gr. zeytin
- 2) 10 gr. zeytin + 5 gamma diazinon
- 3) 10 gr. zeytin + 10 gamma diazinon
- 4) 30 gamma diazinon ihtiva eden benzenli solusyon ile çalışıldı.



Bulunan değerler tablo 3 te gösterilmiştir.

Tablo : 3

|       | Okunan I | Okunan II | Ortalama | $\Delta$ | % Dekompozisyon | % İnhibisyon |
|-------|----------|-----------|----------|----------|-----------------|--------------|
| Blank | 186      | 186       | 186      |          |                 |              |
| 0     | 103      | 101       | 102      | 84       | 45              |              |
| No: 1 | 120      | 122       | 121      | 65       | 35              | 22           |
| No: 2 | 150      | 147       | 148      | 38       | 20,4            | 55           |
| No: 3 | 160      | 156       | 158      | 28       | 15              | 67           |
| No: 4 | 170      | 166       | 168      | 18       | 10              | 80           |

No: 2 de seyreltmelerden sonra 0,4 g a m m a bulmamız lâzım gelirken 0,56 g a m m a , No: 3 te 0,8 g a m m a bulmamız lâzım gelirken 0,79 g a m m a bulundu. Görülen ufak sapmaların tecrübe hatalarından ileri geldiği kabul edilebilir.

Netice:

- Enzimatik metotla diazinon tayini araştırılmış, tablo 1 den görüldüğü gibi asgari 0,05 gammalık miktarın cholinesterase'ı inhibe edici tesir gösterdiği 0,5-10 gamma arasında emniyetle tayin yapılabileceği tespit edilmiştir.

b) Bu metot zeytinlerde diazinon miktar tayini için kullanılmış ve iyi neticeler alınmıştır.

Metodun gelişmesinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Hopf'a teşekkür ederim.

## THE DETERMINATION OF RESIDUAL DIAZINON ON OLIVE FRUITS.

### (Summary):

The olive trees in Turkey are sprayed with diazinon emulsifiable concentrates (%20) against olive fly (*Dacus Olea*). Therefore the residue of the chemical on the olive fruits is considered important enough to be studied.

It was found that as small amounts as 0,05 gamma of the chemical can inhibit cholinesterase by the enzymatic method and reliable results can be obtained from the amounts of 0,5-10 gamma.

The content of olive fruits is extracted with benzene and the extract is passed through the active carbon column for cleaning. The benzene is first evaporated on the water-bath and then eliminated by vacuum distillation. Then the enzymatic method is applied. The results are shown on the table 1, 2, 3.

### Literatür:

- Bernhard. S. A. and L. E. Orgel, ... .. 1959. Mechanism of enzyme inhibition by phosphate esters. *Science*, 130, (3376): 625-626.
- Devlin T. M., ... .. 1959. Enzymatic methods in analytical chemistry. *Analyt. Chem.* 31, (6): 977-981.
- Hestrin S., ... .. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *Jour. Biol. Chem.* 180: 249-253.
- Patchett G. G. and G. H. Batchelder, 1959. Determination of trithion crop residues by cholinesterase inhibition measurement. *Jour. Econ. Entomology*. (in the press).
- Yip G. and J. W. Cook, ... .. 1959. Comparison of four cholinesterase methods of analysis for phosphate pesticides. *Jour. Ass. of Agric. Chem.* 42: 194-197.