

SEBZELERDE HEXACHLOROCYCLOHEXANE (BHC) BAKİYELERİ TAYİNİ

Ayten GÜVENER¹

Cânâ OTACI²

GİRİŞ

Memleketimizde, dünyanın birçok yerlerinde olduğu gibi BHC ihtiva eden ilâçlar kullanılmaktadır. Bilhassa hayvan yemlerinde kullanılması gerek doğrudan doğruya bunlarda ve gerekse bunlarla beslenen hayvanların et, yağ ve sütlerinde bakiye analizlerini icap ettirmektedir.

BHC'li ilâçların bakiye analizi için ilk kullanılan metod Schecter-Hornstein (1955) metodudur. Bunun esası hususi bir cihazda asitli ortamda benzene indirgenmesi ve nitrolandırdıktan sonra, renkli bileşiğinin elde edilerek kolorimetrik olarak tayinidir. Sonradan Pickard (1953), Pearce (1953) ve Wood (1960) bu metod üzerinde değişiklikler yapmışlardır. Bu suretle kullanılan cihaz daha basit hale getirilmiş ve devamlı tayinler yapılabilmektedir. San Antonio (1959) tarafından kullanılan kâğıt kromatografisi ise en hassas tayin şeklidir. Ancak lâboratuvarımız şartlarında bunun tatbiki mümkün olmamıştır. Diğer metodlar da tetkik edilmiş ve BHC bakiyeleri için en uygun metod seçilmiştir. Mevsim icabı ve fazla klorofil ihtiva etmesi dolayısıyla ıspanak alınmış ve anlatılan şekilde ön çalışmalar yapılarak bu metodun kendi şartlarımızda tatbik edileceği anlaşılmıştır.

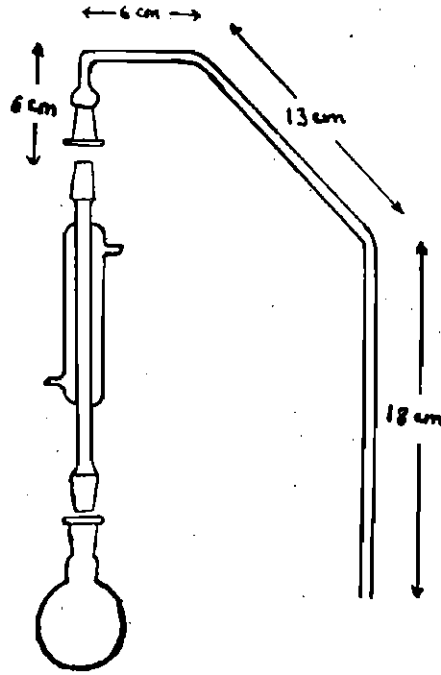
BHC'li ilâçların FDA tarafından kabul edilmiş olan toleransları, BHC olarak, meyve ve sebzelerde 5 ppm, Lindane olarak; yağda 0,1 ppm tahıl ve ette 2,5 ppm; meyve ve sebzelerde 10 ppm'dir.

MATERYAL VE METOD

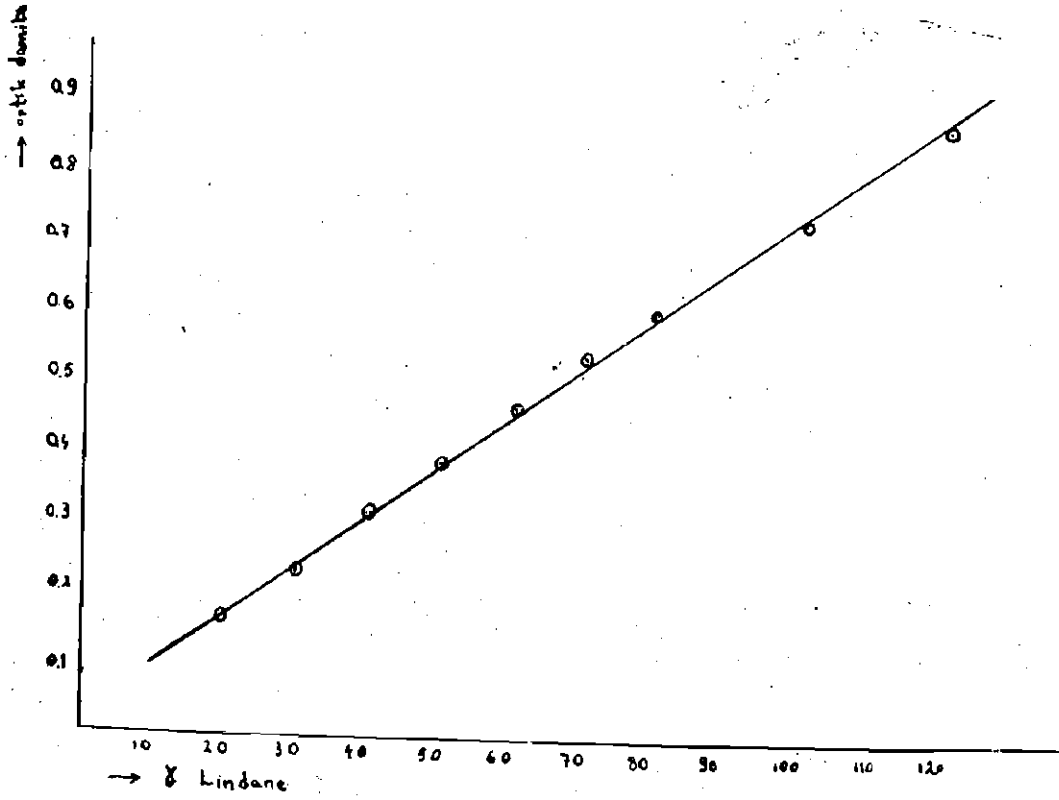
Wood'un (1960) gıda maddelerinde BHC tayini için verdiği metod bazı değişikliklerle tatbik edilmiştir. Bunun da esası Hornstein metoduna dayanmaktadır: BHC, asitli ortamda, çinko tozuyla benzene indirgenir, teşekkül eden benzen, vasatta bulundurulan Malonik asitten çıkan karbon dioksit vasıtasıyla nitrolama asidi içine sürüklenerek nitrobenzen haline geçer. Teşekkül eden nitrobenzen etil metil ketonda çözülür. Potasyum hidroksitle reaksiyona sokularak mavi renkli bileşik elde edilir ve bunun renginin optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak tayin edilir.

1 Zirai Mücadele İlâç ve Aletleri Enstitüsü Bakiye Analiz Lâb. Şefi - Ankara.

2 Göztepe Zirai Mücadele Enstitüsü Bakiye Analiz Lâb. Şefi — İstanbul



ŞEKİL 1 BHC bakiyeleri tayininde kullanılan cihaz



ŞEKİL 2 Gamma BHC standart eğrisi

a) Kullanılan reaktifler :

Asetik asit «glasial»

Malonik asit

Metalik çinko «toz»

Metilen klorür

Sodyum hidroksit çözeltisi : % 10 luk

Vazalin likit

Potasyum hidroksit çözeltisi : % 50 lik

Celite 545

Sülfirik asit «kesif»

Nitrit asit «kesif»

Sodyum sulfat «susuz»

Etil-Metil keton

n-Hekzan

Nitrolama asidi : Eşit hacimde sülfirik asit ve nitrik asit karışımı.

b) Kullanılan cihazlar :

Blendor

Şekil: 1 de gösterilen, açılı ve boyutları muayyen olan BHC bakiye tayin cihazı (Tarafımızdan yaptırılmıştır.)

Kromatografik kolonlar 2 x 30, 1 x 30 cm.

Ayarlı ısıtıcı ve kum banyosu

Ayırma hunileri 100 ml. lik

Kapaklı erlenler, mezurler, pipetler

Su banyosu

Spektrofotometre

ANALİZ METODU :

Bu maksatla % 99,9 safiyette olan Lindane'nin Asetik asit «glasial» deki çözeltisi kullanılmıştır.

Önce cihazın reaksiyon balonuna 2 gram Malonik asit ve 10 ml. glasial asetik asit konur ve ayarlı ısıtıcı üzerindeki kum banyosuna oturtularak (çıkış borusu takılmadan) ısıtmaya başlanır. Kaynama başladıktan sonra 45 dakika beklenir. Bu ameliye cihazın BHC artıklarından tamamen temizlenmesi için şarttır. Bu suretle temizlenmiş olan cihazın reaksiyon balonuna 2 mg Lindane'a tekabül edecek miktarda çözelti, pipetle hassas olarak konur. Asetik asitle 10 ml. ye tamamlanır ve tekrar 2 gram Malonik asit ve 1 gram çinko tozu konur. Çıkış borusu takılır ve 10 ml. nitrolama asidi konmuş mezurun içine mümkün olduğu kadar daldırılır. Kaynamaya başladıktan sonra bir buçuk saat ısıtmaya devam edilir. Bu safhada en fazla dikkat edilmesi gereken cihet karbon dioksit ile benzen sürüklenmesinin muntazam olmasıdır. Bu, nitrolama asidinden geçen habbelerin normal bir süratle çıkışından anlaşılır. Birbuçuk saat sonra ısıtma kesilir.

Nitrolama asidi ihtiva eden mezurun içindekiler çok dikkatle, 100 ml. lik ayırma hunisine alınır. Çıkış borusu ve mezur 2 defa 20 ml. lik buzda soğutulmuş destile suyla yıkanarak, yıkamalar yavaşça ayırma hunisine

ilâve edilir. Ayırma hunisine 20 ml. Metilen klorür konur ve iyice çalkalanır. Metilen klorür fazı bu ayırma hunisinde bırakılır. Sulu faz ikinci bir ayırma hunisine alınır ve tekrar 20 ml. Metilen klorür ile ekstrakte edilir. İki metilen klorür fazı birleştirilir. Ve 25 ml, % 10 luk gözeltiden hemen seyreltilerek yapılan % 2 lik sodyum hidroksit gözeltisiyle yıkanır. Metilen klorür, pamuk ve 5 gram Susuz sodyum sülfat ihtiva eden ufak kromatografi kolonundan süzülerek bir behere alınır. Ayırma hunileri 20 ve 10 ml. lik Metilen klorür ile yıkanır, aynı kolondan geçirilerek behere alınır. Cam boncuk ve birkaç damla vazelin likit konur; önce su banyosunda ısıtılarak, sonra vakumda çekilerek Metilen klorür tamamen uçurulur. Bakiye 100 ml. Etil -Metil ketonda çözülür. Bu suretle 1 ml. de 20 gamma Lindane'a tekabül eden nitro benzen gözeltisi elde edilmiş olur. Bu gözeltiden muayyen miktar nünuneler alınarak kapaklı erlenlere konur. Hepsi 10 ml. ye Etil -Metil Ketonla tamamlanır. Bunlara 1 er ml. % 50 lik potasyum hidroksit gözeltisi ilâve edilir. Üç dakika çok iyi çalkalanır, sekiz dakika karanlıkta bekletilir ve iki dakika içinde 1 cm. lik cell'lerde referans olarak Etil -Metil keton kullanılarak spektrofotometrede 570 m μ da renk dansite-leri okunur. Blank için aynı şekilde 10 ml. glasial asetik asitle çalışılır.

Konulan Lindane

Spektrofotometrede okunanlar

Konulan Lindane	Spektrofotometrede okunanlar
0 gamma	0.004
20 »	0.163
30 »	0.232
40 »	0.310
50 »	0.375
60 »	0.464
70 »	0.535
80 »	0.600
100 »	0.740
120 »	0.875

Buna göre çizilen standart eğri Şekil: 2 de gösterilmiştir.

ISPANAKLA YAPILAN ÇALIŞMALAR :

100 gram ispanak keskin bir bıçakla iyice kıyıldı. Blendora kondu, 300 ml. n-hekzan ilâve edildi, süratle bir dakika karıştırıldı. Bir gece bekletilerek fazların iyice ayrılması temin edildi. Altın sarısı renkte olan n-hekzan fazı ikiye bölündü; 1 inci kısım Clean-up (temizleme) ameliyelerine esas olmak üzere -blank olarak- ayrıldı. II ci kısma 100 ve sonra diğer tecrübelerde 71, 100, 70, 80 gamma Lindane ilâve edilerek ilâçlanmış mahsul gibi kullanıldı.

CLEAN-UP (TEMİZLEME) :

Her iki kısma da 40 ar ml. Sülfirik asit karışımı (kesif ve dumanlı) ilâve edildi: Yarıım saat bekletildi. Hekzan fazı alındı. Sulu faz 3 defa, 40 ar ml. lik n-hekzan ile ayırma hunisinde ekstrakte edilerek, ilk alınmış

olan n-hekzan fazına ilâve edildi. Blank ve nümunenin n-hekzan fazları ayrı ayrı aşağıda gösterilen şekilde hazırlanan kolondan geçirildi. Büyük kromatografi kolonuna önce biraz pamuk ve 5 gram Celite 545 kondu üzerine, bir beherde karıştırılarak hazırlanan 8 gr. Celite 545 ve 5 ml. sülfirik asit karışımı ilâve edildi. 1 cm; seviye teşkil edinceye kadar susuz sodyum sülfat kondu n-hekzanla kolon ıslatıldı. Blank geçirildikten sonra, beher ve kolon 3 defa 50 ml. lik kısımlarla yıkandı. Nümuneye de aynı şekilde hazırlanan kolondan geçirildi. Tamamen renksiz olan eluent'ler¹ beherde toplandı, cam boncuk ve bir kaç damla vazelin likit ilâve edildikten sonra su banyosunda n-hekzan uçuruldu. Bakıyeler 10 ml. glasiyal asetik asitle çözümlenerek standart eğrinin hazırlanmasında anlatıldığı şekilde çalışılarak teşekkül eden rengin dansitesi spektrofotometrede okundu.

ELDE EDİLEN NETİCELER :

Bu suretle «Clean-up» yapılan ıspanak nümunesi blank'ı 3 gamma Lindane'a tekabül eden bir sapma gösterdi ki bu metod'un hassasiyet sınırlarına girmektedir. Buna göre elde edilen recovery² aşağıda gösterilmiştir.

İlâve edilen	Bulunan	Recovery
—BHC	BHC	%
100 gamma	92 gamma (Blank çıkarıldıktan sonra)	92
71 »	61 »	86
100 »	93 »	93
70 »	65 »	90
80 »	76 »	95

SONUÇ

Elde edilen recovery'ler metodun tatbiki için iyi neticeler olarak kabul edilir, çünkü :

a) Metodda tavsiye edilen cihazın çıkış borusu «sintered glass filter» den yapılmasıdır. Bu, yaptırılan cihazda ufak delikler halinde yapılmıştır, bu suretle benzen çıkışı ve nitro benzen teşekkülü hassas olamamaktadır.

b) Etil-Metil ketonun uçurulması esnasında Polytetra fluoro ethylene «PTFE» ni ufak parçalar halinde kesilerek kullanılması tavsiye edilmekte ve kullanılmazsa Lindane kayıplarına sebep olacağı açıklanmaktadır. Bu, bulunmadığı için cam boncukla çalışılmıştır.

c) % 50 lik potasyum hidroksit ilâvesinden sonra kapaklı erlenin, reaksiyonun tam olması ve rengin tam teşekkülü için 3 dakika son süratle Shakerde karıştırılması icap etmektedir. Bu laboratuvarında olmadığı için elle çalkalanmıştır.

Uzun bir Clean-up'a ihtiyaç gösteren bir mahsulle bu neticelerin alınması metodun kendi laboratuvar şartlarımızda diğer sebze ve meyvelere de tatbik edilebileceğini ortaya koymuştur.

¹ Clean up kolonundan geçirilerek temizlenmiş, tayin edilecek maddeyi ihtiva eden çözücü.

² Geri kazanma

Ö Z E T

Çok kullanılan bir ziraî mücadele ilâcî olan BHC nin kendi şartlarımızda, fazla klorofil ihtiva eden bir mahsulde bakiye tayinleri yapılmış ve bazı lâboratuvar eksikliklerine göre değiştirilen metodun tatbiki iyi neticeler vermiştir.

S U M M A R Y

THE RESIDUE DETERMINATIONS OF BHC ON AND IN VEGETABLES

A modified Wood's methode is used in our laboratory conditions for determining BHC residues on and in spinach leaves and good results are obtained.

L İ T E R A T Ü R

- HORNSTEIN, I. (1955) Determination of Lindane in mushrooms. Agric and Fd Chem. **3**, 848.
- KLEIN, A.K. (1956) Report on BHC in foods. A.O.A.C. 39,700
- PICCARD, I, (1958) Res. Sta. long Ashton 93-95
- PHILLIPS, W. F. (1952) Colorimetric estimation of residua BHC. Analyt Chem **24**, 1976
- SAN ANTONÍO (1959). Demonstration of Lindane and Lindane metabolite in plats by paper chromatography. Agric. and Fd. Chem 6.322.
- SCHECHTER, M.S.; I. HORNSTEIN. (1962). Colorimetric determination of BHC. Analyt Chem **24**, 454
- PEARCE, S. (1953). Modification of the Schechter-Hornstein methode for determination of BHC. Ama. Che. Soc. Chicago 111. Sep.
- WOOD, R. (1960) The determination of BHC residues in foodstuffs. The Analyts **85**, 1006, 21