

## UHT VE PASTÖRİZE SÜTLERDE ORGANİK KLORLU PESTİSİTLERİN TAYİNİ

**Melis Karakaş, Hayri Coşkun\***

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş / Received: 21.05.2018; Kabul / Accepted: 25.07.2018; Online baskı / Published online: 14.09.2018

Karakaş, M., Coşkun, H. (2018). UHT ve pastörize sütlerde organik klorlu pestisitlerin tayini. GIDA (2018) 43 (5): 733-744 doi: 10.15237/gida. GD18058

Karakaş, M., Coşkun, H. (2018). Determination of organochlorine pesticides in UHT and pasteurized milk. GIDA (2018) 43 (5): 733-744 doi: 10.15237/gida. GD18058

### ÖZ

Bu çalışmada; ısıtılmış sütlerde organik klorlu pestisit tayin yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen yöntem ile piyasadan satın alınan UHT ve pastörize süt örneklerinde pestisit analizi yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada süt örneklerinde 18 organik klorlu pestisit bileşiğinin (aldrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, dieldrin,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, endosulfan - sulfat, endrin, endrin aldehit, endrin keton,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\theta$ -HCH, heptaklor, heptaklorepoksit, metoksiklor) tayini için süt ve süt yağına yönelik iki farklı ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Örnek hazırlama aşamasında bileşiklerin süt ve süt yağından ayrılması için sıvı/sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Örnekler GC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. Metodun güvenilirliğini göstermek için metot validasyonu yapılmıştır. Kantitatif analiz için iç standart olarak pentakloronitrobenzene bileşiği kullanılmıştır. Algılama sınırı her iki metot için 0.36 -1.11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aralığında elde edilmiştir. Bu değerler Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen en yüksek kabul edilebilir değerlerin altındadır. Elde edilen metotla 60 UHT ve 27 pastörize süt örneği analiz edilmiş fakat pestisit kalıntısına rastlanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** UHT ve Pastörize Süt, Kalıntı, Organik Klorlu Pestisit, GC-MS/MS

## DETERMINATION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN UHT AND PASTEURIZED MILK

### ABSTRACT

This study was carried out for developing methods for detecting pesticides in heat treated milks and for analysis of organo chlorinated pesticides in UHT and pasteurized milks. Two methods of extraction were performed from milk and from milk fat. Eighteen organochlorinated pesticides (aldrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, dieldrin,  $\alpha$ -endosulfane,  $\beta$ -endosulfane, endosulfan-sulphate, endrin, endrin aldehyde, endrin ketone,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\theta$ -HCH, heptachlor, heptachlorepoxyde, metoxychlor) were searched in the milk samples. Liquid/liquid extraction was used to separate the compounds from milk and milk fat. The samples were analyzed by GC-MS/MS. Method validation was performed in the study. Internal standard pentachloronitrobenzene was used to quantify the results. The limit of detection (LOD) of the methods was obtained between 0.36-1.11  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . These values were below the maximum residue levels of Turkish Food Codex. Sixty UHT and twenty seven pasteurized milk samples were analyzed, but no residues of the pesticides were detected.

**Keywords:** UHT and pasteurized milk, residue, organochlorine pesticides, GC-MS/MS

\*Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author

✉ coskunhayri@ibu.edu.tr

☎ (+90) 374 254 1000/ 4829

☎ (+90) 374 254 4558

## GİRİŞ

Pestisitler zararlı böcek ve bitkilerin yok edilmesi, uzaklaştırılması veya etkilerinin azaltılması için kullanılan madde ve madde karışımı olarak tanımlanırlar (Anonymous, 1999). Tarımsal ilaçlar kullanılmadığı takdirde tarımsal ürünlerin % 40 düzeyinde azalacağı ve bundan dolayı da tarımsal ilaçların kullanılmama gibi bir seçeneğinin olmadığı, asıl problemin pestisitlerin bilinçsizce kullanılmaları olduğu belirtilmektedir (Pala, 2018). Zirai mücadele amaçlı olarak kullanılan tarım ilaçları, çevre ve gıdalar aracılığı ile insan vücuduna alınmakta, kan, süt ve yağ dokusunda birikmekte ve uzun yarılanma ömürleri nedeniyle yaşam süresince vücutta kalarak ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadırlar. Diğer yandan sütteki pestisit kalıntıları süt ürünlerine geçerek insan sağlığı açısından daha tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedirler (Akyüz ve Bakırcı, 1991; Karakaya ve Boyraz, 1992). Pestisitler süte hayvanın ilaçlanması ya da hayvanın bulunduğu ahırın dezenfeksiyonu sırasında hayvanın solunum ve deri yoluyla ilacı alması, tarlaların ilaçlanması sırasında hayvanın ilaca maruz kalması; hayvanın yediği yemler ve su ile bulaşması, gerekli koruyucu önlemler alınmadan yapılan ilaçlamalar sonrasında süt kaplarının ve sağım ekipmanının pestisitlerle bulaşması şeklinde olabilmektedir (Kavas ve Kınık, 2002). Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi kapsamında çıkarılan çeşitli tebliğlerde pestisitlerin gıdalarda bulunmasına izin verilen MRL düzeyleri belirlenmiştir (Anonymous, 1997; Anonymous, 2004; Anonymous, 2007).

Pestisitler; kullanıldıkları zararlı grup, kimyasal yapı, toksisite, formülasyon şekli, kullanma tekniği, ilacın fiziki hali, etki şekli, zararlının biyolojik dönemi, kontrol ettiği zararlının bulunduğu yer gibi kriterlere göre sınıflandırılmaktadır (Öztürk, 1990). Organik klorlu pestisit grubunda bulunan bileşiklerin tamamı yapılarında karbon-klor bağları da dahil olmak üzere, karbon, klor, hidrojen ve oksijen bulundurmaları, siklik karbon halkasına sahip olmaları, suda çözünmemeleri fakat yağda iyi çözünmeleri gibi birçok ortak özellik taşırlar (Güvenç, 2008). Bu gruptaki pestisitler kimyasal açıdan diğer pestisit gruplarına göre çok daha dayanıklıdırlar ve çevredeki bu dayanıklılıkları

yıllarla ölçülüdür (Stefanelli vd., 2004). Ülkemizde organik klorlu pestisit kullanımı 1985 yılında tamamen yasaklanmıştır (Acara, 2006).

Pestisitlerin bitkisel ve hayvansal kökenli gıdalarda analizi için birden fazla metot geliştirilmiştir. Geçmişte aldrin, lindan, DDT ve izomerleri gibi bileşiklerin analizinde kolorimetrik ve kromatografik yöntemlerden faydalanılmıştır. Kromatografik yöntemler arasında kâğıt kromatografi, ince tabaka kromatografi ve gaz kromatografi (GC)-elektron yakalama detektörü (ECD) yer almaktadır. Bu bileşikler yapılarında klor içerdiklerinden dolayı GC-ECD ile oldukça duyarlı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak günümüzde GC-ECD'den çok daha fazla duyarlı, GC-MS/MS cihazları kullanılmaya başlamıştır. Süt gibi yağ içeren örneklerin analizinde ekstraksiyon için; asetonitril, heksan/aseton, aseton, petrol eteri, etil asetat, metilen klorid ve kloroform gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Süten süt yağının ekstraksiyonunda ise asetonitril ve petrol eterinden faydalanılmaktadır (Who, 1979; Güvenç, 2008).

Maitre vd. (1994), Arjantin'de 1988-1990 yılları arasında 120 pastörize süte pestisit varlığını tespit etmek amacıyla inceledikleri sütlerin %98'inde heptaklor ve türevlerine, 30 süt örneğinde  $\alpha$ -endosülfan ve  $\beta$ -endosülfan kalıntısına rastlamışlardır. Bulunan kalıntıların tolerans limitinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. İspanya'daki bir marketten alınan 97 adet % 3.2 yağ içeren süt örneklerinde organik klorlu pestisit kalıntısı üzerine bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada iki basamak saflaştırma işlemi uygulanmıştır. İlk saflaştırmada 4,4'-DDE, aldrin ve heptaklor bileşikleri için elüsyon çözücüsü olarak *n*-heksan, ikinci temizleme basamağında dieldrin, heptaklorepoksit, DDT ve izomerleri, HCH grubu ve klordan için ise elüsyon çözücüsü olarak *n*-heksan:metilenklorid (1:1) kullanılmıştır. Bakılan 97 süt örneğinin %1 - 95.5'inde aranan pestisitlerin kalıntısına rastlanılmış ve bazılarının MRL değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir (Martinez vd., 1997). Hindistan'da 1993-1996 yılları arasında farklı mevsimlerde toplanan 75 süt örneğinde aldrin,  $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$  HCH, DDT ve izomerleri, heptaklor ve izomerlerinin kalıntısına ve

mevsimler arasındaki kalıntı miktar dağılımına bakılmıştır. Çalışmanın sonunda, sonbahar mevsimindeki sütlerde daha fazla kalıntı miktarına rastlanmıştır. Analizi yapılan örneklerde yaz ve kış aylarında kalıntısına rastlanılan aldrinin, yaz, sonbahar, kış aylarında rastlanılan HCH ve toplam heptaklorun, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlen MRL (sırasıyla 0.15, 0.1 ve 0.15 µg/kg) değerinin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Jonh vd., 2001). Ciscato vd. (2002); Brezilya'da 94 pastörize süt ve 38 pastörize edilmemiş süt olmak üzere toplam 132 süt örneğinde organik klorlu pestisit, organik fosforlu pestisit, karbamat ve sentetik piretroid pestisit gruplarından 78 bileşik kalıntısına bakılmışlardır. Analiz sonuçlarına göre, pastörize olmayan 38 süt örneğinin % 10.2'sinde endosülfan, 94 pastörize süt örneğinin % 8.5'inde endosülfan, % 1.1'inde  $\alpha$ -HCH saptanmıştır. Kampire vd. (2011); Afrika'nın Kampala şehrindeki süpermarketlerden aldıkları 54 çiğ süt ve 47 pastörize süt örneklerinde aldrin, dieldrin, lindan,  $\alpha$ ,  $\beta$ -endosülfan, DDT ve izomerleri kalıntısına rastlanılmışlardır.

Ülkemizde Kahramanmaraş, Van ve Manisa illerinde anne sütü üzerinde yapılan çalışmalarda incelenen örneklerde pestisit kalıntısına rastlanılmıştır (Erdoğan vd., 2004; Çok vd., 1997). Keskin (2008), Ekim 2005-Aralık 2007 yılları arasında 41 farklı ilden gelen 124 çiğ süt örneğinde pestisit kalıntısına rastlanmıştır. Samsun'un çeşitli ilçelerinden toplanan 100 çiğ süt örneğinde aranılan pestisit kalıntısına rastlanılmamıştır (Güvenç, 2008). Ülkemizde 30 adet inek sütünde organik klorlu pestisitlerden DDT,  $\alpha$ -HCH, HCB ve aldrin, 29 adet inek sütünde organik fosforlu pestisitlerden ise triklorfon, malatyon, diazinonun kalıntı miktarı incelenmiş ve incelenen inek sütü örneklerinin hiçbirinde aranılan pestisitlerin kalıntısına rastlanılmamıştır (Anonymous, 2012).

Yukarıda özeti verilen çalışmalarda bakılan pestisit sayısı sınırlı düzeydedir. UHT sütlerde çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada UHT ve pastörize sütler için doğrudan süttten ve ayrıca süt yağından olmak üzere farklı ortamlardan sıvı/sıvı ekstraksiyon yöntemiyle pestisit analiz metodu geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemle de toplamda

87 UHT ve pastörize süt örneklerinde 18 farklı pestisit bileşeni yönünden analizi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar her gün içmekte olduğumuz sütlerin pestisit kalıntısı yönünden ne kadar risk taşıdığına ortaya konması bakımından önem taşımaktadır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada Gaz kromatografi-kütle spektrometresi olarak Thermo Electron Trace 2000 GC - Thermo Electron Polaris Q İyon Trap (Germany), azot altında buharlaştırma sistemi olarak Peak Scientific Inc. (Scotland) ve pestisit standart çözeltisi olarak 2000 mg/kg konsantrasyona sahip karışım kullanılmıştır (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany). Karışımın içerdiği pestisit bileşikleri;  $\alpha$  - HCH,  $\beta$  - HCH,  $\gamma$  - HCH (Lindan),  $\theta$  - HCH, Heptaklor, Aldrin, Heptaklorepoksit,  $\alpha$  - endosülfan, 4,4' DDE, Dieldrin, Endrin,  $\beta$ - Endosülfan, 4,4' DDD, Endrin aldehit, Endosülfan sülfat, 4,4' DDT, Endrin keton ve Metoksiklor olmak üzere toplam 18 kadardır. İç standart çözeltisi olarak ise 100 mg/kg konsantrasyon değerine sahip pentakloro nitrobenzen kullanılmıştır (Absolute Standarts Inc.,USA).

Çalışmada analizi yapılan pastörize ve UHT süt örnekleri Kocaeli ili Gebze ilçesindeki süpermarketlerden, Mart-Ağustos 2012 tarihleri arasında 5 farklı UHT süt ve 3 farklı pastörize süt markası olacak şekilde, her marka kendi içerisinde farklı partileri temsil edecek şekilde (Anonymous, 2012) satın alınmıştır. Her bir örneğin miktarı 1 L'dir. Pastörize süt örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve analiz yapılana kadar -18 °C'de, UHT süt örnekleri ise +4 °C'de saklanmıştır. Alınan süt örneği markaları büyük harflerle kodlanmıştır. Örneklerin kodları (A'dan H'ye) ve sayıları (kodun sağındaki rakam) şöyledir: UHT süt olarak A-12, B-12, C-12, D-12, E-12; pastörize sütlerden F-9, G-9 ve H-9. Böylece toplam 87 örnek analiz edilmiştir.

### Yöntem

Pestisitlerin ekstraksiyonunda iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Birinci yöntemde pestisitler doğrudan süttten, ikinci yöntemde ise pestisitler süt yağından ekstrakte edilmiştir. Her iki

yöntemde de ekstraksiyon metodu olarak sıvı/sıvı ekstraksiyonu kullanılmıştır. Çalışma boyunca süt örneklerindeki pestisit analizlerinde aynı Gaz Kromatografi ve Kütle Spektrofotometri (GC-MS/MS) kullanılmıştır. Sonuçların kantitatif olarak değerlendirilmesi için iç standart yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen metotların güvenilirliğini ispatlamak için her iki metodun metot validasyonu ve belirsizlik bütçesi hesaplanmıştır. Metotların geliştirilmesi için literatürde yapılan birçok çalışmadan faydalanılmıştır (Maitre vd., 1994; Mallatou vd., 1997; Martinez vd., 1997; Jonh vd., 2001; Ciscato vd., 2002; Ghidini vd., 2005; Lehotay, 2006; Ridgway vd., 2007; Paya vd., 2007; Weber vd., 2008; Anonymous, 2009; Kampire vd., 2011).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Standartların hazırlanması ve GC-MS/MS'de okunması

Bunun için 2000 mg kg<sup>-1</sup> konsantrasyonuna sahip 18 klorlu pestisit standart çözeltisi ve 100 mg/kg konsantrasyonuna sahip pentakloro nitrobenzen iç standart çözeltisinden 1 mg/kg konsantrasyonunda bir karışım hazırlanmış ve GC-MS/MS'de okuması yapılmıştır. Analizlerde iyon kaynağı, enjeksiyon ve ara bağlantı sıcaklık değerleri sırasıyla 230 °C, 280 °C ve 280 °C olmuştur. Taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta 1 mL/dk sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. Splitless enjeksiyon koşulunda, kütle spektrometre kısmında iyonlaştırma türü olarak EI (elektron etki iyonlaştırma) tekniği kullanılmıştır. GC kolonu olarak 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film kalınlığı HT-5 özelliklerine sahip kolon kullanılmıştır. GC kısmında kullanılan sıcaklık programı Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. GC sıcaklık programı

Table 1. Temperature program of GC

	Hız (°C/dk) Speed (°C/Min)	Sıcaklık (°C) Temperature (°C)	Bekleme Zamanı (dk) Holding time (Min)
Başlangıç Beginning	-	75	0
Birinci adım First step	8	190	2
İkinci adım Second step	6	250	3

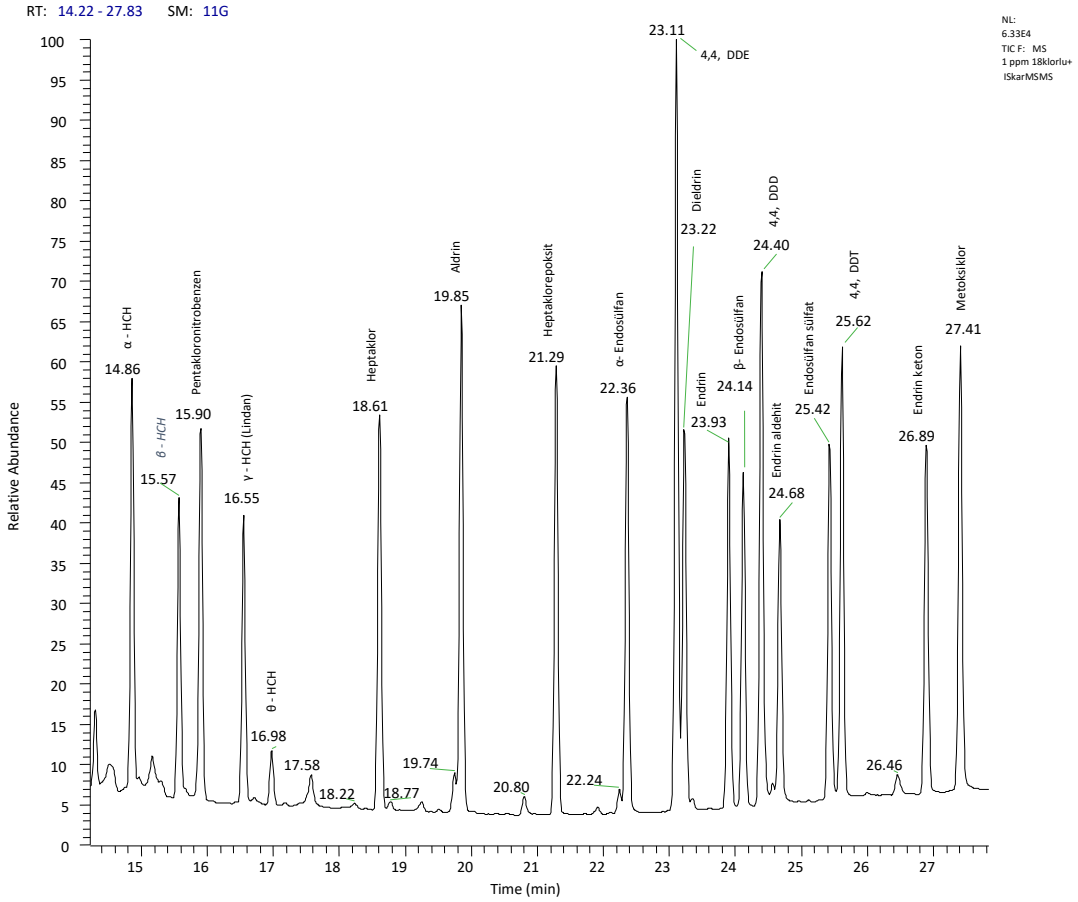
Bu yöntemle Şekil 1'deki kromatogramda görüldüğü gibi bileşiklere ait piklerin tam olarak

ayrılması sağlanabilmektedir. Bileşiklere ait alıkonma zamanları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan 18 organik klorlu pestisit ve iç standardın alıkonma zamanları

Table 2. Retention times of 18 chlorinated pesticides and inner standard used in the study

Bileşik Compound	Alıkonma Zamanı (dk) Retention time (Min)	Bileşik Compound	Alıkonma Zamanı (dk) Retention time (Min)
α - HCH	14.86	Dieldrin	23.22
β - HCH	15.57	Endrin	23.93
Pentakloronitrobenzen	15.90	β- Endosülfan	24.14
γ - HCH (Lindan)	16.55	4,4'-DDD	24.40
θ - HCH	16.98	Endrin aldehit	24.68
Heptaklor	18.61	Endosülfan sülfat	25.42
Aldrin	19.85	4,4' - DDT	25.62
Heptaklorepoksit	21.29	Endrin keton	26.89
α- Endosülfan	22.36	Metoksiklor	27.41
4,4'-DDE	23.11		



Şekil 1. Çalışmada kullanılan 18 klorlu pestisit standardının GS-MS/MS kromatogramı  
Figure 1. GS-MS/MS Chromatogram of 18 chlorinated pesticides standards used in the study

Metot oluşturulurken, belirlenmesi gereken diğer iki parametre de, MS kısmında iyonlaşma üzerinde etkili olan voltaj (V) ve izole edilmiş iyon ( $m/z$ ) değerleridir. Bu değerler göz önünde bulundurularak hedef analitlerin kantitatif ölçümü yapılmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 3'te verilmiştir.

MS kısmında bileşiklerin doğru bir şekilde kantitatif tayinlerinin yapılması için bileşiklere ait olan izole edilmiş ürün iyonlarının tam olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bunun için de molekül üzerine uygulanan voltaj önemli bir parametredir.

### Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması amacıyla çalışmada kullanılan pestisitlerin izin verilen maksimum kalıntı limit konsantrasyon değerleri

göz önünde bulundurularak 18 klorlu pestisit standart karışımı ve iç standart ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Standart olarak kullanılan 18 klorlu pestisit karışımı için 100 mg/kg konsantrasyonunda birinci ara stok çözeltisi ve bu çözelti kullanılarak 2 mg/kg konsantrasyonunda ikinci ara stok çözeltisi gravimetrik olarak hazırlanmıştır. İç standart olarak kullanılan ve 100 mg/kg konsantrasyonundaki iç standarttan ise 2 mg/kg konsantrasyonunda ara stok çözeltisi gravimetrik olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 2 mg/kg'lık ana bileşen ve iç standart stok çözeltileri kullanılarak 5 farklı konsantrasyon seviyesinde gravimetrik olarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde, ana bileşenlerin konsantrasyon değerleri her bir çözeltide farklı, iç standart çözeltisinin konsantrasyon değeri ise her bir

çözeltilerde ayırdır. Çözücü olarak asetonitril kullanılmıştır. Çizelge 4'te kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ve Çizelge 5'te kalibrasyon eğrisinden elde edilen

determinasyon katsayıları ( $R^2$ ) verilmiştir. Çizelge 5'de görüleceği üzere  $R^2$  değerleri 0.99'un üzerindedir.

Çizelge 3. MS/MS Metot Parametreleri

Table 3. Parameters of MS/MS method

Bileşik <i>Compound</i>	İzole edilmiş iyon ( $m/z$ ) <i>Isolated ion (<math>m/z</math>)</i>	MA ( $\text{g}/\text{mol}$ ) <i>MW (<math>\text{g}/\text{mol}</math>)</i>	Voltaj <i>Voltage (V)</i>
Aldrin	262.9	364.91	0.8
4,4'-DDD	235.1	320.04	2
4,4'-DDE	246.1	318.02	2
4,4'-DDT	235.1	354.49	0.8
Dieldrin	263.0	380.91	1.4
$\alpha$ - Endosülfan	241.0	406.95	2
$\beta$ - Endosülfan	243.0	406.93	2
Endosülfan sülfat	271.9	422.92	0.8
Endrin	243.0	380.91	2
Endrin aldehit	345.0	380.91	1.5
Endrin keton	316.9	346.46	2
$\alpha$ - HCH	181.0	290.83	2
$\beta$ - HCH	181.0	290.83	2
$\theta$ - HCH	181.0	290.83	2
$\gamma$ - HCH	181.0	290.83	2
Heptaklor	271.9	373.32	1
Heptaklorepoksit	253.0	389.32	2
Metoksiklor	227.2	345.65	1
Pentakloronitrobenzen	236.9	295.36	1

Çizelge 4. Kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )Table 4. Concentration values of calibration solutions ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Seviye <i>Level</i>	Ana bileşenler (18 klorlu pestisit) <i>Main compounds (18 chlorinated pesticides)</i>	İç standart <i>Inner standard</i>
A	50	250
B	100	250
C	250	250
D	500	250
E	750	250

#### Pestisitlerin süttten ekstraksiyon metodu

Oda sıcaklığına getirilen 20 g süt numunesi cam kavanoza koyulmuştur. Üzerine pestisit standart

çözeltisinden 105  $\mu\text{L}$  ve iç standart ekleme yönteminin uygulanması amacıyla 105  $\mu\text{L}$  iç standart çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra

kavanoza 60 mL petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü karışımı ilave edilip, numune beş dakika vortekse tabi tutulmuştur. Vorteks işleminden sonra numune ve çözücü karışımı 20 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Diğer tarafta, örnek içerisindeki suyu uzaklaştırmak için, 15 cm iç çapa sahip cam huniye önce bir miktar cam yünü ve üzerine 30 g susuz sodyum sülfat koyulmuştur. Sodyum sülfat, yapılacak işleme hazırlanması için 10 mL petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü karışımı ile ıslatılmıştır. Huninin altına 250 mL'lik buharlaştırma balonu yerleştirilmiş ve ultrasonik banyodan alınan numunenin üst kısmındaki petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü fazı cam huniye hazırlanmış olan sodyum sülfattan geçirilmiştir. Kalan süt numunesinin üzerine tekrar 30 mL petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü

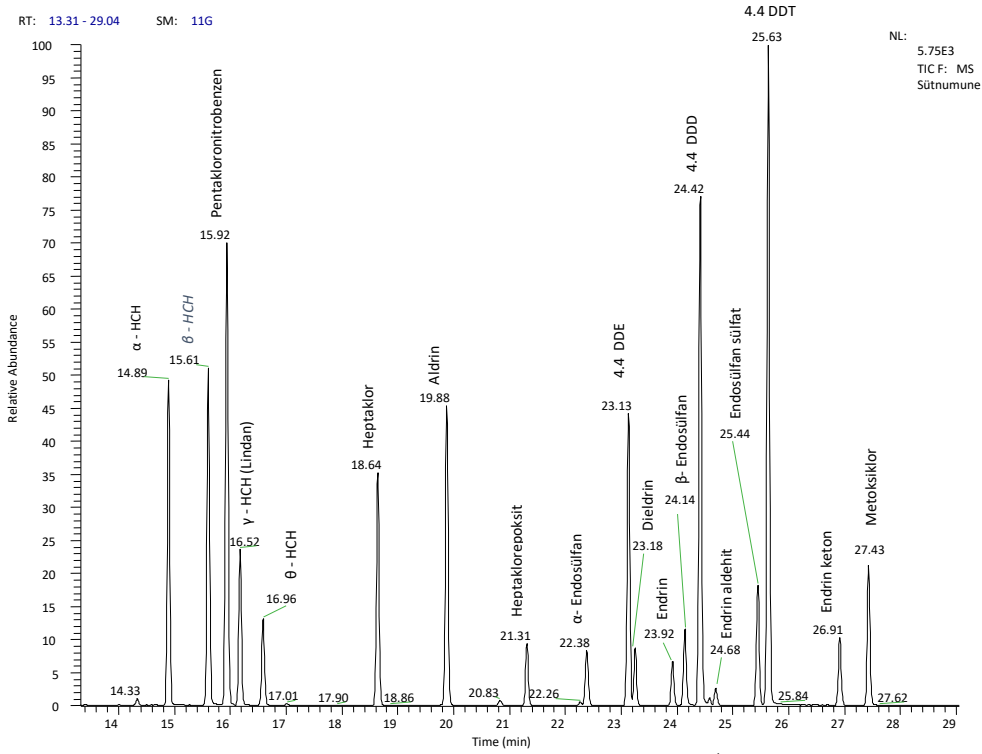
karışımı eklenerek ultrasonik banyoda 10 dakika daha bekletilmiş ve daha sonra yine üst faz alınarak sodyum sülfattan geçirilmiştir. Son olarak 10 mL petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü karışımı daha eklenmiş, kavanozun kapağı kapatılmış ve 1 dakikalık vorteksin ardından çözücü fazı sodyum sülfattan geçirilmiştir. Kalan kısmın tamamı cam huniye aktarılmış ve numune şişesi üç defa 5 mL petroleteri:etilasetat (3:2) ile yıkanarak huniye ilave edilmiştir. Çözücü karışımı ve numune huniden iyice süzildikten sonra, süzüntü döner buharlaştırıcıda 1 mL'den daha az kalana kadar buharlaştırılmıştır. Döner buharlaştırıcıdan alınan balon petroleteri:etilasetat (3:2) çözücü karışımı ile iyice yıkanarak 10 mL'lik şişelere alınmıştır. Daha sonra karışımın miktarı azot altında 3 g'a indirilmiştir.

Çizelge 5. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen R<sup>2</sup> değerleriTable 5. R<sup>2</sup> values obtained from calibration curve

Bileşik <i>Compound</i>	R <sup>2</sup>	Bileşik <i>Compound</i>	R <sup>2</sup>
α - HCH	0.9986	Dieldrin	0.9952
β - HCH	0.9984	Endrin	0.9982
γ - HCH (Lindan)	0.9982	β- Endosülfan	0.9967
θ - HCH	0.9983	4,4'-DDD	0.9983
Heptaklor	0.9972	Endrin aldehit	0.9985
Aldrin	0.9987	Endosülfan sülfat	0.9981
Heptaklorepoksit	0.9974	4,4'-DDT	0.9991
α - Endosülfan	0.9991	Endrin keton	0.9980
4,4'-DDE	0.9983	Metoksiklor	0.9969

Elde edilen ekstraktın safsızlıklarından arındırılması için 30 cm boy ve 1.5 cm iç çapa sahip olan cam kolon içine öncelikle bir miktar cam yünü koyulmuştur. Daha sonra 8 g florisil (675 °C de aktive edilmiş) ve 2 g susuz sodyum sülfat eklenmiştir. Kolonun şartlandırılması için 20 mL *n*-hekzan kullanılmıştır. Kolon kurumasına izin verilmeden, 3 g ekstrakt kolona yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra ekstraktın bulunduğu cam şişe iki defa 3 mL *n*-hekzan ile yıkanarak kolona aktarılmıştır. Elüsyon işlemi için 50 mL *n*-

hekzan kullanılmıştır. Buharlaştırma balonunda toplanan karışıma tutucu olarak 100 µL izooktan ilave edilmiş ve karışımın çözücüsü 1 mL'den daha az kalana kadar buharlaştırılmıştır. Döner buharlaştırıcıdan alınan balon *n*-hekzan ile yıkanarak 10 mL'lik cam şişelere alınmıştır. Numunenin son miktarı azot altında 500 mg'a indirilip 0.2 µm'lik PTFE filtreden geçirilerek 1.5 mL'lik GC şişesine aktarılmış ve GC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Bu metoda ait GC-MS/MS kromatogramı Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Pestisitlerin süttten ekstraksiyonunun GC-MS/MS kromatogramı  
 Figure 2. GC-MS/MS chromatogram of pesticides extraction from milk

### Pestisitlerin süt yağından ekstraksiyon metodu

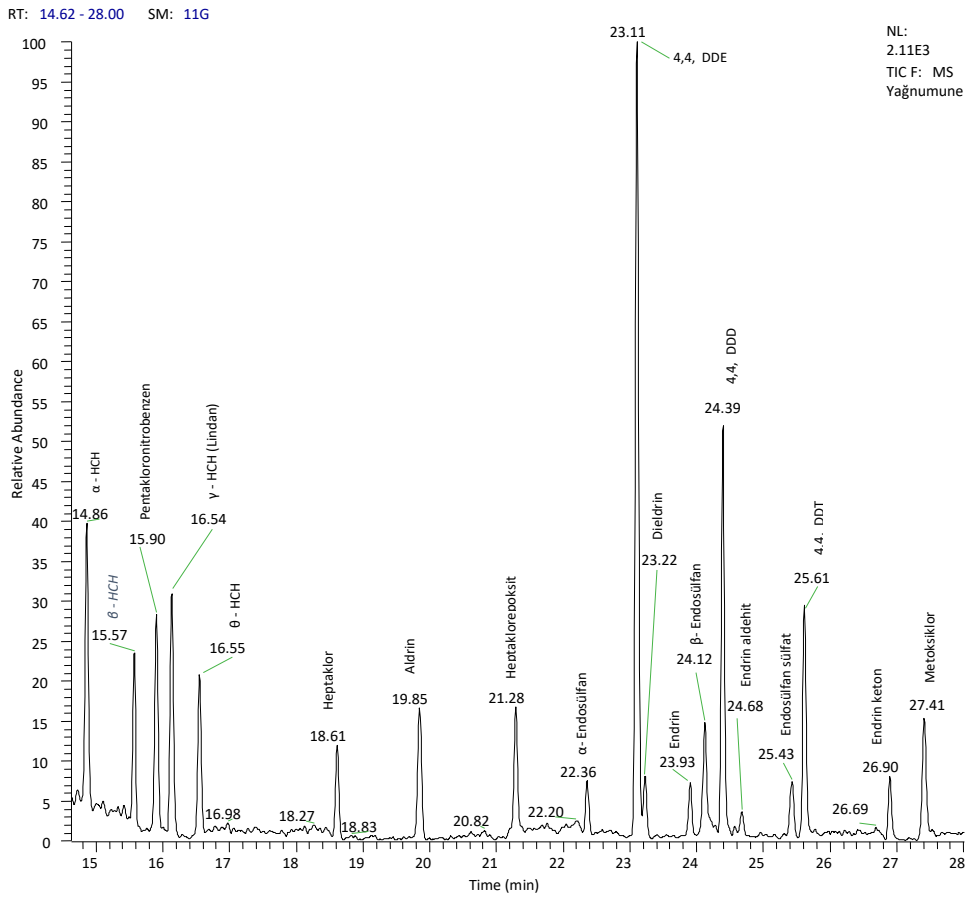
Oda sıcaklığına getirilen 200 g süt numunesi 1000 mL'lik ayırma hunisine koyulmuştur. İçerisine önce pestisit standart çözeltisinden 105 µL ve 105 µL iç standart çözeltisi, sonra süttü yağın ayrılmasına hazırlamak için 200 mL aseton eklenmiştir. Daha sonra ayırma hunisi içerisindeki karışım 10 dakika süre ile disperser örnek parçalayıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Sonra 200 mL petrol eteri eklenerek ayırma hunisi 10 dk boyunca elde çalkalanmıştır. Yaklaşık 15-20 dk içerisinde ayırma hunisinde iki faz oluşmak üzere ayırım gerçekleşmiştir. Karışımındaki asetonun uzaklaştırılması için ayırma hunisine yavaş yavaş 200 mL saf su eklenmiş, 5dk karıştırılmış ve yine faz ayırımının oluşması için beklenmiştir. Bu durumda ayırma hunisinde üç faz oluşmuştur. Faz ayırımının daha net gözlenmesi için yaklaşık 50 mL etilalkol kullanılmıştır. Ayırma hunisinin altında toplanan saf su ve aseton fazı daha sonra içerisine 100 mL petroleteri ilave edilip sıvı sıvı ekstraksiyon adımlarının tekrar edilmesi için bir

behere toplanmıştır. Ayırma hunisinin üstünde oluşan içerisinde yağ ve petrol eteri olan faz ise polipropilen santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de, 20°C sıcaklıkta 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz 500 mL'lik buharlaştırma balonuna aktarılmıştır. Diğer tarafta, örnek içerisinde kalan eser miktardaki suyu uzaklaştırmak için, 15 cm iç çapa sahip cam huniye önce bir miktar cam yünü ve üzerine 30 g susuz sodyum sülfat konulmuştur. Santrifüj sonrası 500 mL'lik buharlaştırma balona alınan petrol eteri ve süt yağı karışımı sodyum sülfattan geçirilerek 250 mL'lik buharlaştırma balonunda toplanmıştır. Daha sonra balonda toplanan karışımındaki çözücü döner buharlaştırıcıda 5 mL kalana kadar buharlaştırılmıştır. Buharlandırmadan sonra balonda kalan yağ 10 mL'lik cam şişeye alınmış ve balon yaklaşık 2 mL petrol eteri ile yıkanmıştır. Daha sonra şişede toplanan yağdaki çözücü azot altında buharlaştırılmıştır. Kalan yağ numunesinin 0.5 g'ı 250 mL'lik buharlaştırma balonuna alınmış, üzerine 15 g sodyum sülfat ve 100 mL petroleteri eklenmiş, buharlaştırma



balonunun ağzı bir kapak yardımıyla kapatılarak 5 dk boyunca karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda çözücü karışımı süzgeç kâğıdından süzülerek başka bir 250 mL'lik buharlaştırma balonuna toplanmış ve örnek içerisindeki çözücü döner buharlaştırıcı ile örnek miktarı 1 mL kalana kadar buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma sonrası balonda kalan numune en az 5 mL petroleteri ile yıkanarak cam şişelere alınmış ve daha sonra azot altında son miktar 1 g olarak ayarlanmış ve bu kısma saflaştırma işlemi uygulanmıştır.

Elde edilen ekstraktın safsızlıklarından arındırılması, pestisitlerin süttan ekstraksiyon metodunda olduğu gibi yapılmıştır. Farklı olarak 10 g florisil kullanılmış, kolonun kurumasına izin verilmeden 1 g ekstrakt kolona yüklenmiştir. Ayrıca, elüsyon işlemi için 80 mL *n*-hekzan kullanılmıştır. Bu metoda ait GC-MS/MS kromatogramı Şekil3'de verilmiştir.



Şekil 3. Pestisitlerin süt yağından ekstraksiyonunun GC-MS/MS kromatogramı  
Figure 3. GC-MS/MS chromatogram of pesticides extraction from milk fat

### Sütte ve süt yağında pestisit tayini metot validasyonları

Sütte 18 klorlu pestisit bileşiklerinin tayinine ilişkin metot geliştirme aşaması tamamlandıktan sonra, iki farklı analiz metodu geliştirildiği için iki metot validasyon işlemi Anonymous (2009)'a göre

yapılmıştır. İkinci metotta validasyon parametrelerinden biri olan doğrusal aralık ve çalışma aralığı birinci metotta olduğu gibi incelenmiştir. Fakat algılama sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), doğruluk ve tekrarlanabilirlik

parametreleri için ayrı deneysel çalışmalar yapılmıştır.

Organik klorlu pestisitlerin birçoğunda yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Çalışmada, pestisitlerin süttten ekstraksiyonu ile elde edilen geri kazanım değerleri % 83.3- 102.0 arasında değişirken, pestisitlerin yağdan ekstraksiyonu ile elde edilen geri kazanım değerleri % 67 - 86 arasında bulunmuştur. Pestisitlerin süttten ekstraksiyonu ile elde edilen LOD değerleri 0.36 - 0.56 µg kg<sup>-1</sup> arasında ve LOQ değerleri 1.13-1.86 µg/kg arasında değişim gösterirken, pestisitlerin yağdan ekstraksiyonu ile elde edilen LOD değerleri 0.72 - 1.11 µg/kg arasında, LOQ değerleri 2.00-2.95 µg/kg arasında değişim göstermiştir. Bu çalışmada aranılan pestisitlerin her birinden elde edilen LOQ değerlerinin, Türk Gıda Kodeksinde belirtilen MRL (maksimum kalıntı limiti) değerlerinin altında olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle yöntem kullanılabilirlik açısından olumlu bulunmuştur.

Yönteme ilişkin ayrıca belirsizlik hesaplamaları da yapılmıştır. Belirsizlik kaynakları, kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere hazırlanan ana ve iç olmak üzere iki stok çözelti, metot uygulamasının başında örneğe iç standardın eklenmesi, örneğin tartımı, örneğin son miktarının ayarlanması, kalibrasyon grafiği, geri kazanım ve tekrarlanabilirliktir. Tüm bunların hesaplanmasında Anonymous (2009)'den faydalanılmıştır. Yapılan çalışmada iki farklı metot geliştirilmiştir, fakat belirsizlik hesabı geliştirilen iki metot için de aynı adımları içermektedir. Belirsizlik değeri ölçüm sonucu ± genişletilmiş belirsizlik % 95 güven aralığında ve k=2 şeklinde raporlanmıştır.

#### **Piyasadan alınan UHT ve pastörize süt örneklerinde pestisit analizleri**

Bu çalışma kapsamında satın alınan 60 adet UHT süt ve 27 adet pastörize süt örnekleri üzerinde yapılan analizler neticesinde, aranılan 18 organik klorlu pestisit bileşiklerinin hiç birine rastlanılmamıştır. Çalışma kapsamında analiz edilen 87 adet süt örneğinde organik klorlu pestisit bulunamayışı sevindirici bir durumdur. Benzer sonuçlar Keskin (2008), Güvenç (2008) ve Anonymous (2012) tarafından da ortaya

konmuştur. Çalışmada analiz edilen UHT ve pastörize sütlerde aranılan organik klorlu pestisitlerin kalıntılarında rastlanılmamasının en önemli sebebi bu bileşiklerin kullanımının ülkemizde yıllar önce yasaklanmış olması gösterilebilir. Ayrıca sütlere uygulanan ısı işlemlerin kalıntı düzeylerinde azalmalara neden olduğu söylenebilir (Karakaya ve Boyraz, 1992). Daha genel sonuçlara ulaşılması için, belli bölgelerde, bir laktasyon süresi boyunca her ay örnek alınarak hammaddeden son ürüne kadar analizler yapılarak çalışmalar tekrarlanabilir.

Sonuç olarak, UHT ve pastörize süt örnekleri kullanılarak iki farklı ekstraksiyon metodu geliştirilmiş ve organik klorlu pestisitlerin tespiti için GC-MS/MS kullanılmıştır. Geliştirilen metotların validasyonu yapılmış ve belirsizlik bütçesi hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda, organik klorlu pestisitler yönünden yöntemin duyarlılığının, doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğu görülmüştür. Dolayısıyla çalışmada kullanılan her bir yöntemin güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. İlaveten, çalışmada analizi yapılan 60 UHT ve 27 pastörize süt örneklerinde aranılan pestisitlerin kalıntısına rastlanılmaması insan sağlığı açısından olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu türden çalışmaların tüm laktasyon periyodunu kapsayacak şekilde hammaddeden son ürüne kadar genişletilmesi önerilmektedir.

#### **TEŞEKKÜR**

Laboratuvar çalışmaları sırasında verdikleri tüm desteklerden ötürü TÜBİTAK UME'ye ve yetkililerine, verilerin değerlendirilmesi sırasında bilgisini ve yardımını esirgemeyen TÜBİTAK UME Kimya Grubu araştırmacılarından Sayın Burcu BİNİCİ'ye teşekkür ederiz.

#### **KAYNAKLAR**

Acara, A. (2006). Türkiye'nin kalıcı organik kirletici maddelere (POP'ler) ilişkin Stockholm sözleşmesi için taslak ulusal uygulama planı. Unido-POP'ler Projesi. Proje No. GF/TUR/03/008, 237s.

Akyüz, N., Bakırcı, İ. (1991). Pestisitlerin gıda zincirine girişi, I. Uluslararası Çevre Koruma

- Sempozyumu, 8-8 Haziran 1991, İzmir, Türkiye, vol.2: 254-265.
- Anonymous (1979). Environmental health criteria 9: DDT and its derivatives. World Health Organization, Geneva.
- Anonymous (1997). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Pestisit Kalıntı Limitleri. 16 Kasım 1997 tarih ve 23172 sayılı T.C. Resmi Gazete, Ankara.
- Anonymous (1999). US EPA (United States Environmental Protection Agency), Summary of OPP reduced- risk pesticides initavite., 2 pp.
- Anonymous (2004). Türkiye Çevre Atlası. T. C. Çevre ve Orman Bakanlığı. Erişim: <http://www2.cedgm.gov.tr/dosya/cevreatlasi.htm>. Erişim Tarihi: 15.09.2012.
- Anonymous (2007). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2007/17. 9 Mart 2007 tarih ve 26457 sayılı T.C. Resmi Gazete, Ankara.
- Anonymous (2009). Tübitak UME, Kimyasal Ölçümlerde Metot Validasyonu ve Belirsizlik Hesaplamaları, Kocaeli.
- Anonymous (2012). Ulusal Kalıntı Kontrol Planı. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Ciscato, C.H.P., Gebara, A.B., Spinosa, H.S. (2002). Pesticide residues in cow milk consumed in Sao Paulocity, Brazil. *J Environ Sci Health Part B*, 37 (4), 323-330.
- Çok, I., Bilgili, A., Özdemir, M., Özbek, H., Bilgili, N., Burgaz, S. (1997). Organochlorine pesticide residues in human breast milk from agricultural regions of Turkey, 1995-1996. *Bull Environ Contam Toxicol*, 59: 577-582.
- Erdoğan, Ö., Covaci, A., Kurtul, N., Schepens, P. (2004). Levels of organohalogenated persistent pollutants in human milk from Kahramanmaraş region, Turkey. *Environ Int*, 30: 659-666.
- Ghidini, S., Zanardi, E., Battaglia, A., Varisco, G., Ferretti, E., Campanini, G., Chizzolini, R. (2005). Comparison of contaminant residue levels in organic and conventional milk and meat products from northern Italy. *Food Addit Contam*, 22 (1): 9-14.
- Güvenç, D. (2008). Samsun yöresinden toplanan çiğ süt örneklerinde bazı pestisit kalıntılarının araştırılması üzerine bir çalışma, Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Doktora Tezi, 64s.
- Jonh, P.J., Bakore, N., Bhatnagar, P. (2001). Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. *Environ Int*, 26: 231-236.
- Kampire, E., Kiremine, B.T., Nyanzi, S.A., Kishimba, M. (2011). Organochlorine pesticide in fresh and pasteurised cow's milk from Kampala markets, Uganda. *Chemosphere*, 84: 923-927.
- Karakaya, M. ve Boyraz, N. (1992). Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları. *Çevre Dergisi*, 1(4): 11-15.
- Kavas, G., Kınık, Ö. (2002). Süt ve ürünlerinde pestisitler. *Gıda Müh Der*, 12: 31-38.
- Keskin, F.İ. (2008). Türkiyede çiğ sütlerde bazı organik fosforlu insektisit kalıntılarının incelenmesi. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Ens., Doktora Tezi, 62s.
- Lehotay, S.J. (2006). Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach for determining pesticide residues. In: Pesticide Protocols. Ed., Vidal J.L.M. Humana Press Totowa, New Jersey, 239-263.
- Maitre, M.I., Sierra, P., Lenardon, A., Enrique, S., Marino, F. (1994). Pesticide residue levels in Argentinian pasteurized milk. *Sci Total Environ*, 155: 105-108.
- Mallatou, H., Pappas, C.P., Kondyl, E., Albanis, T.A. (1997). Pesticide residue in milk and cheese from Greece. *Sci Total Environ*, 196: 111-117.
- Martinez, M.P., Angulo, R., Pozo, R., Jodral, M. (1997). Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. *Food Chem Toxicol*, 35: 621-624.
- Öztürk, S. (1990). Tarım İlaçları. *Hasad Yayıncılık*, 65-71.

Pala, M. 2018. Tarım ilaçları sorunu. *Gıda Tekn Der*, 22(2): 6.

Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigolova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multi residue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical Bioanal Chem*, 389:1697-1714.

Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., Smith, R.M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J Chromatogr A*, 1153: 36-53.

Stefanelli, P., Muccio, A. D., Ferrara, F., Barbini, D. A., Generali, T., Pelosi, P., Amendola, G., Vanni, F., Muccio, S. D., Ausili, A. (2004). Estimation of intake of organochlorine pesticides and chlorobiphenyls through edible fishes from the Italian Adriatic Sea during 1997. *Food Control*, 15: 27–38.

Weber, C.I., Mureşan, Gh., Georgescu, B. (2008). Organochlorine pesticide residue analysis from cow milk: A review. *B UASVM Anim Sci Biotechnol*, 65(1-2): 43-48.