

Pestisid Kalıntılarının Analizleri - I

Dr. Yaşar HIŞIL

Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü — İZMİR

ÖZET

Tarımsal savaş ilaçları tarımda birim alandan daha fazla ürün alınmasını sağlamış, fakat bu ekonomik çaba ürünlerimizi zehirli kimyasal maddelerle bulaşık hale getirmiştir.

Bu yayında, tarımsal ürünlerde bulunan zehirli pestisid kalıntılarının analiz tekniklerine bir giriş yapılmıştır. Yazı üç bölüm halinde sunulmuş olup. I. bölümde pestisid kalıntılarının önemi üzerinde durulduktan sonra bu kalıntıların çeşitli gıda maddelerinden ekstraksiyon teknikleri ve pestisidlerle girişim yapan maddelerin temizlenmesi (clean-up) teknikleri verilmiştir. Örnekten ekstre edilmiş ve temizlenmiş pestisid kalıntılarının II. bölümde enstrümental analiz teknikleri üzerinde genişçe durulduktan sonra, III. bölümde analiz sonucu bulunan pestisid kalıntılarının doğrulanması (confirmatory) teknikleri belirtilmiş ve pestisid kalıntıları analizlerinde karşılaşılan problemler gözden geçirilmiştir.

GİRİŞ

Gıda maddelerinde, bitkilerde ve hayvansal dokulardaki çok düşük miktardaki pestisid kalıntılarının tayini basit bir konu değildir. Böcek öldürücüler (insektisidler), mantar öldürücüler (fungisidler), yabancı ot öldürücüler (herbisidler), kırmızı örümcek öldürücüler (akarisidler) ve fare öldürücüler (rodentisidler) birlikte genellikle farklı kimyasal yapı ve özellikte yüzlerce bileşiklerdir. Bir pestisid kalıntısı analizcisi, bu materyallerin herhangi birinin kalıntısını tayin etmede, tek bir örnekte sık sık birkaç pestisidin birarada bulunmasıyla karşılaşabilir.

Pestisid kullanmanın tartışılmaz yararlarına rağmen, insanda ve çevrede birikim yapan bu bileşiklerin zararlı etkileri konusundaki endişeler gün geçtikçe kesinlik kazanmaktadır. Kalıntı analizcisinin işi sadece doğrudan ilaçlanmış bitki ve hayvanlarda pestisid kalıntılarının teşhis ve tayini ile sınırlandırılmış değildir.

Aynı zamanda ilaçlanmış alanlarda sonradan yetişmiş bitkilerde, hayvansal ürünlerde, topraklarda, suda ve insanın bizzat kendisinde pestisid kalıntılarının tesbit ve tayini gerekir. Çoğu kez analiz, canlı dokularda absorbe edilen, toprakta absorbe edilen veya ışığa maruz kalan pestisidlerin kimyasal değişimlere uğraması sebebiyle ayrıca karmaşıktır. Bu değişimler asıl pestisidden daha zehirli olan bileşikler hasil edebilir ve analizci, asıl pestisid kalıntısının yanında bunların bozunma nisbetlerini, bu metabolitlerin cinsini ve miktarını da tayin etmelidir.

Türkiye'de 220 çeşit etkili madde üzerinden 689 adet tarımsal ilaç ruhsat almış bulunmaktadır. Ülkemizde tarımsal ilaç kullanımını her yıl artış göstererek 1978 yılında 58.383 ton olmuştur. Pestisidler içerisinde fungusidler baş sırayı almakta, bunu insektisidler ve herbisidler izlemektedir. Fungusidler içerisindeki toz kükürt, kükürtlü preparatlar, göztaşı, bakırlı preparatlar, cıvalı preparatlar gibi inorganik ilaçlar hariç tutulursa, organik ilaçlar arasında insektisidler ilk sırayı almakta ve bunu herbisidler izlemektedir.

Tarım ilaçlarının üründe hangi oranda kalırsa insan sağlığına kötü etki yapmayacağı genellikle bellidir. Ancak, aşırı ilaçlama, hasada yakın ya da hasat sırasında ilaçlama üründeki ilaç kalıntısını yükseltmekte ve ilacın kalıntısının doğrudan tüketiciye ulaşmasına yol açmaktadır.

Pestisidlerin ani (akut) zehirliliği kadar süregen (kronik) zehirliliği de önemlidir. Bunlar insan vücudunda birikip, bir süre sonra vücuttaki doz yükselince insanı ölüme kadar götürülebilir veya çeşitli hastalıklara sebep olabilirler. İnsanları pestisid kalıntılarının zararlı etkilerinden korumak için gıda maddelerinin üretimden tüketime kadar geçirdiği her safhada kontrol edilmesi gerekmektedir.

Pestisid kalıntılarının analiz safhaları genellikle şöyledir :

- 1) Etkili ve seçici bir çözügen kullanarak örnekten kalıntının ekstraksiyonu,
- 2) Ekstraktan girişim (interference) yapan maddelerin ayrılması. Bu işlem temizleme sırasında kromatografi veya çözücü ile ayırma tekniğinden biri ile yapılır.
- 3) Temizlenmiş ekstraktta, metabolitler ve bozunma ürünleri ile birlikte pestisid kalıntılarının miktarının hesabı. Son tayin metodları (end - methods of analysis) ile 10^{-12} g dan daha düşük düzeydeki kalıntıları analiz etmek mümkündür.
- 4) Farklı bir son - tayin metodu kullanarak veya bir türevin teşhisi ve türevin formasyonu ile kalıntının varlığının doğrulanması (confirmation).

Esas olarak beş tane son - analiz yöntemi bulunmaktadır. Bunlar :

- a) Fonksiyonel grup analizi : Bu yöntem bir bileşikte belirli bir grubun veya elementin kolorimetrik ölçümüne dayanır.
- b) Biyolojik test yöntemleri : Bu yöntemler bazı sınıf pestisidlerin kolinesteraz enzimini engellemesiyle veya larva üzerine etki ederek, biyolojik açıdan önem taşıyan kalıntıların varlığını gösterirler.
- c) Kromatografik yöntemler : Bunlar, ayırmanın, doğru teşhisin ve kalıntıların geniş bir şekilde tayininin sağlandığı, ince - tabaka, kağıt ve gaz - sıvı kromatografisi teknikleridir. Yüksek basınç - sıvı kromatografisinin önemi giderek artmaktadır.
- d) Spektroskopik yöntemler : Bunlar, teşhisin doğrulanmasında ve ideal şartlarda kantitatif analizde kullanılabilir.
- e) Radyokimyasal yöntemler : Bu başlığa nötron - aktivasyon analizi, direkt izotop - dilüsyon yöntemleri ve double - isotope derivative analiz teknikleri dahildir.

Nuclear Magnetic Resonance, Radioisoto-

pe labelling ve Mass Spectrometry gibi tekniklerin kullanımı gittikçe artarak, bilinmeyen metabolitlerin ve bozunma ürünlerinin teşhisi ve doğrulanması sağlanmıştır.

Ekstraksiyon, temizleme ve son - tayin yöntemlerinin aşağıda ayrı ayrı tartışmaları yapılmıştır.

EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ

Ekstraksiyon işlemleri analiz edilen örneğin cinsine ve pestisidin tipine göre değişir. Ekstraksiyon en az % 80 verimli ve kafi derecede seçici olmalıdır. Kullanılan son tayin metodunun yüksek duyarlılığından dolayı, plastik veya lastikle temas sonucu kontaminasyondan kaçınmak için büyük titizlik göstermek gerekir ve son - tayin yönteminde herhangi bir girişim sorunuyla karşılaşmamak için kullanılan bütün çözücüler yeter derecede saf olmalıdır.

Çözücü ekstraksiyonu çok yaygın bir şekilde kullanılır. Çözücü veya çözücü karışımının polaritesinin uygun olması çok önemlidir. Bazı pestisidler meyve ve sebzelerin sadece dış yüzeyinde bulunurlar. Bu durumda, örneği uygun bir çözücü ile basitçe yıkayarak örnekten pestisid kalıntısının hepsini tamamen ayırmak mümkündür. Bir çözücüyle yumuşatmadan (maceration) sonra santrifüj veya filtre etmek bitkisel örnekler için bilhassa etkilidir. Örnekteki su polar olmayan çözücülerle emülsiyon formu hasıl edebilir. Bu durum önceden çözücüyle birlikte anh. sodyum sülfat veya propan - 2 - ol gibi su çekici bir ecza kullanılarak ortadan kaldırılabilir.

Et örnekleri ekseriya çok ince kıyılarak Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulur. Buna eşdeğer basit bir yöntem de kıyılmış örneğin çözücüyle su banyosunda ısıtılmasıdır. Bunun için örnek önce bağ dokularının parçalanmasına yardım etmesi için sodyum sülfat ve ince kum ile karıştırılır. Bu teknik iyi bir çözücü olan hegzan kullanıldığında organik klorlu pestisidler için kullanılabilir. Bununla birlikte lindane gibi uçucu pestisidlerin işlem sırasında azalmasını önlemek için özel dikkat sarfetmelidir.

Su örnekleri normal olarak herhangi bir pestisid kalıntısını ekstre etmek için çözücüyle çalkalanır. Organik klorlu bileşikler için kullanılan çözücü hegzandır, diğer bazı bileşikler için ise kloroform uygundur. Hava ve su örneklerinden pestisidlerin ekstraksiyonu karbon gibi katı bir madde üzerinde adsorpsiyonla da yapılabilir. Daha sonra elüsyonla (elution) kalıntılar çözücüye alınır.

Organik klorlu pestisidler ve bunların başlıca parçalanma ürünleri yağda eriyebilir, bunun için süt kreması ve et gibi gıdaların yağlı kısımlarında bu pestisidlerin birikim yaptığı görülmektedir. Bu tip pestisidlerin ekstraksiyonunda, Soxhlet ekstraktörü, Waring tipi blender veya basit çalkalama düzenlerinden birisinde veya bunların kombinasyonunda genellikle hegzan veya aseton - hegzan karışımı kullanılır. Asetonitril, benzen, dimetilformamid, dimetilsülfoksit ve propan - 2 - ol gibi çözücüler de kullanılmıştır.

Organik fosforlu pestisidlerin ve metabolitlerinin kalıntılarının çeşitli materyollerden ekstraksiyonu bazı zorluklar göstermektedir. Sadece analiz edilen örneğin tabiatı, uygulanacak işlemi tayin etmez, fakat aynı zamanda bu bileşiklerde karşılaşılan polarite durumu da, eğer bilinmeyen bileşiklerin kalıntıları araştırılıyorsa, ön ekstraksiyon için genel bir çözücü kullanmayı gerektirir. Böyle çözücüler, temizleme basamaklarını karmaşık hale getiren (co - extractives) maddelerin önemli bir kısmını ortadan kaldırır. Çoğu kez, suda erir bileşiklerin çoğunun tutulmasına yardım eden susuz sodyum sülfat ile birlikte ekstraksiyon çözücüsü olarak genellikle benzen, kloroform, diklorometan veya asetonitril kullanılır. Kesilmiş veya parçalanmış örnek genellikle yüksek hızlı maseratör veya benzeri cihazlarla kuvvetli çalkalama yapılarak seçilmiş çözücü ile karıştırılır. Emülsiyon formu ortadan kaldırmak için sık sık santrifüj yapılması gerekebilir ve çözgen ekstraktının filtrasyonu önemli olabilir. Çözücü içerisinde donun hızla çözülmesiyle hücre yapısı parçalanacağından ürünün derin dondurucuda tutulması gerekebilir. Böylece, sistemik pestisid kalıntılarının çözücüye geçirilmesi kolaylaşmış olur.

Ekstraksiyonda ultrasonik teknik toprak

örneklerinden insektisidleri ekstre etmede kullanılmıştır. Bunun ekstraksiyon randımanında karıştırma ve parçalama (blender) yöntemlerinde daha üstün olduğu ve en az 8 saatlik Soxhlet ekstraksiyonu kadar etkili olduğu ifade edilmiştir.

TEMİZLEME İŞLEMLERİ

Yüksek derecede seçici ekstraksiyon işlemi kullanılsa bile ekstrakt normal olarak son tayin sırasında girişim yapan bazı maddeleri (co - extracted) de ihtiva edecektir. Bunun içiri kantitatif tayinden önce ekstraktın temizlenmesi (clean - up) gerekecektir. Farklı son tayin yöntemleri bu (co - extracted) maddelerin tip ve miktarını farklı kılar. Örneğin, ECD (Electron Capture Dedector) halojen kirliliğine aşırı derecede duyarlıdır. İnce Tabaka Kromatografisi de, sık sık bir bileşiğin göç nisbetini fenâ halde etkileyebilen yağlı materyale karşı oldukça hassastır. İstenmediği halde ekste edilen maddelerin bazıları İnce Tabaka Kromatografisinde benekleri gözle görünür hale getirme ajanlarıyla reaksiyona girerek veya onları maskeleyerek girişim yapabilir. Aynı şekilde bu maddeler spektro - fotometrik yöntemleri de etkileyebilirler.

İstenmediği halde ekstre edilen bu maddelerin varlığı, gaz kromatografisi kolonlarına enjeksiyon yapıldığında sadece kromatogram üzerinde pestisid dışı piklerin görülmesine sebep olmakla kalmaz, aynı zamanda böyle materyalin sürekli enjeksiyonu kolonun ayırma kabiliyetine zarar verir. Piklerin genişlemesine, kuyruk yapmasına ve nihayet üst üste çakışmasına sebep olur. Bu durum yağlı madde ihtiva eden ekstraktlarda genellikle görülür. Az miktarda yağın sürekli enjeksiyonu önceleri kolon destek maddesinin birkaç mm sinin yağla kaplanmasına sebep olur, sabit faz (stationary phase) görevini yapma rolüne başlar ve kolon karakteristiklerini tamamen değiştirir.

Yukarıda açıklanan sebeplerden dolayı ekstraktın uygun bir yöntemle temizlenmesi gerekmektedir.

Yaygın olarak kullanılan yöntemler; adsorpsiyon yöntemleri (kolon ve ince tabaka kromatografisi), çözücü partisiyonu, destilasyon yöntemleri (destilasyonla birlikte taşıyıcı gazla süpürme dahil - sweep co - distillation),

ve koloit (jel) kromatografisidir. Kullanılacak temizlemenin tipi, istenmediği halde ekstre edilen materyalin cinsine bağlıdır. Eğer ekstrakt az miktarda yağ ihtiva ediyorsa, kısa bir alümina kolondan geçirme çoğu kez kafi gelecektir. Silikajel, charcoal ve «florisil» bu maksat için tavsiye edilmiştir. İstenmediği halde ekstre edilmiş materyal ekstraktan genellikle kolon materyalinin yüksek adsorpsiyon özelliği ile ayrılır. Ekstrakt küçük hacme kadar konsantre edildikten sonra hazırlanmış kolonun üzerine verilir, bir veya birkaç çözücü ile elute edilir ve fraksiyonlar toplanır. İstenmeyen maddeler kolonda tutulur.

Adsorbantlar aktivite derecelerine göre, adsorpsiyon kabiliyetlerine bağlı olarak, zayıf, orta ve kuvvetli olarak sınıflandırılır. Bir adsorbantın aktive veya deaktive edilmesi mümkündür. Adsorbantların pek çoğu kuvvetli ısıtılarak aktive edilebilir. Bazıları ise özel bir amaç için asitler veya bazılarla (aluminoda olduğu gibi) veya organik çözücüler ile (charcoal da olduğu gibi) ön muameleyle aktive edilebilir. Alüminanın deaktivasyonu su ilavesiyle yapılır ve bu şekilde hazırlanmış farklı derecelerdeki alüminalar çeşitli azo boyaları için adsorptif kapasiteye dayanan Brockmann aktivitesine göre standardize edilmişlerdir.

Pestisidler için «Florisil» ile temizleme işlemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çözücü partiyonu (solvent partiton) yöntemlerinde kullanılan çözücüler asetonitril, dimetilformamid ve dimetilsülfoksitten ibarettir.

İnce tabaka kromatografisi, ekstrakta fazla miktarda yağlı materyalin bulunmaması şartıyla temizlemede kullanılabilir. Bunun için 1 - 5 mm kalınlığında adsorbant tabakası hazırlanır ve ekstrakt genel olarak çizgi şeklinde verilir.

Distilasyonla birlikte taşıyıcı gazla süpürme tekniği; özel adsorbant ve ekipman, çok miktarda pahalı saf çözücü ve zahmetli temizleme yöntemi ihtiyacını ortadan kaldırdığı için faydalı bir yöntemdir. Örnekler uygun bir çözücü ile, örneğin organik fosforlu pestisidler etilasetat ile ekstre edilir, sonra aliquat konsantre edilir ve ısıtılmış, içerisinde cam yünü ihtiva eden uzun cam tüp içerisine, üç dakika ara ile etil asetat enjeksiyonu yapılarak temizleme gerçekleştirilir. Taşıyıcı azot gazı, buharlaşan uçucu bileşikler tüp içerisinde sürükler, pestisidler analiz için toplanırken, girişim yapan organik maddeler cam yünü içerisinde tutulur.

Jel filtrasyon veya jel kromatografisi yaygın bir şekilde yıllardır biyokimya alanında kullanılmıştır. Tekniğin pestisid analizlerinde kullanılması sınırlıdır. Bununla birlikte, son zamanlarda susuz sistemlerde ayırmaları (separations) başarabilen ve modifiye edilmiş bir lipophilic dextran jel olan «Sephadex LH - 20» nin tanıtılmasından sonra bu tekniğe ilgi yeniden artmıştır.

Bu ayırma tarzı, moleküler büyüklüğe dayanmakta ve istenmediği halde pestisidlerle birlikte ekstre edilen klorofil (mol. ağı. 906), ve karoten (mol. ağı. 536) den organik fosforlu pestisidlerin (mol. ağı. 200 - 350) ayrılması için güçlü bir temizleme sistemi olarak gözükmektedir.

Jel kromatografisinin faydalı bir yönü, elüsyon hacimlerinde veya geri almalarda (recoveries), dikkate değer herhangi bir değişme olmaksızın kolonun uzun süre tekrar tekrar kullanılabilmesidir.

Tekniğin organik klorlu pestisidlere uygulanması, ayırma zayıf olduğundan başarılı olmamıştır.

SUMMARY

Pesticide Residue Analysis - I

Use of pesticides increased the productivity in agriculture. But as a result of this application, the contamination of products with these chemical substances became a major problem in nutrition.

This review is an introduction to analysis of pesticide residues which covers three sec-

tions. In first section, procedures applied for the extraction of pesticide residues from various foods together with clean-up techniques were discussed. Second section covers broadly instrumental analysis techniques for pesticide residues. Finally, confirmatory techniques of pesticide residues and the problems of separation, detection and confirmation were discussed in third section.