

DOMATESTE GAZ KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE 2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT (2,4-D) TAYİNİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR¹

INVESTIGATIONS ON THE DETERMINATION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D) IN TOMATOE BY GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

Jale ACAR, Vural GÖKMEN

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: Örtü altında yetiştirilen sebzeler arasında önemli bir yeri olan domateste verimi artırmak için bazı büyüme düzenleyici kimyasallar kullanılmaktadır. Domateslerde kullanılmasına izin verilmediği halde, yukarıda belirtilen amaçla kullanıldığı bilinen bir kimyasal olan 2,4-D'nin üründeki kalıntı miktarının belirlenmesinde, yeşil bitkilerde 2,4-D tayininde kullanılan gaz kromatografik bir yöntem bazı değişikliklerle uygulanmış ve %96-108 düzeyinde geri kazanma sağlanmıştır.

SUMMARY: Plant growth regulators have been used to increase the yield in tomatoes which have a great economic significance among the vegetables grown under protected cultivation. Use of 2,4-D is not permitted as a growth regulator in Turkey, but it is well known that this chemical has been used in tomatoes. A gas chromatographic method used for the determination of 2,4-D in plant materials was applied with some modifications to determine the residues of 2,4-D in tomatoes. Recovery of 2,4-D was found out to be 96-108%.

GİRİŞ

Son yıllarda gelişme gösteren örtü altı sebze yetiştiriciliğinde domates önemli bir yere sahiptir. Ancak örtü altı sebze yetiştiriciliğinin yapıldığı güney illerimizde kış aylarında gündüz sıcaklıkları yeterli olsa bile, gece sıcaklıklarının yetersiz oluşu üründe meyve tutumunu olumsuz yönde etkilemektedir. Diğer taraftan örtü altı sebze yetiştiriciliğinde ısıtma yapılması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle gece sıcaklıklarının düşük olduğu aylarda yetersiz polen oluşumunu teşvik etmek için bazı bitki büyüme düzenleyici kimyasallardan yararlanılmaktadır.

Büyümeyi düzenleyici nitelikteki bu kimyasallar arasında yaygın olarak kullanılan 2,4-D aslında bir herbisit olup; yine bu amaçla kullanılmak üzere Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca imaline 07.08.1964, ithaline ise 17.05.1971 yılından beri izin verilmektedir. Aynı amaçla 2,4-D, ester halinde de kullanılabilir. 2,4-D esterinin imaline ise 02.01.1973'den beri izin verilmektedir (ANONYMOUS, 1992). Ancak kullanımındaki bilgi ve deneyim eksikliği nedeniyle yanlış ve yüksek dozda 2,4-D uygulanması sonucu özellikle domateslerde 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 yetersizliği, ancak bu maddenin ko-kanserojenik etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalara göre de tümör oluşumunu hızlandırdığı belirtilmektedir (BURGAZ, 1982).

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, turuncgillerde 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

* Bu çalışma Biologische Bundesanstalt, Inst. für Ökologische Chemie/Berlin'de yürütülmüş ve DAAD tarafından desteklenmiştir.

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).

Yabancı kaynaklarda bitkisel materyallerde, toprakta, suda ve insan idrarında kalıntı 2,4-D düzeyinin saptanmasına yönelik birçok araştırma yer almaktadır. Bu araştırmaların hemen hepsinde gaz kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. 2,4-D gibi yüksek polariteye sahip bileşiklerin gaz kromatografik olarak tayin edilebilmesi için derivatize edilmeleri zorunludur (ROSEBOOM ve ark., 1982).

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

Uygulanan ekstraksiyon yöntemi ne olursa olsun, ekstraktın daha sonra mutlaka temizlenmesi gerekir. Genellikle ekstrakta uygulanan ilk temizleme işlemi asit/baz ayırmadır. Bunun için asitlendirilmiş organik ekstrakt, seyreltik sulu alkali çözeltisi ile ekstrakte edilir (MUNRO, 1972; CESSNA, 1980; JENSEN ve GLAS, 1981; BRISTOL ve ark., 1982; COOK ve ark., 1983). 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 florasil kullanıldığı görülmektedir (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). 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. 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).

Diğer taraftan fenoksikarboksilik asit herbisitlerin derivatizasyonu amacıyla geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında metilasyon, pentaflorobenzilasyon, etilasyon ve trikloroetilasyon sıkça 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).

Son yıllarda bitkisel materyallerdeki birçok farklı pestisit kalıntısının tayininde gaz kromatografik yöntemler yerine likit kromatografik yöntemler kullanılmaya başlandığı görülmektedir (MOYE, 1981). Ancak 2,4-D gibi asidik herbisitlerin bitkisel materyallerdeki kalıntılarının likit kromatografisi ile saptanmasına yönelik bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte su gibi basit yapıdaki örneklerdeki 2,4-D kalıntı miktarının saptanmasında, 2,4-D formülasyonlarının saflık oranlarının belirlenmesinde ve herbisit formülasyonları içindeki kanserojen nitelikli fenolik safsızlıkların miktar tayininde likit kromatografisi kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (MOYE, 1981; ROSEBOOM ve ark., 1982; SMITH ve PIETRZYK, 1983; AKERBLOM, 1985; FAYYAD ve ark., 1989; LARSON ve HOUGLUM, 1991).

SPECHT ve TILLKES (1981), hububat ve çeşitli bitkisel örneklerdeki fenoksialkanoik asit kalıntılarını saptamak için gaz kromatografisi/elektron tutucu dedektör (GC/ECD) ve gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi (GC/MS) kullanmışlardır. Bu çalışmada, örnekler öncelikle 1,0 N NaOH ile kaynar su banyosunda hidrolize edilmiş, ardından alkali hidrolizat asitlendirilerek aseton: diklormetan: su ayırımı ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt Bio Beads S-X3 dolgu jel kromatografisi kolonunda temizlendikten sonra GC/ECD veya GC/MS ile analiz edilmiştir. Gaz kromatografik analizler metil ester formunda gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar özellikle GC/ECD kullanıldığında, derivatizasyondan sonra mini silikajel kolonunda temizleme işlemi yapılmasını önermişlerdir.

SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından yeşil bitkilerde 2,4-D kalıntı miktarının tayininde kullanılabileceği belirtilen yukarıda açıklanan yöntemin domateslerde aynı amaçla uygulanabilirliği bu çalışma kapsamında incelenmiştir.

MATERİYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırma materyali: Denemelerde Biologische Bundesanstalt/Berlin serasında özel olarak hiçbir tarım ilacı kullanılmadan yetiştirilen domatesler kullanılmıştır. Domatesler parçalandıktan sonra 0,1 ve 0,2 mg/kg düzeyinde olacak şekilde 2,4-D ilave edilmiştir.

Kimyasallar ve diğer yardımcı maddeler:

Denemelerde kullanılan tüm organik çözücüler kromatografik kullanıma uygun olup, Merck firmasından sağlanmıştır.

Yöntem

Alet ve ekipmanlar:

Gaz kromatografi (GC) cihazı: Denemelerde Hewlett Packard 5890 II model gaz kromatografi cihazı ve elektron tutucu dedektör (GC/ECD) kullanılmıştır.

Kolon tipi: 30 m uzunluğunda ve 0,323 mm çapında kuarz kapiler kolon

Taşıyıcı gaz: N₂

Sıcaklık programı: 80°C (0,5 dak) > 10/dak > 300°C (1 dak)

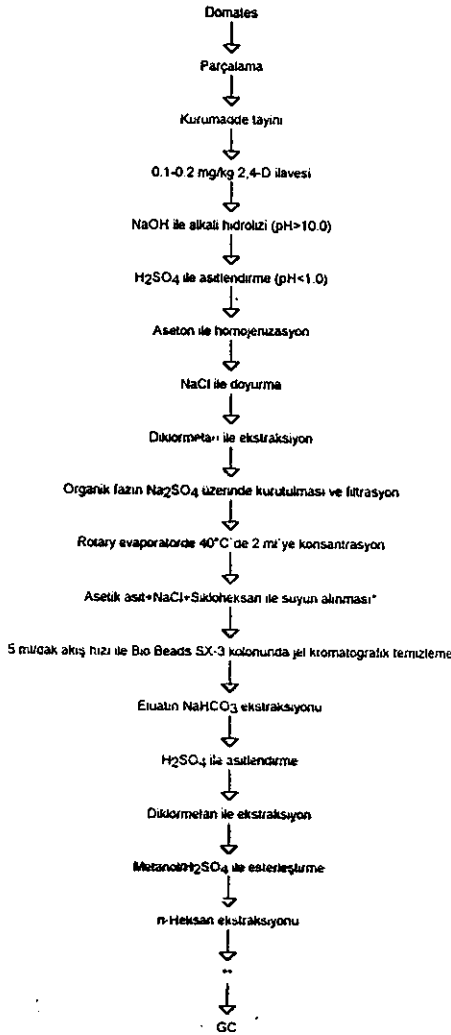
Autosampler: HP 7673 A

İnjesiyon hacmi: 1 µl

Jel kromatografi cihazı: GPC Autoprep 1002 olup, kolon boyu 400 mm, iç çapı 25 mm'dir. Kolon dolgu maddesi 25x320 mm Bio Beads S-X3, 200-400 mesh. Kolon etilasetat/sikloheksan ile önceden şişirilmiştir. Kolondan akış hızı 5 ml/dak'dır.

Domates örneklerinde ilave 2,4-D

miktarının belirlenmesi: Bu amaçla SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından bitkisel materyallerde GC ile 2,4-D tayini için önerilen yöntem önce hiçbir farklılık yapmadan uygulanmıştır. Daha sonra elde olunan sonuçlar incelenmiş ve bu konudaki diğer kaynaklar da gözönüne alınarak belirtilen yöntemde bazı değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Deneme akım şeması Şekil 1'de verilmektedir. Akım şeması üzerinde



Şekil 1. Specht ve Tillkes (1981) tarafından önerilen gaz kromatografik 2,4-D tayini akım şeması.

*Domateslerde su miktarı hububat gibi ürünlerden daha fazla olduğu için örneklerdeki suyun uzaklaştırılmasında güçlük çekilmiş ve Ebing ve ark. (1985) tarafından önerilen yöntem tercih edilmiştir. **Araştırmacılar tarafından önerilen mini-kieselgel kolonunda ikinci bir temizleme örnekte tekrar kirlenmelere yol açtığından domates örnekleri için uygun bulunmamış ve kullanılmamıştır.

değişiklikler kısaca belirtilmiştir. Ancak domateslere 2,4-D ilavesi ve bunun geri kazanılması denemelerine başlamadan önce, asetondaki 2,4-D ve 2,4-DME çözeltileri kullanılarak uygulanan metilasyonun metilasyon yüzdesi ile jel permeasyon kromatografisi kolonunda elüsyon sınırları saptanmıştır.

Değerlendirme: Değerlendirme 2,4-D metil esterleri (2,4-DME) standart eğrisi yardımıyla yapılmıştır. GC/ECD ölçümü için 1-4 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuçlar domatesten mg/kg serbest asit (2,4-D) olarak belirtilmiştir.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

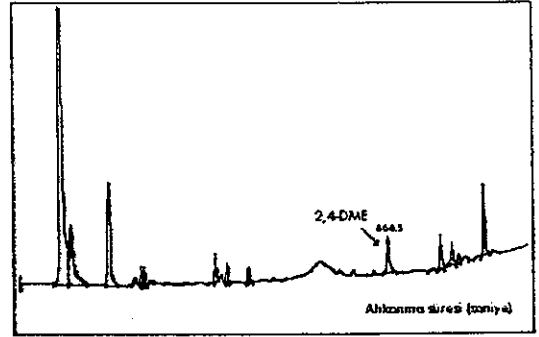
Öncelikle aseton içinde 1-4 µg/ml olacak şekilde saf 2,4-DME çözeltileri hazırlanarak bir standart eğri çizilmiştir. Eğrinin korelasyon katsayısı $r = 0,9995$ olarak bulunmuştur. Daha sonra saf 2,4-D'nin aseton-daki çözeltisinde, SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından önerilen metilasyon yöntemi gereğince metilasyon uygulanmış ve 2,4-D'nin metilasyonunda elde edilen metilasyon yüzdesi %95,83 olarak hesaplanmıştır.

Saf 2,4-D'nin aseton-daki çözeltisi kullanılarak Şekil 1'de belirtilen akım şemasına göre çalışılmış ve jel kromatografisinde 5 ml/dak akış hızında elusyon sınırları saptanmıştır. Elusyon sınırları çalışma koşullarında 2,4-D için 100-130 ml olarak bulunmuştur. SPECHT ve TILLKES (1981)'de araştırmalarında aynı sonucu aldıklarını bildirmektedirler.

Geri kazanma denemeleri için seradan alınan domatesler parçalandıktan sonra 0,1 ve 0,2 mg/kg 2,4-D olacak şekilde 2,4-D standart çözeltisinden ilave edilmiştir. Sonra bir cam baget ile iyice karıştırılmış ve Şekil 1'de verilen akım şemasına göre 2,4-D tayini gerçekleştirilmiştir. Elde olunan değerler kurumadde göz önüne alınarak hesap edilmiş, sonra yaş maddeye göre düzeltme yapılmıştır. Geri kazanma oranları sırasıyla %108 ve %96 arasında bulunmuştur. 0,2 mg/kg olacak şekilde 2,4-D ilave edildiğinde gaz kromatografik ölçümlerden önce seyreltme gerekli olmuştur.

SPECHT ve TILLKES (1981) tarafından önerilen bu yöntemin domateslerde 2,4-D tayini için uygun olduğu saptanmıştır. Şekil 2'de domates örneğinde 2,4-D miktarının tayinine ait bir kromatogram verilmektedir. Ancak araştırcılar tarafından hububat ve yeşil bitki ekstraktlarının temizlenmesinde başarı ile kullanıldığı belirtilen minikieselgel kolonunda ikinci defa temizleme yapılan örneklerde kolonda tekrar kirlenmenin ortaya çıktığı saptanmış ve bu uygulamadan vazgeçilmiştir.

Diğer taraftan SPECHT ve TILLKES (1981)'in hububat ve yeşil bitkilerin ekstraksiyon aşamalarında karşılaştıklarını belirttikleri emülsiyon fazına domates örneklerinde karşılaşılmamış, diklormetan ile ekstraksiyonda 20-30 dakika sonra iyi bir faz ayırımı sağlanmıştır. Bunun domatesteki kurumadde miktarının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil 2. Domates ekstraktında metil esterleri formunda 2,4-D kromatogramı

KAYNAKLAR

- AKERBLOM, M., 1985, Simple precolumn sample enrichment in high-performance liquid chromatography for determination of phenoxy acid herbicides in water samples from exposure studies, *J. of Chrom.*, 319, 427-431.
- ANONYMOUS, 1992, Ruhsatlı Ziraî Mücadele İlaçları, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları,, Bakanlık Basımevi, Ankara, s. 43
- BRISTOL, D. W., COOK, L. W., KÖTERBA, 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.
- 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.
- 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.
- 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 WABBELS, H., 1985 Zur Rückstandanalytik von Phenoxyalkansäure-Herbiciden in Setreidekönern, *Lebensm. Chem., Gerichtl. Chem.*, 39, 126-130.
- 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 Chlorphenoxy-carbonsäure-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 MCCP: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 4, 679-681.
- MEEMKEN, H.-A., RUDOLPH, R., und FÜRST, P., 1987, Nachweis und Bestimmung von Chlorphenoxy-carbonsäuren durch Kapillar GC/MS: *D. Lebens.-Rundschau*, 83(8), 239-245.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Herbiciden Phenoxyalkancarbonsäuren und ihren Estern in Pflanzenmaterial: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 307, 257-264.
- 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.