

TR0100011

MISIR BİTKİSİNE GEÇEN ¹⁴C-KLORPİRİFOS KALINTISININ İZOTOP İZLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

Murat İLİM**, *Esmâ KILIÇ, *Kıymet GÖZEK**, *Ülkü YÜCEL****

****TAEK, Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi***

*****Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara***

ÖZET

Bu çalışma, mısır ve mısır bitkisine geçen ¹⁴C-klorpirifos kalıntısı ile mısır yaprağındaki ¹⁴C-klorpirifos kalıntısının zamanla değişimini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Açık hava şartlarında yetiştirilen ve pratiğe uygun olarak ¹⁴C etiketli klorpirifos ile ilaçlanan (4080 dpm/µg) mısır bitkisi hasat edildi. Mısır daneleri ile bitkinin kök, gövde ve yapraklarından alınan örneklerde toplam, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntı analizleri yapıldı. İnce tabaka kromatografisi ile ekstrakte edilen örneklerdeki kalıntının metabolit analizleri yapıldı. En fazla kalıntının yapraklarda olduğu, mısır danesine geçen kalıntının müsaade edilen limitlerin altında kaldığı belirlendi.

Yaprağa uygulanan kalıntının zamanla değişimi incelendi, toplam kalıntıdaki azalmanın ilk günlerde oldukça hızlı olduğu, yaklaşık dört gün içinde kalıntının yarısının uzaklaştığı ve 45 gün sonunda kalıntı miktarının %10 civarında kaldığı görüldü.

1. GİRİŞ

İklim ve toprak şartlarının tarıma elverişli olduğu ülkemizde mısır, tahıllar arasında buğday ve arpadan sonra en fazla yetiştirilen bir üründür. Ülkemizde toplam 500.000 hektar alanda mısır ekimi yapılmakta ve 1991 verilerine göre yılda yaklaşık 2 milyon ton üretilmektedir (1).

Klorpirifos mısır yetiştiriciliğinde başta koçan kurdu olmak üzere değişik türdeki yaprak zararlılarına karşı kullanılan organik fosforlu bir insektisittir. Bu madde canlı organizmada kolin esterazı inhibe ederek asetil kolin zehirlenmesine neden olmaktadır. Klorpirifosun önemli parçalanma ürünü 3,5,6-trikloro 2-piridinol (TCP)'dür. Türkiye'de mısır, domates, patates, biber, pamuk ve diğer ürünlere zarar veren zararlılara karşı kullanılmaktadır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kimyasal Maddeler

Özgül aktivitesi 1.09 MBq/mg olan ¹⁴C-klorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-trikloro-2-piridil) fosforotiyooat] ve standard klorpirifos (%99) Uluslararası Atom Enerjisi Ajanstan'dan temin edildi. Standard TCP (%99), Dow Chemical Co.'dan temin edildi. Bitkiye uygulanan inaktif klorpirifos (480 mg etkili madde/ml) Zirai Mücadele ve Tarım Aletleri Enstitüsünden temin edildi.

Sintilasyon çözeltileri ve çeşitli boyutlardaki kromatografi tabakaları (Merck, Silikajel 60 F₂₅₄) UAEA'dan, deneylerde kullanılan analitik saflıktaki diğer kimyasal maddeler piyasadaki firmalardan temin edildi.

2.2. Cihaz ve Malzemeler

Radyoaktivite ölçümü için Packard Tri-carb 1550 sıvı sintilasyon sayacı (LSC), yakma işlemi için OX600 Harvey Biological Oxidizer ve evaporasyon işlemi için Buchi R110 model rotary evaporatör kullanıldı. Örneklerin ekstraksiyonu Soxhlet ekstraksiyon cihazında gerçekleştirildi.

2.3. Tarla Denemeleri

Mısır bitkisi ANAEM'e ait tarlarda etrafı çevrili bir alanda 60x60x60 cm boyutlarında galvanize sacdan yapılmış 8 adet kutuda (Lizimetre) yetiştirildi. Kutuların tabanları delikli olup dış yüzeyleri güneş ışınlarının etkisiyle içindeki toprağın aşın derecede ısınmasını önlemek amacıyla alüminyum folyo ile kaplandı (2). Kutuların tabanına 2.5 cm kalınlığında çakıl taşı ve 2.5 cm torf yerleştirildikten sonra kutu yüzeyinin 5 cm altına kadar mısır yetiştiriciliğine uygun toprak ile dolduruldu ve Mayıs 1992'de ekim yapıldı. Sulama, çapalama ve seyreltme işlemleri pratiğe uygun olarak gerçekleştirildi. Ağustosta bitkiler, spesifik aktivitesi 4080 dpm/µg olan klorpirifos (0.92 kg/ha) ile püskürtme şeklinde ilaçlandı.

Ayrıca, seçilen bir mısır bitkisinin yaprakları üzerinde işaretlenen yaklaşık 2 cm çapında toplam 15 adet noktanın her birine enjektörle 20 µl (218000 dpm) klorpirifos uygulandı. İlaçlama anından itibaren değişik zamanlarda 45 gün süreyle alınan örnekler cam vialle konularak analiz zamanına kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.4. Örneklerin Analizi

Hasat edilen mısırlar ile rasgele seçilen 4 adet kutudan alınan kök, gövde ve yaprak örnekleri oda sıcaklığında kurutuldu. Mısır daneleri koçanlarından ayrıldı, biylerde öğütülerek un elde edildi ve tartıldı. Homojen hale getirilen bitki örnekleri ile mısır ununda Şekil 1'de verilen akım şemasına uygun olarak toplam, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntılar tayin edildi, ekstrakte edilebilen kalıntıların metabolit analizleri yapıldı.

Mısır unu ile kök, gövde ve yapraklardan alınan 0.100-0.200 g'lık örnekler yakma cihazında yakıldıktan sonra aktiviteyi sıvı sınıtılanan cihazında sayılmak suretiyle toplam kalıntı miktarları hesaplandı. Ekstrakte edilebilen kalıntıların analizi için 20-30 g arasında tartılan örnekler Soxhlet ekstraksiyon cihazında 8 saat süreyle metanol ile ekstrakte edildi. Ekstraktlar, rotary evaporatörde konsantrite edildikten sonra aktiviteyi sayıldı, ekstrakte edilebilen kalıntı miktarları bulundu. Ekstraksiyon keklelerinden alınan örnekler yakma cihazında yakıldı ve bağlı kalıntıları tespit edildi (Çizelge 2).

Ekstraktlar konsantrite edildikten sonra ince tabakalara enjekte edildi ve Tol: MeOH: Hex (18:1:1) çözeltilisinde standart CP ve TCP ile birlikte geliştirildi. Tabakaların tamamı 1 cm aralıklarla kazındı ve LSC'de sayıldı. Standartların bulunduğu bölgelerdeki aktivite değerlendirilerek metabolitlerin miktarları bulundu (Çizelge 3).

Yapraklardaki klorpirifos kalıntısının zamanla değişimini araştırmak amacıyla alınan örnekler iki defa 5'er mL metanol ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon çözeltileri birleştirildi, 200 µL örnek alınarak LSC'de sayıldı ve ekstrakte edilebilen kalıntı miktarı tespit edildi. Ekstrakte edilen örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra yakma cihazında yakılarak bağlı kalıntı miktarı bulundu.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çizelge 1'de 45 gün içinde farklı zaman aralıklarında alınan örneklerdeki toplam, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntı değerleri aktivite cinsinden verilmiştir. Toplam kalıntı miktarı, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntıların toplanmasıyla elde edilmiştir. Toplam aktivitenin başlangıçta uygulanan aktiviteye (218000 dpm) oranı geri kazanılan kalıntının verimini (kalıntı miktarındaki azalmayı) vermektedir. Bu değerler Şekil 2'de grafiğe geçirilmiştir. Grafikte, uygulamadan hemen sonra alınan örneklerdeki toplam kalıntının uygulanan klorpirifosun %94,9'u olduğu görülmektedir. Toplam kalıntıdaki azalmalar ilk günlerde oldukça fazla olmaktadır. Daha sonraki günlerde bu azalma yavaşlamakta ve 45 gün sonra kalıntı miktarı %10 civarına düşmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde yapıya uygulanan ilacın yapraktaki kalıcılığı çeşitli etkenlere bağlı olarak farklılık arz etmektedir. Uygulama tekniği (toz veya çözelti halinde), uygulamadaki etkili madde konsantrasyonu, ardarda yapılan uygulamalar, bir defada uygulanan madde miktarı, uygulamanın yapıldığı bitkinin türü ve uygulama sonrası iklim şartları ilacın kalıcılığını etkilemektedir. Literatürden alınan bilgilerde püskürtme şeklinde farklı bitki yapraklarına uygulanan klorpirifos kalıntısının bitkinin türüne, yaprak büyüklüğüne ve iklim şartlarına bağlı olarak ilk bir haftada %60 - %90 arasında azaldığı gözlenmektedir (3). Kaynaklarda, kalıntının yarısının uzaklaşması için geçen süre farklı bitki yapraklarında ve farklı uygulama şartlarında 1.4 ile 139 saat arasında değiştiği belirtilmiştir. Çalışmamızda bu sürenin yaklaşık 4 gün civarında olduğu ve bu sonucun literatürde verilen bilgilerle uyum sağladığı gözlenmiştir. Ekstrakte edilen kalıntı miktarı, toplam kalıntıda olduğu gibi ilk günlerde hızla azalmakta ve bir hafta sonra bu azalma yavaşlamaktadır. Yapraklarda ekstrakte edilebilen kalıntının azalmasına bağlı olarak bağlı kalıntı miktarı artmaktadır.

Mısır danesinde ortalama 875.4 dpm/g aktivite tespit edilmiştir. Toplam mısır danesinde (1645 g) bulunan aktivitenin (1.44 10⁶ dpm) bitkilerle uygulanan teorik aktivitenin (1.079 10⁹ dpm) %0.13'dür. Bu da tarlada bitkiye uygulanan ilacın çok az bir kısmının ürüne geçtiğini göstermektedir. Ancak geri kazanılan kalıntı elde edilen ürün miktarı ile ilgili olduğundan bu oranın ürün verimi ile değişeceği düşünülebilir.

Mısır danesi ile bitkinin kök, gövde ve yapraklarındaki toplam, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntı miktarlarının klorpirifos eşdeğeri Çizelge 2'de verilmiştir. Daneldeki kalıntının yaklaşık dörtte üçü bağlı kalıntılardır. Bağlı kalıntı yüzdesinin daha fazla olmasının nedeni, kalıntının yaprak ve kökler vasıtasıyla ürüne geçmesiyle açıklanabilir.

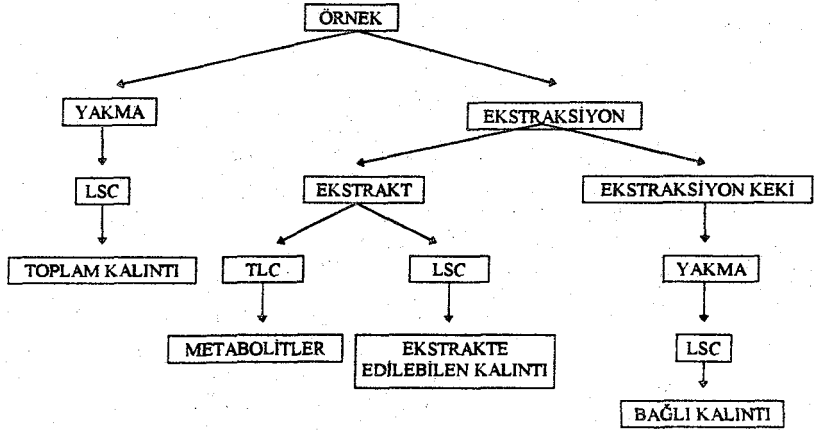
Danelerdeki kalıntının TLC ile yapılan metabolit analizi sonuçlarına göre (Çizelge 3) CP miktarı 0.006 ve 0.010 ppm, TCP miktarı ise 0.009 ve 0.013 ppm'dir. Bu değerlere göre danelerdeki klorpirifos kalıntısı müsaade edilen limitlerden (4) oldukça düşüktür.

Kalıntının en fazla olduğu kısım yapraklardır. Bunun sebebi, yaprakların geniş yüzeyli olması ve püskürtülen ilacın büyük çoğunlukla yapraklarda toplanmasıdır. Bitki gövdesinin de yapraklar gibi doğrudan pestiside maruz kalmasına rağmen yapraklar kadar kalıntı ihtiva etmemesinin nedeni, yüzeyinin geniş olmaması ve genellikle bir kılıfla kaplı olmasıdır. Bitkinin köklerinde de bitki gövdesindeki kadar kalıntı bulunmuştur. Bitki köklerinde kalıntıya raslanmasının sebebi, gerek uygulama sırasında ve gerek yağmur suları ile toprağa ulaşan ilacın kökler vasıtasıyla topraktan alınması ile açıklanabilir. Diğer yandan yapraklara uygulanan klorpirifos, yapraklardan bitki dokusuna geçmekte ve gerek bileşiğin kendisi ve gerekse parçalanma ürünleri bitkinin bütün kısımlarına taşınmaktadır. Çizelgeler incelendiğinde bağlı kalıntının ekstrakte edilebilir kalıntıdan daha fazla olduğu görülmektedir. Örnekler hasat sonunda alındığı için pestisitinin uygulanmasından sonra geçen sürede bağlı kalıntı miktarı ekstrakte edilebilen kalıntıya oranla artmıştır. Lee ve arkadaşları (5) 1991'de pirinç üzerinde yaptıkları bir çalışmada klorpirifos kalıntısının yıkama ve pişirme işlemleri ile uzaklaştırılması sırasında kalıntının önemli bir kısmının üründe kaldığını ve muhtemelen protein ve

karbonhidrat gibi bileşiklere bağlanmış olabileceğini bu nedenle uzaklaştırılmalarının mümkün olmayacağını belirtmişlerdir. Ancak yeni geliştirilen ekstraksiyon teknikleri (süper kritik akışkan ekstraksiyonu) ile normal ekstraksiyonla alınamayan kalıntılar büyük oranda ekstrakte edilebilmektedir. Khan (6) yaptığı bir çalışmada diğer tekniklerle ekstrakte edilemeyen bağı kalınlığı süper kritik CO₂ ekstraksiyonu ile tekrar ekstrakte etmiş ve bağı kalınlığının %70-90'ını geri kazanmıştır.

KAYNAKLAR

1. *Trarimsal Yapı ve Üretim, 1991.* TC. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü
2. Klein, V., Kohli, J., Weisberger, I. and Korte, F., 1973. Fate of Aldrin-14 in Soil Under Outdoor Conditions, J. Agric. Food Chem., Vol. 21, No.2
3. Veierov, D., Fenigstein, A. Madsar, V. M. and Klein, M., 1988. Effects of Concentration and Application Method on Decay and Residual Activity of Foliar Chlorpyrifos. Journal of Economic Entomoloji. Vol. 81, No. 2, 621-627
4. EPA, 1991. Code of Federal Regulations. Vol. 40, Parts 150-189, Pages 363 and 443.
5. Lee, S. R., Mourer, C. R. and Shibamoto, T., 1991. Analysis before and after Cooking Processes of a Trace Chlorpyrifos Spiked in Polished Rice. J. Agric. Food Chem., Vol. 39, No. 5, 906-908
6. Khan, S. U. 1995. Supercritical Fluid Extraction of Bound Pesticide Residues from Soil and Food Commodities. J. Agric. Food Chem. Vol. 43, No 6 1718-1723
7. Inmann, R. D., Kügemagi, U. and Deinzer, M. L., 1981. Determination of Chlorpyrifos and 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol Residues in Peppermint Hay and Peppermint oil. J. Agric. Food Chem., Vol. 29, No. 2, 321-323
8. Iwata, Y., O'Neal, J. R., Barkley, J. H., Dinoff, T. M. and Dusch, M. E., 1983. Chlorpyrifos Applied to California Citrus: Residue Levels on Foliage and on and in Fruit. J. Agric. Food Chem., Vol. 31, No 3, 603-
9. Knuth, M. L. and Heinis, L. J., 1982. Dissipation and Persistence of Chlorpyrifos within Littoral Enclosures. J. Agric. Food Chem., Vol. 40, No. 7,
10. Mourer, C. C., Hall, G. L., Whitehead, W. E and Shibamoto, T., 1990. Gas Chromatographic Method for Determination of Chlorpyrifos and Its Metabolite 3,5,6-Trichloro-2 Pyridinol (TCP) in Dates. J. Assoc. off. Anal. Chem., Vol. 73, No. 2, 294-297
11. Macalady, L. D. and Wolfe, L. N., 1983. New Perspectives on the Hydrolytic Degradation of the Organophosphorotioate Insecticide Chlorpyrifos. J. Agric. Food Chem., Vol. 31, No 6, 1139-1147

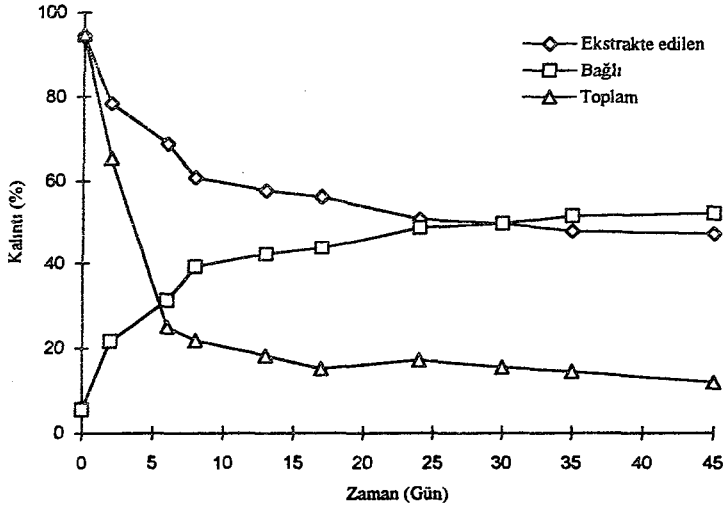


Şekil 1. Örneklerde Kalıntı Analizi

Çizelge 1. Yapraktaki toplam, ekstrakte edilebilir ve bağlı kalıntının zamanla değişimi¹⁾

Zaman (Gün)	Uygulanan Aktivite (dpm)	Ekstrakte Edilebilir Kalıntı (dpm)	Bağlı Kalıntı (dpm)	Toplam Kalıntı (dpm)	% Ekst	% Bağlı	% Verim
0	218000	195503	11379	206882	94,5	5,5	94,9
2	218000	111776	30796	142572	78,4	21,6	65,4
6	218000	35316 39327	13734 20623	49050 59950	68,8	31,2	25,0
8	218000	23424 34497	15834 21337	39258 55834	60,8	39,2	21,8
13	218000	22440 22930	14332 19305	36772 42239	57,7	42,3	18,2
17	218000	17775 18800	11446 17610	29221 36410	56,2	43,8	15,1
24	218000	19092	18310	37402	51,1	49,0	17,2
30	218000	16887	16920	33807	50,0	50,0	15,5
35	218000	15235	16395	31630	48,2	51,8	14,5
45	218000	12287	13540	25827	47,6	52,4	11,9

1) Kalıntı miktarları aktivite cinsinden verilmiştir



Şekil 2. Yapraklardaki Klorpirifos Kalıntısının Zamanla Değişimi

Çizelge 2. Kök, Gövde, Yaprak ve Danedeki Toplam, Ekstrakte edilebilir ve Bağlı Kalıntı Miktarları¹⁾ (Hava kuru)

Örnek	Toplam Kalıntı ²⁾ (ppm)	Ekstrakte Edilebilir ²⁾ Kalıntı (ppm)	Bağlı Kalıntı ²⁾ (ppm)
Kök	0.38±0.01	0.19± 0.02	0.20 ±0.02
Gövde	0.41 ±0.02	0.15± 0.01	0.27± 0.06
Yaprak	11.40± 3.9	6.40±1.40	6.30±1.70
Dane	0.22 ±0.02	0.06± 0.01	0.16 ±0.01

1) Sonuçlar 4 kutunun ortalaması olarak verilmiştir.

2) Klorpirifos eşdeğeri

Çizelge 3. Kök, Gövde, Yaprak ve Danedeki CP ve TCP Miktarları

ÖRNEK	1. KUTU				3. KUTU			
	CP		TCP ¹⁾		CP		TCP ¹⁾	
	% ²⁾	ppm	% ²⁾	ppm	% ²⁾	ppm	% ²⁾	ppm
Kök	2.7±0.6	0.005	32.9±2.9	0.063	2.5±0.9	0.005	39.0±2.3	0.082
Gövde	10.0±2.1	0.0105	16.5±3.4	0.025	12.4±3.7	0.020	19.8±4.1	0.032
Yaprak	41.2±1.8	1.380	21.9 ± 5.0	0.734	42.2± 11.1	2.663	17.6± 1.1	1.111
Dane	11.6±2.2	0.006	17.5±3.1	0.009	16.6±2.4	0.010	21.2±1.8	0.013

1) Klorpirifos eşdeğeri

2) Ekstrakte edilebilir kalıntının yüzdesi

Mısır Bitkisine Geçen ¹⁴C- Klorpirifos Kalıntısının İzotop İzleme Tekniği ile Araştırılması

Murat İLİM, **Esmâ KILIÇ****, **Kıymet GÖZEK***, **Ülkü YÜCEL****

**TAEK, Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi*

***Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara*

Bu çalışma, açık hava şartlarında yetiştirilen ve pratiğe uygun olarak ¹⁴C-klorpirifos ile ilaçlanan mısır bitkisinde, mısır danesi ve mısır bitkisine geçen klorpirifos kalıntısı ile yapraklardaki kalıntının zamanla değişiminin izotop izleme tekniği ile araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Organik fosforlu bir insektisit olan klorpirifosun mısır bitkisindeki kalıntısını incelemek amacıyla mısır, ANAEM deneme tarlasında kurulan 60x60x60 cm boyutlarındaki 8 adet lizimetrede yetiştirildi. Mayıs 1992'de yapılan ekinden sonra seyreltme, çapalama ve sulama işlemleri pratikte olduğu gibi yürütüldü. Spesifik aktivitesi 1.09 MBq/mg olan aktif klorpirifostan inaktif klorpirifos ile karıştırılarak spesifik aktivitesi 4080 dpm/µg olacak şekilde hazırlanan ilaç, ağustos ayında pratikteki uygun olarak (0.92 kg/ha) püskürtme yoluyla yapraklara uygulandı. Diğer yandan yapraklardaki kalıntının zamanla değişimini izlemek amacıyla seçilen bir mısır bitkisinin yaprakları üzerinde işaretlenen her biri yaklaşık 2 cm çapındaki toplam 18 adet noktaya enjektörle 20 µL (218000 dpm) klorpirifos uygulandı. Uygulama anından itibaren geçen 45 gün içerisinde belirli zaman aralıklarında alınan örnekler metanol ile ekstrakte edildi, LSC'de aktivitesi sayılarak ekstrakte edilebilen kalıntı miktarı bulundu. Kurutulan örnek yakma cihazında yakılarak bağlı kalıntı miktarı tespit edildi. Yapraklardaki ekstrakte edilebilen kalıntının zamanla azalmasına karşılık bağlı kalıntının arttığı, toplam kalıntının ilk 4 gün içinde yarı yarıya azaldığı gözlemlendi.

Ekim ayında hasat edilen mısır daneleri ile bitkinin kök, gövde ve yapraklarından alınan örnekler açık havada kurutuldu. Blenderde öğütülen örneklerdeki toplam kalıntı miktarı belirlendikten sonra metanol ile Soxhlet ekstraksiyon cihazında ekstrakte edildi, ekstraktlardaki kalıntı miktarı LSC'de sayılarak belirlendi. Ekstrakte edilen örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra yakılarak bağlı kalıntı miktarları bulundu. Ekstraktlar konsantrite edildikten sonra standard klorpirifos ve metaboliti olan TCP ile birlikte ince tabakalara enjekte edildi. Toluen:MeOH:Hekzan (18:1:1) çözeltisinde geliştirildi. Standarlara karşılık gelen bölgeler kazanarak LSC'de sayıldı. Ekstrakte edilebilen kalıntılardaki metabolitlerin miktarı belirlendi.

Toplam kalıntı en fazla bitki yapraklarında, an az bitki danesinde bulunurken, kök ve gövdedeki toplam kalıntı miktarlarının yaklaşık olarak aynı olduğu gözlemlenmiştir. Uygulama, püskürtme şeklinde ve yapraklara yapıldığı için bitki yaprakları doğrudan pestisite maruz kalmıştır. Bitki daneleri ise pestisitlen doğrudan etkilenmediğinden bitkinin diğer kısımlarına göre daha az kalıntı ihtiva etmektedir. Daneye geçen kalıntıdaki klorpirifos miktarının müsaade edilen sınırların altında kaldığı görülmüştür.