

Fileto Levrek'te (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) Dioksin, Furan ve Poliklorlu Bifenillerin Tespit Edilmesi

*Gül Çelik Çakıroğulları, Yunus Uçar, Devrim Kılıç

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü, Fatih Sultan Mehmet Bulvarı,
Yenimahalle Tarım Kampüsü, No:70, Yenimahalle, Ankara, Türkiye
*E mail: gcakirogullari@yahoo.com

Abstract: *Determination of Dioxin, Furan and Polychlorinated Biphenyls in Sea Bass Fillets (Dicentrarchus labrax Linnaeus, 1758).* Pooled sample of sea bass fillets from one of the biggest fish farms of Turkey was analyzed for PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and indicator PCBs. The results showed that PCDD/Fs, dl-PCBs and indicator PCBs concentrations were found as 0.18 pg TEQ g⁻¹ wet weight product, 0.85 pg TEQ g⁻¹ wet weight product and 3.68 ng g⁻¹ wet weight product respectively. Measured values were below the maximum residue levels indicated in both national and EU regulations.

Key Words: Dioxin, PCB, farm fish, sea bass, GC-HRMS.

Özet: Bu çalışmada Türkiye'deki en büyük balık çiftliklerinin birinden temin edilmiş levrek fileto örnekleri bir araya getirilerek poliklorlu dibenzo-p-dioksinler (PCDD'ler), poliklorlu dibenzo-p-furanlar (PCDF'ler), dioksin benzeri poliklorlu bifeniller (dl-PCB'ler) ve indikatör poliklorlu bifeniller (ind.PCB'ler) yönünden analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda balıkların toplam PCDD/F, dl-PCB ve ind. PCB konsantrasyonları sırasıyla 0.18 pg TEQ g⁻¹ yaş ağırlık, 0.85 pg TEQ g⁻¹ yaş ağırlık ve 3.68 ng g⁻¹ yaş ağırlık olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler Avrupa Birliği ve Ülkesel mevzuatlarda balıklar için tanımlanmış maksimum kalıntı limitlerinin altındadır.

Anahtar Kelimeler: Dioksin, Poliklorlu bifeniller, çiftlik balığı, levrek, GC-HRMS.

Giriş

Dioksinler (PCDDs), furanlar (PCDFs) ve poliklorlu bifeniller (PCBs) doğada kalıcılıkları çok uzun süreli olan, kanserojenik, mutajenik ve teratojenik etkileri mevcut bileşiklerdir. Dioksin ve furanlar doğal olarak oluşmazlar ve insan yapımı olarak üretilmezler ancak poliklorlu bifeniller insan yapımı olarak ticari amaçla endüstrinin birçok kolunda kullanılmak üzere üretilmişlerdir. En toksik dioksin bileşeni 2,3,7,8, TCDD'dir. Bu bileşikler suda az, yağda ise yüksek derecede çözünürler. Çevrede organik maddelere ve sedimente bağlanırlar; hayvanların ve insanların yağlı dokularında absorbe edilirler. Ayrıca biyolojik olarak parçalanmazlar ve gıda zincirinde birikim yaparlar (WHO 1989, EFSA 2004). İnsanların bu bileşiklere olan maruziyetinin % 90'ı gıdalardan kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, genel olarak su ürünlerinin bu maruziyette en önemli yeri tuttuğu ortaya koyulmuştur (Domingo ve Bocio 2007, Kulkarni ve diğ. 2008). Çiftlik balıklarında, kontaminasyonun temel kaynakları balık unu, balık yağı ve yaşadığı çevredir (Jacobs ve diğ. 2002). Bu nedenden ötürü eğer balık unu ve balık yağı düşük kontaminasyon seviyesine sahip balıktan hazırlanmış ise, çiftlik balığının daha az kontamine olması beklenir. Benzer şekilde balık yeminde balık yağının yerine bitkisel yağ kullanılması durumunda da çiftlik balıklarının kontaminasyon seviyesinin

düşeceği belirtilmiştir (Bell ve diğ. 2005). Bununla birlikte EFSA (2005) tarafından belirtildiği üzere kontaminasyonu önlemek veya minimize etmek için, kullanılan yemin önleyici analizi ile çiftlik balıkları kolaylıkla kontrol edilebilir. Dioksin, furan ve PCB'lere ilişkin ülkemizde yapılmış çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu çalışma Türkiye'de çiftlik balıklarında yapılan ilk çalışmalardan biri olması açısından önemlidir.

Materyal ve Yöntem

2009 Ekim ayında yurtdışına ihracat yapan büyük balık çiftliklerinin birinden ağırlıkları 140-180 gram arasında değişen 20 adet fileto levrek (*Dicentrarchus labrax* L.1758) temin edilmiştir. Balıklar analize kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bütün standartlar Cambridge Isotope Laboratuvarı'ndan (EDF-7999, EDF-8999, EC-4986, EC-4987, EC-5179, EC-4187, EC-4188, EC-4058, ED-911, ED-996, ED-907) temin edilmiştir. Çalışmada dioksinlerin (PCDD/PCDF) kalitatif ve kantitatif hesaplanması amacıyla 7 noktalı kalibrasyon eğrisi kullanılmış olup konsantrasyon aralığı standart 1 için 0.02-0.20 pg µl⁻¹, standart 2 için 0.05-0.50 pg µl⁻¹, standart 3 için 0.10-1.0 pg µl⁻¹, standart 4 için 0.20-2.0 pg µl⁻¹, standart 5 için 0.50-5.0 pg µl⁻¹, standart 6 için 1.00-10.0 pg µl⁻¹, standart 7 için 2.0-20 pg µl⁻¹ olarak belirlenmiştir. Non-ortho, Mono-ortho ve indikatör PCB'lerin

kalitatif ve kantitatif hesaplanması amacıyla 8 noktali kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır ve konsantrasyon aralığı 0.10-50 pg µl⁻¹'dir. Dioksin ve non-ortho PCB'ler ile mono-ortho ve indikatör PCB'lerin kalibrasyon standartlarına ¹³C ile işaretlenmiş iç, geri kazanım ve saflaştırma standartları ilave edilmiştir.

Analize başlamadan önce 20 adet fileto levrek örneği bir araya getirilerek homojenize edilmiş ve homojenattan yaklaşık 15 gram alınmıştır. Yağ çıkarma işlemine geçmeden önce örneğe ¹³C ile işaretlenmiş iç standartlar eklenmiştir. Yağ çıkarma işlemi sikloheksan, 2-propanol ve deiyonize su kullanılarak mekanik ekstraksiyon ile gerçekleştirilmiş ve % yağ miktarı gravimetrik olarak hesaplanmıştır (Smedes ve Thomassen 1996). Saflaştırma işlemine geçmeden önce saflaştırma iç standardı ilavesi yapılmıştır ve saflaştırma işlemi Power-Prep™ (Fluid Management Systems Inc., Waltham, MA, USA) adlı temizleme ve saflaştırma cihazında tek kullanımlık yüksek kapasite asidik silika, asidik-bazik silika, alumina ve karbon kolonlarının kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Traag ve diğ. 2008). Evaporasyon TurboVap II (Caliper Life Sciences) adlı buharlaştırma cihazı ile 40°C'de 14 psi azot gazı basıncı altında, deriştirme işlemi ise azot altında kurutma düzeneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar viallere geri kazanım standardı ilave edilerek aktarılmıştır (USEPA 1994, USEPA 1999).

Enjeksiyonda kullanılan HRMS cihazı Autospec Ultima'dır. Enjeksiyonlar 10000 rezolusyonda gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak 250µm x 0.25µm x 60m boyutlarında DB5MS (%5 fenil, %95 polidimetilsiloksan) kullanılmıştır. Taşıyıcı ve make up gaz olarak %99.999 saflığında helyum kullanılmıştır. Dioksin ve non ortho PCB'lerin tayininde kullanılan GC metodunun inlet sıcaklığı 280°C, enjeksiyon özelliği splitless'dir. Fırın programı ise 110°C'den 20°C artışla 200°C'e çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dak.bekledikten sonra 4°C artışla 280°C'e çıkacak ve bu sıcaklıkta 8 dak. bekleyip 5°C artışla 300°C'e çıkacak şekilde programlanmıştır. Mono ortho ve indikatör PCB'lerin tayininde kullanılan GC metodunun inlet sıcaklığı 280°C, enjeksiyon özelliği splitless'dir. Fırın programı ise 110°C'den 20°C artışla 200°C'e çıkacak ve bu sıcaklıkta 10 dak.bekledikten sonra 4°C artışla 300°C'e çıkacak şekilde programlanmıştır. İzotop dilusyon tekniğine dayalı metotlar kullanılmıştır (USEPA 1994, USEPA 1999).

Bulgular

Bu çalışmada, Avrupa Birliği ve Ülkemizin yasal mevzuatlarında belirtilen 17 adet dioksin/furan bileşeni, 12 adet dioksin benzeri poliklorlu bifenil ve ayrıca 6 adet indikatör

poliklorlu bifenil analiz edilmiştir. Homojenize edilmiş numunenin yağ oranı % 7.31 olarak bulunmuştur. Araştırma sonucunda elde edilen toplam dioksin/furan konsantrasyonu 0.18 pg TEQ g⁻¹ yağ ağırlık olarak bulunurken, toplam dioksin/furan ve dioksin benzeri poliklorlu bifeniller konsantrasyonu 1.03 pg TEQ g⁻¹ yağ ağırlık ve indikatör poliklorlu bifenillerin konsantrasyonu ise 3680 pg g⁻¹ yağ ağırlık olarak tespit edilmiştir. Dioksin ve furanlar açısından incelendiğinde en baskın bileşenler sırasıyla 2,3,4,7,8 PeCDF, 1,2,3,7,8 PeCDD, 2,3,7,8 TCDF ve 2,3,7,8 TCDD olarak bulunurken, dioksin benzeri PCB'ler açısından PCB 126 ve PCB 118 olarak bulunmuştur. İndikatör PCB'ler açısından en baskın bileşenler ise canlı organizmalarda en yüksek birikim potansiyeline sahip olan PCB 153 ve PCB 138 bileşenleridir. Üç tane bileşene ilişkin geri kazanımlar % 50'den düşük olarak tespit edilmiş olup, problemin kaynağı tam olarak tespit edilememiştir ancak hesaplamada izotop dilusyon tekniği kullanıldığı için bu durum sonuçlar üzerine olumsuz etki etmemektedir. Tüm bileşenlerin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Elde edilen PCDD/F ve dioksin benzeri PCB değerleri Çakıroğulları ve diğ. (2010)'nin elde ettiği değerler ile benzerlik gösterirken, dioksin benzeri PCB değerleri ise Carubelli ve diğ. (2007)'den düşük bulunmuştur. Benzer şekilde indikatör PCB değerleri de Pinto ve diğ. (2007) ve Çakıroğulları ve diğ. (2010)'nin elde ettiği değerlerden düşük bulunmuştur.

Fileto levreklerde tespit edilen dioksin ve dioksin benzeri PCB konsantrasyonları "Commission regulation EC No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs"da (EC 2006) ve ülkemiz mevzuatında (TGK, 2008) balıklar için belirtilen limitler olan ve sırasıyla dioksinler ve dioksinler ile dioksin benzeri PCB'lerin toplamı için tanımlanmış 4 ve 8 pg WHO-TEQ₍₁₉₉₈₎/g yağ ağırlık değerlerinden düşük olarak bulunmuştur.

Dioksin/furan ve PCB'ler açısından en riskli ürün grupları doğal ortamdan yakalanan veya çiftlik koşullarında yetiştirilen su ürünleridir (Chamley ve Doull 2005). Çiftlik balıklarında kontaminasyonun en önemli kaynağı yemdir (Loizeau ve diğ. 2001, Antunes ve Gil 2004). Balık yemlerinin büyük bir çoğunluğunu balık unu ve yağı oluşturduğu için kontaminasyon riski yüksektir. Ancak yapılan araştırmalar göstermiştir ki balık yemleri kontrol altında tutulduğu süreçte çiftlik balıklarının risk potansiyeli doğal yaşamdan yakalanan balıklara göre daha düşüktür (EFSA 2005, Carubelli ve diğ. 2007, Fernandes ve diğ. 2009).

Tablo 1. Levrek fileto örneğinin PCDD/F, dl-PCB ve indikatör PCB konsantrasyonları

Kaynak	Ege Denizi-Çiftlik Balığı			
% Yağ	7.31			
Balık sayısı (adet)	20			
Bileşen IUPAC no.	Konsantrasyon pg g ⁻¹ yaş ağırlık	pg WHO-TEQ ₍₁₉₉₈₎ g ⁻¹ yaş ağırlık (u.b.)*	Tespit limiti (pg g ⁻¹ yaş ağırlık)	Geri Kazanım (%)
2,3,7,8-TCDF	0.2982	0.0298	0.03	76.7
1,2,3,7,8-PeCDF	0.0698	0.0035	0.021	80.6
2,3,4,7,8-PeCDF	0.1254	0.0627	0.022	76.8
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.0261	0.0026	0.019	93.9
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.0199	0.0020	0.019	79.7
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.0165	0.0020	0.02	75.8
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.0184	0.0024	0.024	98
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.0266	0.0003	0.012	67.6
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.0115	0.0001	0.014	75.8
OCDF	0.0606	0.0000	0.05	70.1
2,3,7,8-TCDD	0.0217	0.0250	0.025	75.3
1,2,3,7,8-PeCDD	0.0407	0.0407	0.038	87.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.02	0.0020	0.02	69
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.0174	0.0023	0.023	32.3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.028	0.0028	0.028	72.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.1962	0.0020	0.025	63
OCDD	1.0133	0.0001	0.051	76.7
PCB81	0.9979	0.0001	0.038	61.7
PCB77	26.9183	0.0027	0.034	71.8
PCB126	7.0975	0.7098	0.047	80.9
PCB169	0.9105	0.0091	0.02	75.6
PCB 123	19.4	0.0019	1.405	100
PCB 118	588	0.0588	1.386	92
PCB 114	11.3	0.0057	1.269	108
PCB 105	236	0.0236	1.56	92.2
PCB 167	181	0.0018	1.399	68.4
PCB 156	57	0.0285	1.173	85
PCB 157	15	0.0077	1.329	75.4
PCB 189	4.66	0.0005	0.466	77.9
PCB 028	204	204	1.646	119
PCB 052	319	319	0.713	115
PCB 101	679	679	1.902	86
PCB 153	1122	1122	1.409	23
PCB 138	1054	1054	0.98	85
PCB 180	302	302	0.983	45
Σ PCDD/F pg WHO-TEQ ₍₁₉₉₈₎ g ⁻¹ yaş ağırlık	0.18			
Σ İndikatör PCB pg g ⁻¹ yaş ağırlık	3680			
Σ PCDD/F-PCB pg WHO-TEQ ₍₁₉₉₈₎ g ⁻¹ yaş ağırlık	1.03			

*üst sınır konsantrasyonu

Kaynakça

- Antunes, P., and O. Gil. 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere*, 54, 1503–1507
- Bell, J.G., F. McGhee, J.R. Dick, and D.R. Tocher. 2005. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): Effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, 243, 305–314.
- Carubelli, G., R. Fanelli, G. Mariani, N. Simona, G. Crosa, D. Calamari, and E. Fattore. 2007. PCB contamination in farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from a coastal wetland area in central Italy. *Chemosphere*, 68: 1630-1635.
- Çakıroğulları, G.C., D. Kılıç, and Y. Uçar. 2010. Levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzo-*p*-furans and polychlorinated biphenyls in farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Sea Bream (*Sparus aurata*) from Turkey. *Food Control*, 21(9): 1245-1249.
- Charnley, G., and J. Doull. 2005. Human exposure to dioxins from food, 1999–2002. *Food Chem. Toxicol.*, 43(5), 671–679.
- Domingo, J.L., and A. Bocio. 2007. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: A literature review. *Environment International*. 33: 397-405.

- EC (European Commission). 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels certain contaminants in foodstuffs. L 364 5-L 364 24 p.
- EFSA. 2004. Scientific Colloquium Summary Report. Dioxins. Methodologies and principles for setting tolerable intake levels for dioxins, furans and dioxin-like PCBs. 28-29 June 2004, Brussels, Belgium. European Food Safety Authority. Pp: 130.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the CONTAM panel related to the safety assessment of wild and farmed fish. www.efsa.eu Accessed 05.06.07.
- Fernandes, A. R., Mortimer, D. N., Rose, M., Knowles, T. G., White, S., & Gem, M. 2009. Occurrence of dioxins (PCDDs, PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in wild, farmed and processed fish, and shellfish. Food Addit. Contam: Part B, 2(1), 15–20.
- Jacobs, M., J. Ferrario, and C. Byrne. 2002. Investigation of polychlorinated dibenzop-dioxins, dibenzo-p-furans and selected coplanar biphenyls in Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), Chemosphere, 47: 183-191.
- Kulkarni, P.S., J.G. Crespo, C.A.M. Afonso. 2008. Dioxins sources and current remediation Technologies-A review, Environ. Int., 34: 139-153.
- Loizeau, V., A. Abarnou, P. Cugier, A. Jaouen-Madoulet, A.M. Le Guellec, and A. Menesguen. 2001. A model of PCB bioaccumulation in the sea bass food web from the Seine Estuary (eastern English Channel). Mar. Pollut. Bull., 43, 242–255.
- Pinto, B., S.L. Garritano, R. Cristofani, G. Ortaggi, A. Giuliano, R. Amodio-Cocchieri, T. Cirillo, M.D. Giusti, A. Boccia, and D. Reali. 2007. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed sea food. Environ. Monit. Assess., DOI 10.1007/s10661-007-0007-6.
- Smedes, F., and T.K. Thomasen. 1996. Evaluation of the bligh and dyer lipid determination method. Marine Pollution Bulletin, 32 (8/9): 681-688.
- Traag, W.A., J. Immerzeel, C. Onstek, C. Kraats, M.K. Lee, G. Van der Weg, H. Mol, and L.A.P. Hoogenboom. 2008. Automation of chemical analysis of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, indicator PCBs and polybrominated diphenyl ethers in food and feed. Organohalogen compounds, 70: 54-57.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi), 2008. Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ. Yayımlandığı resmi gazete: 17.05.2008-26879. Tebliğ no: 2008/26.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1994. Method 1613, Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS. United States Environmental Protection Agency. Office of water (4303). 86 p., United States of America.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1999. Method 1668, Revision A: Chlorinated Biphenyl Congeners in water, soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS. United States Environmental Protection Agency. Office of water (4303). EPA No. EPA-821-R-00-002. 127 p., United States of America.
- WHO, Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and dibenzofurans, Environmental Health Criteria 88, United Nations Environment Programme and The World Health Organization, GENEVA, (1989). Pp 409.