

Elmalarda Chlorpyrifos'un QuEChERS Analiz Yöntemi ile Metot Validasyonu

Ahmet Durmaz¹, Osman Tiryaki^{2*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma ABD

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü

28.03.2018 Geliş/Received, 07.09.2018 Kabul/Accepted

Özet

QuEChERS metodu ile “Golden Delicious” ve “Starking Delicious” elma çeşitlerinde chlorpyrifos etken maddenin kalıntı analizi için 0.05, 0.5 ve 5.0 mg/kg seviyelerinde zenginleştirme yapılarak validasyon gerçekleştirilmiştir. Analizler yapıldıktan sonra LC-MS/MS kullanılarak kromatografik ayrıştırma yapılmıştır. Matris etkisini elimine etmek için matrisli kalibrasyon (MC) kullanılmıştır. Bu yüzden, MC_{Golden D} ve MC_{Starking D} kalibrasyonları kullanılmıştır. Metodun validasyonu, gerçeğe yakınlık (accuracy), kalibrasyonun doğrusallığı, geri alım, cihaz dedeksiyon limiti, metodun tespit limiti, tekrar edilebilirlik ve kesinlik gibi kriterler ile gerçekleştirilmiştir. Her iki çözücü kalibrasyon kurvesi ve her iki matris kalibrasyon eğrisi 5-200 pg/µl aralığında lineer olarak bulunmuştur. Golden D örneğinden geri alımı; %8.36-14.03 tekrar edebilirlik değerleri ile %70.87-112.99 arasında bulunmuştur (ortalama geri alım %89.32). Starking D elma örneği için ise geri alım; %1.96-12.88 tekrar edebilirlik değerleri ile %69.08-100.3 arasında bulunmuştur (ortalama geri alım %79.82). Tüm metodun geri alımı %15.68 relatif standart sapma ile %84.60 olarak bulunmuştur. Tüm bulgular olması gereken geri alım sınırlarına (%70-120) ve tekrar edebilirlik kabul oranı için belirtilen değerlere (RSD ≤% 20) uygundur.

Anahtar Kelimeler: matris etkisi, metot geçerliliği, pestisit kalıntısı, QuEChERS

Method Validation for the Chlorpyrifos in Apples by QuEChERS Analysis Method

Abstract

QuEChERS method was validated using “Golden Delicious” and “Starking Delicious” apples, fortified with 0.05, 0.5 and 5.0 µg/g chlorpyrifos. Analyses were performed by QuEChERS method then chromatographic separation was performed by using LC-MS/MS. Calibration with matrix (MC) was used to compensate matrix effect. Thus MC_{Golden D} and MC_{Starking D} were used for quantification. The method validated by using following parameters; accuracy, linearity of calibration, recovery, instrument detection limit, estimated method detection limit,

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Osman Tiryaki

(e-posta: osmantiryaki@yahoo.com)

Bu çalışma ÇOMÜ BAP Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2014-389

Bu makale Ahmet Durmaz'ın Yüksek Lisans tezinin bir bölümünden yazılmıştır.

repeatability and precision. Calibration curve of solvent and both matrix matched calibration curve were the linear over the range of 5–200 pg/µl. Recovery of chlorpyrifos from Golden D apples were between 70.87–112.99% (mean recovery 89.32%) with the repeatability of 8.36–14.03%. Similarly recovered chlorpyrifos from Starking D apples ranged between 69.08–100.3% (mean recovery 79.82%) with the repeatability of 1.96–12.88%. For overall recovery of the procedure was 84.60% (RSD= 15.68%). These all figures comply with the determined values for average recovery limits (70–120%) and precision (RSD ≤ 20%).

Keywords: matrix effect, method validation, pesticide residue, QuEChERS

1. Giriş

Pestisit kalıntısı analizleri için, herhangi bir örnek matrisi için geliştirilmiş metodun, o laboratuvarında, doğru sonuç verdiğinin doğrulanmasına metod validasyonu (MV) denir. Metod validasyonu analist için sigortadır. ISO 17025 ve OECD-GLP sistemlerine göre, geçerliliği kanıtlanmış metotlarla kalıntı analizlerini yapmak bir zorunluluktur (Tiryaki ve Baysoy, 2006).

Analiz metodunun, geçerliliğinin bazı metod performans kriterleriyle valide edilmesi gerekir. Yöntemin geçerliliği doğrulandıktan sonra gerçek numunelerle analizlere başlanmalıdır. Bir analiz prosedürü uluslararası literatürde geçerli kılınsa bile, o prosedür çalışılan laboratuvarında aynı sonucu vermeyebilir. Bu MV parametreleri değerleri, literatürden diğer laboratuvarlardan kopya edilemez (Tiryaki, 2011; SANTE, 2017). Bir metod AOAC resmi metodu olsa da o metodunun kendi laboratuvar koşullarında MV parametre değerleri SANTE (2017) limitleri ile uyumlu olmalıdır. Birçok MV performans kriterleri vardır. Bunlar, geri kazanım, gerçeğe yakınlık, doğrusalık, kesinlik, tespit limiti (LOD), hesaplama limiti (LOQ), hassasiyet, örnek matrisinin etkisi, hedef ve özgüllük olarak sıralanabilir (Ambrus, 2004; Tiryaki, 2011).

Pestisitlerin yan etkilerinin kontrolü için gıdalarda bulunması tolere edilebilecek en fazla kalıntı miktarı (MRL) çeşitli kurum ve kuruluşlar tarafından belirlenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda Tarım Örgütü (FAO) ve AB bünyesinde bulunan Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission, CAC) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA), gibi kurumlar limitleri belirlemektedir. Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı, EPA'nın yayınladığı chlorpyrifos-ethyl'in etkileri raporu ve AB birliğinin 9 Ocak 2016 da yayınladığı, 10 Ağustos 2016 da yürürlüğe girdiği direktifleri ile elma için 0.5 mg/kg olan maksimum kalıntı limitini (MRL) 50 kat düşürerek 0.01 mg/kg düzeyine çekmiştir. Oluşabilecek riskleri dikkate alan ülkemizdeki ilgili kurumumuz, chlorpyrifosun meyvedeki ve sebzedeki kullanım ruhsatını 08 Nisan 2016 tarihinde iptal etmiştir (Anonim, 2016). Bu çalışma, söz konusu pestisit yasaklanmadan önce yapılmıştır (Durmaz, 2016).

Pestisit kalıntı analizlerinde son yıllarda en fazla kullanılan yöntem “QuEChERS” (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) yöntemidir. Meyve ve sebzelerde farklı yapıya sahip, fazla miktarda pestisit farklı örnek matrislerde analizlerine imkan veren hızlı, zor ve pahalı olmayan, etkin, sağlam ve güvenilir metod olarak Anastassiades ve ark. (2003) tarafından tanımlanmıştır. QuEChERS metodun çok fazla geniş bir analitik kapsam içermemesi, GC ve LC'de analizi uygun bir ekstraksiyon yöntemi olması nedeniyle, çoğu kalıntı analizi yapan laboratuvarlar tarafından uygulanmaktadır.

Bu çalışma, Çanakkale tarımında önemli bir yere sahip olan elmalarda chlorpyrifos'un kalıntı analizinde uygulanacak olan QuEChERS yönteminin valide edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. İlgili metot geçerlilik kriterleri, AB SANTE kılavuzlarında konulan limitler ile birlikte değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kimyasallar ve Çözücüler

Chlorpyrifos standardı (% 99.0 saflıkta) Dr. Ehrenstorfer Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan diğer kimyasal ve reaktiflerin saflıkları şöyledir: Toluene (saflık: %99.0, LiChrosolv, Merck), asetonitril (MeCN, saflık: %99.9, Merck), NaCl (sodyum klorür, Merck), MgSO₄*7H₂O (Merck) ve Primary Secondary Amine (PSA, 40 µm, analitik grade, Varian).

2.2. Cihaz ve Gereçler

LC-MS/MS (Quadrupole Shimadzu LC-MS/MS-8040), santrifüj (Nüve NF 800, 50 ml lik santrifüj tüpüne uygun rötar), mikrosantrifüj (Eppendorf 5418, 1.5 ml Eppendorf tüpüne uygun rötar), hassas terazi (Shimadzu ATX224, ±0.0001 g), Waring blender, Vortex mikser (Velp scientifica), 1.5 ml cam GC viyali, N₂ kullanılmıştır. Ayrıca mikropipet, cam şırınga (Hamilton), Falcon tüpü (50 ml), Eppendorf tüpü (1.5 ml) ile ölçü silindiri, balon joje, tek kullanımlık pipet ve tartım kapları gibi temel araç ve gereçler analizlerde kullanılmıştır.

2.3. Standart Solüsyonun Hazırlanması

Chlorpyrifos etkili maddesinden 11.4 mg tartılmış, balon jodede 25 ml hacminde 456 µg/ml stok solüsyonu (toluene içinde) hazırlanmıştır. Stok solüsyon ışısız ortamda 4°C'de muhafaza edilmiştir. Stoktan 10 µg/ml konsantrasyonda ara solüsyon (MeCN içinde) hazırlanmıştır. Ara solüsyondan seyreltmeler yapılarak, MeCN içinde 5, 20, 50, 100, 200 pg/µl konsantrasyonlarında kalibrasyon solüsyonları yapılmıştır. Bunlar aynı zamanda çözücü kalibrasyonu (solvent calibration, SC) standartları olarak kullanılmıştır.

2.4. Elma Örneklerinin Homojenize Edilmesi ve Fortifikasyon İşlemi

Laboratuvar örneği, ilgili AB yönergesine uygun olarak alınmış, pestisit içermeyen 10 tane elma analize alınmıştır (Anonim, 2002). Elmalar küçük küçük doğranarak 1 kg örneğin blenderda homojenizasyonu yapılmıştır. Homojenizasyonu yapılan elma örneğinden 10 g'lık analitik porsiyon Falcon tüpüne konulmuştur.

Elma örneklerinin chlorpyrifos ile zenginleştirilmesinde (fortifikasyon) 09.10.2015 tarihinde maksimum kalıntı limiti (MRL) değeri olan 0.5 mg/kg değeri esas alınarak yapılmıştır. Homojenize edilmiş Golden Delicious ve Starking Delicious elmaları üzerine ayrı ayrı olarak 3 farklı spiking (zenginleştirme) düzeyinde 5 tekrarlı pestisit standart solüsyonu ilave edilmiştir (Çizelge 2.1). Hiç pestisit ilave edilmemiş olan kontrol örneği 3 paralel olarak analiz edilmiştir.

Çizelge 2.1. Elma örneklerinin MRL değerine göre fortifikasyonu

Fortifikasyon düzeyi	mg/kg	Kod
0.1× MRL	0.05	F ₁ /I-V
1.0×MRL	0.50	F ₂ / I-V
10.0×MRL	5.00	F ₃ / I-V
Kontrol Örneği	-	F ₀ /1-III

2.5. Ekstraksiyon ve Clean up

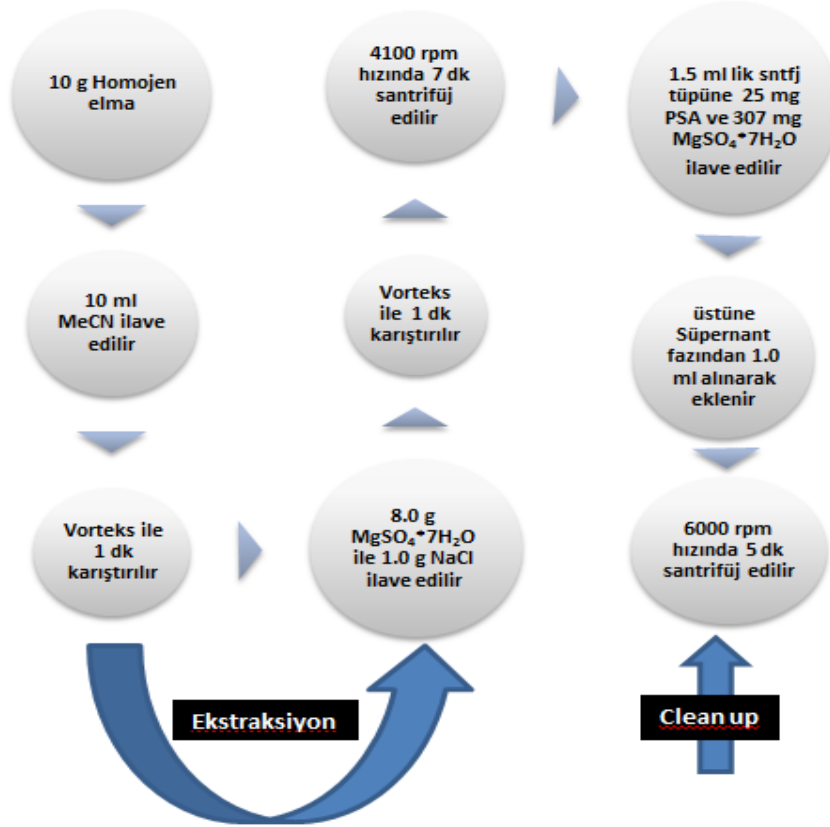
Ekstraksiyon ve clean up (ekstrakte edilen materyalden pestisit haricindeki bileşiklerin giderilmesi) işlemi için QuEChERS yöntemi kullanılmıştır. 50 ml'lik Falcon tüpü içine 10 g homojenize örnek ve 10 ml MeCN konulmuş ve 1 dak. vortekste karıştırılmıştır. Sonra üstüne 8 g MgSO₄ .7H₂O ve 1 g sodyum klorür ilave edilerek, 1 dak vorteks ile karıştırılmıştır. Karışım 7 dakika 4100 rpm hızında santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

Clean up işleminde de bir önceki aşamada elde edilen üstteki süpernatanttan 1 ml alınmış, içerisinde 25 mg PSA ve 307 mg MgSO₄ .7H₂O bulunan Eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Daha sonra karışım 1 dak. vortekslenmiş ve 5 dak 6000 rpm hızı ile santrifüjlenmiştir. 0.5 ml ekstrakt LC-MS/MS analiz için GC viyaline alınmıştır.

2.6. Kromatografik Koşullar

Kromatografik analizler ÇOMÜ Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan ve ODS-4 C₁₈ (iç çapı 150 × 4.6 mm, partikül büyüklüğü 3 µm) kolonu bağlı olan LC-MS/MS sisteminde yapılmıştır.

Kromatografik sistem pozitif ESI MRM'da çalıştırılmıştır. LC ve MS/MS sisteminin çalışma koşulları şöyledir: 10 mM CH₃COONH₄ + su solüsyonu (A) ve MeCN solüsyonu (B) hareketli fazı oluşturmuştur. Gradient programı; başlangıç %30 B/%70 A'da 1 dak tutulur → %50B/%50 A'da 1 dak tutulur → %90 B/%10A'da 2 dak tutulur → 50% B/50 %A'da 5 dak tutulur → %30 B/%70 A'da 6 dak tutulur. 10 µL'lik enjeksiyon hacmi, 40°C'lik fırın sıcaklığı, 15 dak toplam elusyon zamanı, 8.3 µl/sn hareketli faz akış hızı, 50 µl/sn spreyleme gaz akış hızı, 400°C ısı blok sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı ve 3.5 kV ESI voltaj parametreleriyle çalışılmıştır. Şekil 2.1.'de QuEChERS prosedürünün tüm analiz aşamaları açıklanmıştır.



Şekil 2.1. QuEChERS Analitik yöntemin işlem şematik akış diyagramı.

2.7. Metot Validasyonu

Metot, her iki elma matrisi için fortifikasyon yapılarak valide edilmiştir. Her paralel analitik porsiyondan da 3 tekrarlı örnek GC viyaline alınmıştır. Thompson ve ark (2002)'nün yaklaşımı ile analiz prosedürünün tekli laboratuvar metot validasyonu yaklaşımına göre validasyonu yapılmıştır. Metodun performansının değerlendirilmesi aşağıda belirtilen validasyon kriterlerine göre yapılmıştır (Kanrar ve ark., 2010).

Kalibrasyonun doğrusallık değerlendirilmesi yapılmıştır. Herhangi bir kalibrasyon eğrisinde x ve y değerleri arasında doğrusal bir ilişki vardır diyebilmek için, başka bir ifade ile kalibrasyonun doğrusallığı için, sadece korelasyon katsayısının (r değerinin) 0.99 olması yeterli değildir. Oransal kalıntısız standart sapma (Relative Residual Standart Deviaton, $S_{\Delta y/y}$) değeri de 0.1'i aşmamalıdır. Çalışmamızda bu hesaplama Eşitlik 1'e göre yapılmıştır (Ellison, 2006; Gonzales ve ark., 2006; Huber 2004; Miller ve Ambrus, 2005; Tiryaki, 2006).

$$S_{\Delta y/\hat{y}} = \sqrt{\frac{\sum(Y_{rel,i} - \bar{Y}_{rel})^2}{n-2}} \quad (1)$$

Eşitlikteki $n-2$, SD ni, $S_{\Delta y/y}$ ise oransal kalıntısız standart sapmayı göstermektedir.

Tespit limiti değerlendirilmesi, metot dedeksiyon limitine göre yapılmıştır. Cihazın dedeksiyon limiti (IDL) için seçilen kromatografik sistemde belirlenen analizde güvenilir bir şekilde tespit edilebilen saf pestisit standardının en az miktarıdır. Chlorpyrifos standardının dedeksiyon limiti cihazın kendi programı vasıtasıyla hesaplanmış ve ayrıca Eşitlik 2 ile 200 pg/ml

konsantrasyonda chlorpyrifos çözeltilisinden 10 tekerrürlü enjeksiyon yapılarak hesaplanmıştır (Singh ve ark., 2007).

$$IDL \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = SD \times t_{95} \quad (2)$$

Eşitlikteki SD, pik alanlarının standart sapması, t_{95} ise %95 güven düzeyinde T değeridir.

Metot dedeksiyon limiti (EMDL), chlorpyrifos'un, belirli bir örnekte ve belli bir yöntem ile tayin edilen yaklaşık en az konsantrasyonu olarak tanımlanır. EMDL, Eşitlik 3' te gösterdiği gibi hesaplanmıştır (Singh et ve ark., 2007).

$$EMDL \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \frac{IDL \times 100 \times V}{M \times REC\%} \quad (3)$$

Eşitlikteki M örneğin miktarını (g) ve % REC de uygulanan yöntem ile chlorpyrifos'un ortalama geri kazanım oranını göstermektedir. V kromatografik sisteme enjekte edilen hacimdir (ml).

Matrisin oluşturduğu etki; elma örneğinden gelen herhangi bir bileşiğin pestisit konsantrasyonu üzerine oluşturduğu etkidir (SANTE, 2017). Matris etkisi tamamen engellenememektedir. % matris etki, Eşitlik 4 ile hesaplanır (Kanrar ve ark., 2010). Bulunan değer negatif olması kromatografik cihazlarda kromatografik tepkinin baskılanması, pozitif değerde olması ise kromatografik cihazlarda kromatografik tepkinin artışı anlamına gelir.

$$ME, \% = \frac{(Matrisli pik alanı - Solventli pik alanı) \times 100}{Solventli pik alanı} \quad (4)$$

SC-MC_{Golden D} ve SC-MC_{Starking D} veri çiftleri arasındaki farklılığın önemi Student t testi ile araştırılmıştır (Anonim, 1999) (Eşitlik 5 ve 6).

$$t = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_D} \quad (5)$$

d_i farklılıkların ortalamasını, SD ise farklılıkların ortalamasının standart sapmasını gösterir.

$$S_D = \sqrt{\left[\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1} \right]} \quad (6)$$

$n-1$ serbestlik derecesini, n ise veri çiftleri adedini gösterir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Kalibrasyonun Doğrusallığı

Chlorpyrifos'un kalibrasyon eğrileri SC'da ve her iki elma matrisli kalibrasyonda (MC) 5–200 pg/μl arası kalibrasyon sınırlarında Excel programı kullanılarak çizilmiş ve kalibrasyon denklemi veya analitik fonksiyon hesaplanmış, relatif kalıntısız standart sapma ($S_{\Delta y/\hat{y}}$)de bulunmuştur (Çizelge 3.1). Doğrusallık matrisli kalibrasyon (MC)_{Golden D} ve MC_{Starking D} ve çözücü SC'da belirlenmiştir. MC_{Golden D} ve MC_{Starking D} ve SC eğrileri 5–200 pg/μl konsantrasyon

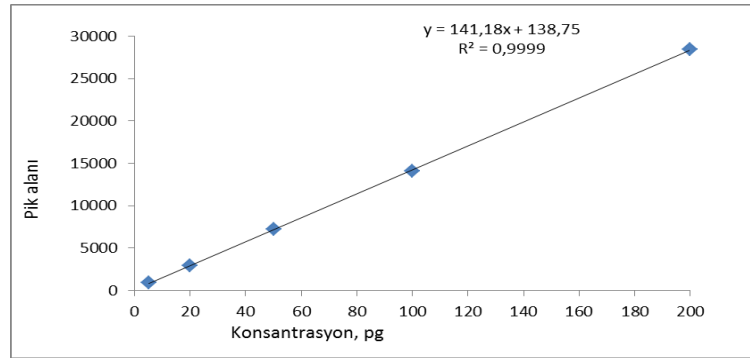
aralığında istenen sınırlarda ($S_{\Delta y/\hat{y}} = \leq 0.1$ ve $r \geq 0.999$) olduğundan doğrusaldır (Çizelge 3.1). SC ve MC'na ait kalibrasyon eğri ve denklemleri Şekil 3.1'de verilmiştir. Solvent ve her iki elma örneği ile hazırlanan kalibrasyonların denklemleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Hesaplanan r değerleri, 0.99'dan yüksektir.

Çalışmamızda kalibrasyonun doğrusallığı Eşitlik 1'e göre yapılmış ve Çizelge 3.1'de belirtildiği üzere doğrusallık limiti uygun olmuştur (Miller ve Ambrus, 2005; Tiryaki, 2006).

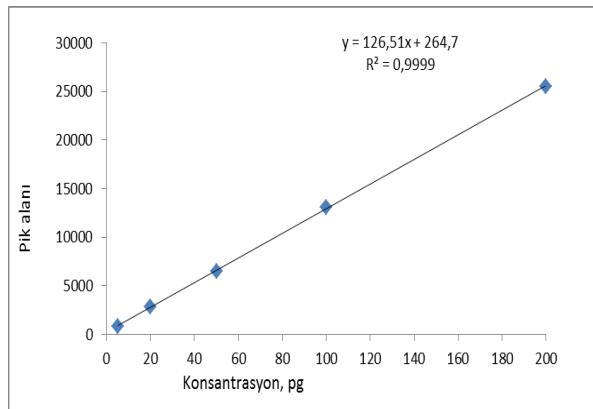
Çizelge 3.1. Chlorpyrifosun 5–200 pg/µl konsantrasyon sınırlarında çözücü (SC) ve elma matrislerindeki (MC) kalibrasyon bilgileri

Kalibrasyonun Çeşidi	Kalibrasyon/analitik fonksiyon ^a	Korelasyon sabiti	Oransal rezidüel standart sapma, $S_{\Delta y/\hat{y}}$
Solvent kalibrasyonu, SC	$y=138.75+ 141.18x$	0.999	0.074267458
Örnek matrisli kalibrasyon MC _{Golden D} (1 g/ml seq)	$y =264.7+ 126.51x$	0.999	0.098870874
Örnek matrisli kalibrasyon MC _{Starking D} (1 g/ml seq)	$y =279.4+ 127.63x$	0.999	0.095706649

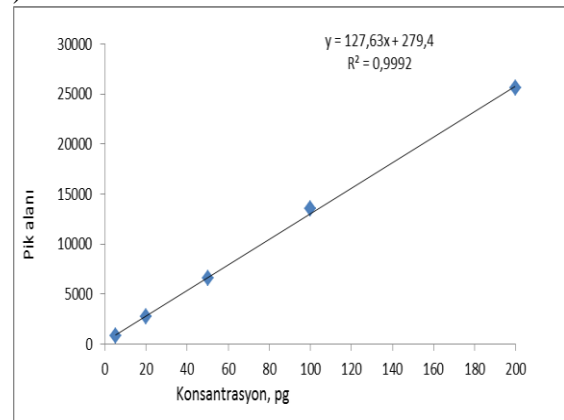
^ax= LC-MS/MS sistemine enjekte edilen miktarı, y=dedektörün pik alanı tepkisi



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.1. Chlorpyrifosun SC (a) MC_{Golden D} (b) ve MC_{Starking D} (c) ile elde edilen kalibrasyon eğrileri

3.2. Kromatografik Tekrar Edilebilirlik

Chlorpyrifos'un kromatografide alıkonma zamanları tekrarlanabilirliği MC ile değerlendirilmiştir (Rashid ve ark, 2010). Chlorpyrifos standartının kromatogramda piklerin görüldüğü alıkonma zamanları sınırları ve $MC_{Golden D}$ ve $MC_{Starking D}$ standart sapması (% RSD) ile birlikte Çizelge 3.2'de verilmiştir. $MC_{Golden D}$ ve $MC_{Starking D}$ için RSD si %0.12-0.14 arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.2. Chlorpyrifosun kromatografik tekrar edilebilirliği

Örnek Matrisi	Alıkonma Zamanı (retention time, r_t) Sınırı	Oransal Standart Sapma RSD, %
$MC_{Golden D}$	6.679-6.710	0.14
$MC_{Starking D}$	6.673-6.712	0.12

3.3. IDL ve EMDL Hesaplanması

Her iki elma matrisleri için chlorpyrifosun EMDL ve IDL hesaplanmıştır (Çizelge 3.3). Çizelge de görüldüğü üzere her iki EMDL değerinin de MRL değeri olan 0.5 mg/kg dan düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Chlorpyrifos standardının IDL ve EMDL değerleri

IDL (mg/l)* saf standart	EMDL (mg/kg) **		MRL (mg/kg)
	Örnek mat- risi $Golden D$	Örnek matrisi $Starking D$	
0.039	0.0436	0.0488	0.5

* Eşitlik 2'ye göre ; ** Eşitlik 3'e göre

3.4. Matris Etkisi (ME) ve Matrisli Kalibrasyon

Matris etkisi, matrisli kalibrasyon (MC) kullanılarak dengelenmiştir. MC hazırlamada, analize alınan örneğin örnek eşdeğeri miktarının, MC çözeltilerindeki örnek eşdeğer miktarı ile aynı olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada chlorpyrifos içermeyen kontrol elma örneğine diğer örnekler gibi aynı analitik işlemler uygulanmıştır (Tiryaki, 2011). 5, 10, 20, 50 ve 200 pg/μl konsantrasyonlarda chlorpyrifos her 2 kontrol elma ekstraktları üstüne eklenmiştir. İstenen örnek eşdeğer miktarlarına uygun solüsyon elde etmek için, N_2 gazı ile konsantre etme ya da seyreltme yapılmıştır. Matris içindeki chlorpyrifos pikleri, çözücü (MeCN) içindeki chlorpyrifos pikleri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmada $SC-MC_{Golden D}$ veri çiftinde ME değeri %9.66, $SC-MC_{Starking D}$ için ise %10.39 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4). LC-MS/MS sisteminde çözücü ve matrisli standartlardaki chlorpyrifosun (100 pg/μl) farklı tepkileri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Matris etkisinin istatistiksel olarak önemli olup olmadığı değerlendirilmesinde, Eşitlik 5 ile bulunan t değerinin, %95 güven düzeyinde ve $n-1$ SD'li (5-1) $t_{tablo 4, 0.05}$ verisi olan 2.77 den büyük olmasında fark önemlidir, küçük ise önemsizdir (Çizelge 3.4). $SC-MC_{Golden D}$ için $t_{hesaplanan}=1.86 < t_{tablo}=2.77$, $SC-MC_{Starking D}$ için $1.73 < 2.77$ dir. Çiftleri arasındaki farklar tablo değeri %95 güven düzeyinde ve $n-1$ SD'li (5-1) $t_{tablo 4, 0.05}$ verisi olan 2.77 den her iki çiftte az olduğu için matris etkisi önemsiz bulunmuştur. Ancak bazı literatürde her türlü sonuçta hesaplamaların MC kalibrasyo-

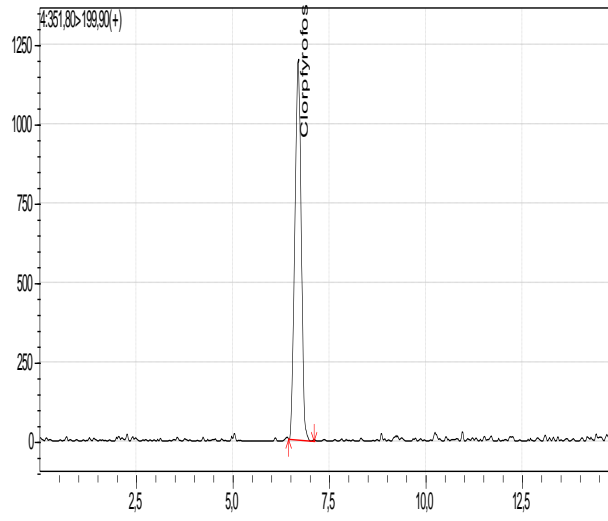
nu ile yapılması önerilmektedir. Bundan dolayı tüm değerlendirmeler ve geri kazanımlar matrisli kalibrasyonlar ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. Elma matrisi ile chlorpyrifos için oluşan matris etkisinin istatistiksel önemi

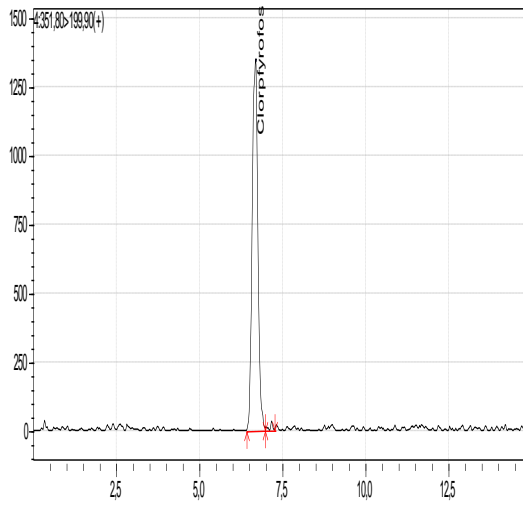
	SC-MC ^{Golden D} Karşılaştırması					SC-MC ^{Starking D} Karşılaştırması				
	Kalibrasyon Seviyeleri									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
X, enjeksiyonu yapılan miktar (pg/µl)	5	20	50	100	200	5	20	50	100	200
Y _{solvs}	952	2911	7211	14121	28443	952	2911	7211	14121	28443
Y _{matrs} (1 g/ml, örnek eşdeğeri)	860	2809	6498	13102	25497	853	2710	6553	13549	25592
Fark; Y _{matrs} -Y _{solvs} =d ₁	-92	-102	-713	-1019	-2946	-99	-210	-658	-572	-2851
Farkların ortalaması (d)	974.4					876.2				
Farkların standart sapması (SD)	1172.309387					1129.14999				
$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_D}$	1.858574759					1.735148368				
ME, %	9.66					10.39				

3.5. Geri Kazanım, Kesinlik ve Gerçeğe Yakınlık

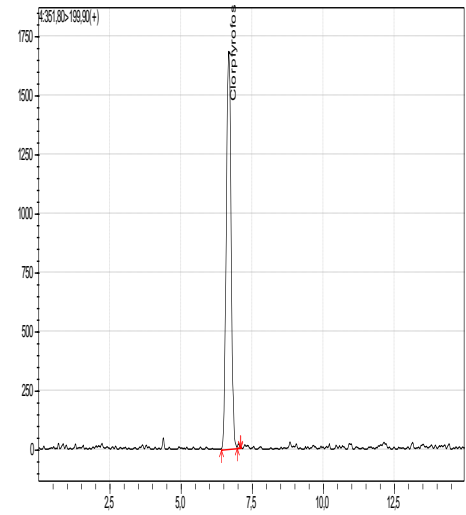
Geri kazanım testi, 2 elma çeşiti, 3 fortifikasyon düzeyi, 5 analitik porsiyon ve kromatografiye 3 tekerrürlü enjeksiyon ile toplam 90 veri ile yapılmıştır. Örnek matrisli kalibrasyonlu olarak çalışma yürütülmüştür. MC^{Golden D} ve MC^{Starking D} nin chlorpyrifos analitik fonksiyonları hesaplanması Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Her iki örnek matrisleri için QuEChERS yöntemi ile bulunan chlorpyrifos geri kazanımları ve bulunan gerçeklik (accuracy) değerleri de Çizelge 3.5’de verilmiştir. Geri kazanım oranı, geri alınan chlorpyrifos düzeyinin, uygulanan spiking düzeyine bölünmesi ile bulunur. Golden D elma örneğinde bu oran %70.87-112.99 arasında bulunmuş, ortalaması ise % 89.32 olmuştur.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.2. LC/MS sisteminde chlorpyrifosun (100 pg/µl) çözücünde (a) MC_{Golden D} (b) ve MC_{Starking D} (c) elma matrislerinde kromatogramları

Starking D örneği için ise geri kazanım oranı %69.08-100.3 arasında, ortalaması da %79.82 olmuştur. Kesinlik (precision, tekrarlanan ölçümlerin yakınlık derecesi), geri alımın RSD değeri ile nitelendirilir. Bu değer Golden D örneği için %8.36-14.03 arasında, Starking D örneği için %1.96-12.88 arasında olmuştur (Çizelge 3.5). Chlorpyrifos için tüm metodun (her iki elma matrisi ve 3 fortifikasyon seviyesi) geri kazanımı %84.60, RSD si ise %15.68'dir (n=90). Geri kazanım oranları gerekli olan aralığa (%70-120) ve tekrar edilebilirlik (repeatability) kabul oranı da gerekli olan değere (RSD ≤%20) uygun bulunmuştur (SANTE, 2017).

Aksu (2007) ve Aysal ve ark. (2007) yaptıkları çalışmalarda geri kazanım oranlarını SANTE (2013) limitleri ile uyumlu bulmuşlardır. Ayrıca Lehotay ve ark. (2005), Lesueur ve ark. (2008), Vryzas ve ark. (2008) ve An ve Shin (2011) yaptıkları çalışmalarda, sırasıyla, %95±10 arasında, %70-110 arasında, %60-110 arasında ve %76.40-120 arasında geri kazanım oranı bulmuşlardır. Bu değerler yukarıda belirtildiği gibi SANTE (2013) de verilen geri kazanım oranları ile uygunluk göstermektedir.

Çizelge 3.5. QuEChERS yöntemiyle gerçekleştirilen geri kazanım testinde chlorpyrifos için bulunan, geri kazanım, RSD ve gerçeklik verileri

Fortifikasyon mg/kg	Kod	Matriks _{Golden D}					Matriks _{Starking D}						
		Bulunan, mg/kg	Geri alım Q, %	SD	RSD %	Gerçeklik %	Bulunan, mg/kg	Geri alım Q, %	SD	RSD %	Gerçeklik %		
0,05	F _{1/I}	0.0488	87.68	7.35	9.47	77.65	0.0361	72.18	1.37	1.96	70.34		
	F _{1/II}	0.0354	70.87				0.0345	69.08					
	F _{1/III}	0.0357	71.41				0.0356	71.31					
	F _{1/IV}	0.0414	82.78				0.0350	70					
	F _{1/V}	0.0375	75.51				0.0345	69.11					
<i>Ortalama</i>	F ₁	0.0388	77.65										
0,50	F _{2/I}	0.4674	93.48	12.25	14.03	87.32	0.4125	82.48	10.09	12.88	78.32		
	F _{2/II}	0.3793	75.87				0.3493	69.87					
	F _{2/III}	0.3820	76.41				0.352	70.41					
	F _{2/IV}	0.5245	104.9				0.4697	93.95					
	F _{2/V}	0.4295	85.9				0.3745	74.9					
<i>Ortalama</i>	F ₂	0.4366	87.32										
5,00	F _{3/I}	5.647	112.9	8.61	8.36	102.99	5.015	100.3	7.89	8.70	90.79		
	F _{3/II}	4.999	99.98				4.299	85.98					
	F _{3/III}	5.32	106.4				4.702	94.05					
	F _{3/IV}	5.285	105.7				4.686	93.72					
	F _{3/V}	4.4985	89.97				3.9985	79.97					
<i>Ortalama</i>	F ₃	5.1496	102.9										
Geri alımların ortalaması		89.32				11.75				79.82		7.42	
Tüm metodun geri alım (n:90): %84.60				RSD: %15.68									

Sonuç

Metot validasyonu ISO 17025 ve OECD-GLP kalite sistemlerinde vazgeçilemeyen bir gerekliliktir. Pestisit kalıntı analizlerinde kullanılan tüm metotlar rutin örnek analizlerinden önce valide edilmelidir. Herhangi bir metot çok modern laboratuvarlarda kullanılsa bile, MV iç-kontrol için bir zorunluluktur. Çalışmada Golden D ve Starking D örnekleri chlorpyrifos ile 3 farklı seviyede spike edilerek 5 tekrarlı analiz edilmiştir. Geri alım (%), kesinlik (%RSD), gerçeklik, doğrusalılık (kalibrasyon ve analitik fonksiyon) gibi bazı MV parametreleri olması gereken SANTE limitleri içinde olmuştur. Bu çalışma QuEChERS metodunu uygulayıp, LC-MS/MS ile analizlerin yürütülmesi ile elmalarda chlorpyrifos kalıntı analizlerinin yapılabilmesi için beklentileri karşılamış ve amacına ulaşmıştır.

Teşekkür

Bu tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2014-389.

Kaynakça

- Aksu P., 2007. Meyve ve Sebzelerdeki Pestisit Kalıntılarının Tayininde Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi (GC/MS) ile Çoklu Kalıntı Analiz Yönteminin Geliştirilmesi. s:379.
- Ambrus A., 2004. Reliability of Measurements of Pesticide Residues in Food. Accreditation Quality Assurance, 9: 288-304.
- An E.M., Shin H.S., 2011. Gas Chromatographic Determination of Pesticide Residues Using Electron-capture Detector and Mass Spectrometry. Food Science and Biotechnology 20 (5): 1299-1306.
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce. Journal of AOAC International 86:412–431.
- Anonim, 1999. AOAC/FAO/IAEA/IUPAC., Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals Expert Consultation Meeting, Miskolc, Hungary. 21 February 2016, http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val_guide.pdf.
- Anonim, 2002. Community Methods of Sampling for The Official Control of Pesticide Residues in and on Products of Plant and Animal Origin and Repealing. Commission Directive 79/700/EEC. <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es2002-63.pdf>
- Anonim, 2016. Aydın Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü. <http://aydin.tarim.gov.tr/Duyuru/138/Bakanligimizca-Chlorpyrifos-Ethyl-Aktif-Maddesi-Iceren-Urunler-Yasaklandi>. Erişim: 01.06.2016
- Aysal P., Ambrus A., Lehotay S.J., Cannavan A., 2007. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. Journal of Environmental Science and Health Part B 42: 481-490.
- Durmaz, 2016. Elmalarda QuEChERS Yöntemi ile Chlorpyrifos Analizi İçin Metot Validasyonu. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, (Basılmamış), Yüksek Lisans tezi,s.52
- Ellison S., L. R., 2006. In Defence of Correlation Coefficient. Accred. and Qual. Assurance, 11: 146-152.
- Gonzales A.G., Herrador M.A., Asuero A.G., Sayago A., 2006. The Correlation Coefficient Attack Again. Accred. and Qual. Assurance, (11): 256-258.
- Huber W., 2004. On the Use of Correlation Coefficient for Testing the Linearity of Calibration Function. Accred. and Qual. Assurance, 9:726.
- Kanrar B., Mandal S., Bhattacharyya A., 2010. Validation and Uncertainty Analysis of A Multi Residue Method for 42 Pesticides in Made Tea. Journal of Chromatography A, 1217: 1926–1933.
- Lehotay S.J., Mařtovská K., Lightfield A.R., 2005. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. Journal of AOAC International. 88(2): 615-629.

- Lesueur C., Knittl P., Gartner M., Mentler A., Fuerhacker M., 2008. Analysis of 140 Pesticides from Conventional Farming Foodstuff Samples After Extraction with the Modified QuEChERS Method. *Food Control* 19: 906-914.
- Miller J.N., Ambrus A., 2005. Significance Test 1, Statistics in Calibration Analysis, I and II. Manual on Basic Statistics. In Lectures Database, FAO/IAEA Workshop on Introduction to QC/QA Measures in Pesticide Residue Analytical Laboratories, Seibersdorf, Vienna, Austria.
- SANTE, 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11813/2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- Rashid A., Nawaz S., Barker H., Ahmad I., Ashraf M., 2010. Development of a Simple Extraction and Clean-Up Procedure for Determination of Organochlorine Pesticides in Soil Using Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 2933–2939.
- Singh S.B., Foster G.D., Khan S.U., 2007. Determination of Thiophanate Methyl and Carbendazim Residues in Vegetable Samples Using Microwave-Assisted Extraction. *Journal of Chromatography A* 1148: 152–157.
- Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R., 2002. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure and Applied Chemistry* 74(5): 835–855.
- Tiryaki O., Baysoy D., 2006. Estimation of Sample Processing Uncertainty for Chlorpyrifos Residue in Cucumber. *Accreditation and Quality Assurance* 10 (10): 550-553.
- Tiryaki O., 2006. Method validation for the analysis of pesticide residues in grain by thin-layer chromatography. *Accreditation and Quality Assurance*, 11(10):506-514.
- Tiryaki O., 2011. Pestisit Kalıntı Analizlerinde Kalite Kontrol (QC) ve Kalite Güvencesi (QA) Nobel Yayın No: 1635, Fen Bilimleri: 116, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:73.
- Vryzas Z., Myresiotis C., Papadakis E., Kyrgidou A., Papadopoulou- Mourkidou E., 2008. Tobacco Matrix Effect in Carbamate Residues Analysis. Annual Conference of the Mediterranean Group of Pesticide Residue (MGPR); Chemicals and their Residues in Food and Water: New Scenarios of the Modern Sustainable Agricultural Production, Proceedings Book, Piacenza-Italy. 58 p.