

Mankozeb Kalıntılarının Domates Matrisinde GC-MS Kullanılarak Tanımlanması

Mehmet Fatih Cengiz, Muharrem Certel

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 04.01.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 01.03.2012

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): fcengiz@akdeniz.edu.tr (M.F. Cengiz)

☎ 0 242 310 65 71 📠 0 242 227 45 68

ÖZET

Ditiyokarbamatlı pestisitler, Avrupa Birliği ülkelerinde domateslere sıklıkla uygulanan pestisitler grubunda ikinci sırada yer almaktadır. Bu gruptaki pestisitlerin toksikolojik önemi ısı uygulamalarıyla dönüştükleri kanserojenik etilenitiyoüre ile ilişkilidir. Ditiyokarbamatlı pestisitlerin sudaki çözünürlüklerinin oldukça düşük olması, kararsız ve polimerik yapıda bulunmaları, doğrudan analiz edilmelerini güçleştirmekte ve bu nedenle bu pestisitler sıcak asit varlığında karbondisülfide dönüştürülerek analiz edilmektedir. Literatürde ditiyokarbamat analizlerinde suda çözünürlüklerinin daha yüksek olması nedeni ile bu gruptan maneb ve thiuramdisülfidin referans pestisitler olarak alındığı belirlenmiştir. Mankozeb, bu grubun en fazla kullanılan ve kalıntısını içeren tarım ürünlerine ısı işlem uygulanmalarıyla en fazla etilenitiyoüreye dönüşüm oranına sahip pestisittir. Bu nedenle bu çalışmada mankozeb referans alınarak kütle spektrometri dedektörlü gaz kromatografisi (GC-MS) sisteminde tanımlanmış ve bazı metod validasyon parametreleri uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre metodun doğrusal aralığı 0.063–6.316 mg/L, geri kazanımı %98.5±1.5, kesinlik (RSD) %7.7, tayin ve ölçüm sınırı sırasıyla 0.013 ve 0.043 mg/L olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mankozeb, Pestisit kalıntısı, Domates, Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi

Determination of Mancozeb Residues in Tomato Matrix by GC-MS

ABSTRACT

Dithiocarbamate pesticides are the second widely used group of pesticides on tomatoes in the European Union countries. The main toxicological concern of this group of pesticides is associated with their conversion to carcinogenic ethylenethiourea after thermal treatments. The analysis of dithiocarbamate pesticides may be complex because of their low solubility in water, unstable and polymeric structure. Therefore, prior to analysis, these pesticides are usually converted into carbon disulfide form through hot acid digestion. In the literature, maneb and thiuramdisulfite are used as reference pesticides in dithiocarbamate analysis due to their high solubility in water. In this study, mancozeb was used as a reference in gas chromatography with mass spectrometry system because it has the highest conversion rates to ethylenethiourea in the agricultural products with its residues by thermal treatments, and it. Results were evaluated by method validation techniques. Results indicated that linear dynamic range was 0.063-6.316 mg/L, percent recovery was %98.5±1.5, precision was %7.7 while the limit of detection and the limit of quantification were 0.013 and 0.043 mg/L, respectively.

Keywords: Mancozeb, Pesticide residue, Tomato, Gas Chromatography Mass Spectrometry

GİRİŞ

Son yıllarda, insan ve çevre sağlığını korumaya yönelik hassasiyetlerin artması ve uluslararası ticarete gıda güvenliğini sağlamaya yönelik yasal yaptırımların derinleşmesi; gıda maddelerinin daha sık, daha hassas ve kapsamlı analizlere tabi tutulmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çerçevede özellikle toplumun sıklıkla tükettiği gıda maddelerinde kalıntılarının sıklıkla rastlanılan pestisitlerin hedef olarak alınması riskin daha aza indirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Günlük diyetle sıklıkla tüketilen gıda maddeleri değerlendirildiğinde, domates (*Lycopersicon esculentum*) ve ürünlerinin önemli bir yerinin olduğu açığı görülmektedir. Ülkemiz, 2010 yılı rakamlarına göre; 10,052,000 ton domates üretimi ile dünya domates üreticisi ülkeler arasında Çin, ABD ve Hindistan'dan sonra dördüncü sırada bulunmaktadır [1]. Aynı zamanda Türkiye örtü altı sebze üretiminde de en fazla üretim alanı bulan domates, üretimi sırasında hastalıklara direnç ve verim artışının sağlanması için, pestisitlerin sıklıkla kullanılmasından dolayı pestisit maruziyeti açısından riskli gıda maddelerinin başında gelmektedir [2].

Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde domates üretiminde en fazla kullanılan tarım ilaçları incelendiğinde ilk sırayı 1.37 kg ai/ha kullanım miktarı ile toprak sterilantları alırken, ikinci sırada 1.23 kg ai/ha kullanım miktarı ile ditiyokarbamatlı (DTC) pestisitler bulunmaktadır [3]. DTC'lar, fungusitlerin en önemli üyesi olup, aynı zamanda ülkemizde en çok kullanılan 7 fungusidin 4'ü (mankozeb, propineb, thiram ve maneb) bu grupta yer almakta olup, 2006-2008 yılları arasında en fazla satılan pestisitler arasında mankozeb, thiram ve propinebin bulunduğu belirtilmektedirler [4, 5].

Avrupa ülkelerinde (25 AB üyesi devlet, Norveç, İzlanda ve Liechtenstein) bitkisel kaynaklı ürünlerde ulusal tarım ilacı kalıntısı izleme programları 2005 raporunda en fazla kalıntı sınırının (MRL) üzerinde tespit edilen tarım ilaçları incelendiğinde, DTC'lı tarım ilaçlarından olan maneb grubunun (mankozeb, maneb, metiram, zineb ve propineb) dimethoat'tan sonra en sık rastlanan grup olduğu görülmektedir [6]. Ülkemizde domateslerde bulunması gereken DTC kalıntısı 3 mg/kg (mankozeb ve propineb) olarak sınırlandırılmıştır [7].

Gıda maddelerinde DTC kalıntılarının ana toksikolojik önemi; deney hayvanları üzerine yapılan çalışmalarda kanserojenik ve teratojenik etkileri olduğu bilinen ve bu tarım ilaçlarının metaboliti veya bozunma ürünü olan etilentiyoüre (ETU) ile ilişkilidir [8]. Dönüşüm mekanizmaları üzerine yapılan bu çalışmalardan elde edilen bilgilere göre ETU'nin açığa çıkmasında en etkili yolun, DTC kalıntısı içeren meyve ve sebzelerin ısı işleme tabi tutulmasının olduğu görülmektedir [9-12]. Bu nedenle domates gibi sıklıkla ısı işleme tabi tutulan bir gıda maddesinde DTC kalıntılarının bulunması tehlike oluşturmaktadır.

DTC'lı pestisitlerin sudaki çözünürlüklerinin oldukça düşük olması, kararsız ve polimerik yapıda bulunmaları,

bu maddelerin direkt olarak analiz edilmelerini güçleştirmekte ve bu nedenle bu yöntemlerin gerçekleştirilmesi bazı türevlendirmeler yapılarak mümkün olmaktadır [13]. Türevlendirme işlemi temel olarak Keppel [14] tarafından bildirilen kalay (II) klorit varlığında DTC kalıntılarının asit ile hidrolize edilmesi ve açığa çıkan CS₂, H₂S veya aminlerin değişik teknikleri kullanılarak analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. Daha sonra geliştirilen yöntemler Keppel'in yönteminde belirtilen ana prensip esas alınarak, örnek ön işleme tekniklerinin geliştirilmesi, asit hidrolizi şartlarının en uygun hale getirilmesi, açığa çıkan karbondisülfid (CS₂), hidrojen sülfür (H₂S) ve aminler gibi analitik unsurların değişik yöntemlerle tuzaklanması ve bu analitik unsurların çeşitli enstrümantal cihazlarda tanımlanması gibi bazı modifikasyonları içermektedir [15].

Literatürde DTC'lı pestisitlerin farklı gıda matrislerindeki kalıntılarının belirlenmesine yönelik volümetrik, spektrofotometrik, kapiler elektroforetik ve kromatografik (LC-DAD, GC-FPD, GC-MS) bazı çalışmalar mevcuttur [16-20]. Cesnik ve Gregorcic DTC pestisitler grubundan thiuramdisülfid etken maddeli pestisit için çeşitli tarım ürünlerinde gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC-MS) sistemi ile yaptığı metot validasyonu çalışmasında doğrusal aralığı 0.04–5.00 mg/kg, tanımlama limitini 0.004 mg/kg tespit limitini 0.013 mg/kg ve geri kazanım oranlarını ise %96.0-111.1 olarak belirlemişlerdir [20]. Literatürde belirtilen çalışmalarda DTC'lı pestisitler kararsız ve polimerik yapıda bulunmaları nedeni ile sıcak asit varlığında CS₂'e dönüştürülerek analiz edilmektedir. Açığa çıkan CS₂ miktarı hesaplanarak örnekteki toplam DTC'lı pestisit kalıntı düzeyi bildirilmektedir. Bildirilen çalışmaların geri kazanım, ölçümleme tablosu, tayin ve tespit sınırlarının belirlenmesi gibi yöntem kısmında genelde suda çözünürlüğü ve kararlılığının yüksek olmasından dolayı bu gruptan maneb ve thiuramdisülfid gibi pestisitler kullanılmaktadır ve geçerli kılma çalışmaları bu pestisitler üzerinden yürütülmektedir. Ancak, DTC'lı pestisitler grubunda mankozeb en fazla kullanılan ve aynı zamanda kimyasal yapısı itibarı ile ısı işlem sonucu en fazla ETU'ye dönüşebilen pestisit olma konusundadır. Bu nedenle ısı işlem uygulamalarının sıklıkla yapıldığı domates örneklerindeki DTC'lı pestisit kalıntılarının mankozeb esas alınarak tanımlanmasının ve bazı metot validasyon parametrelerinin uygulanarak farklılıkların belirlenmesinin analitik belirsizliklerin tespiti açısından faydalı sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada, DTC'lı pestisitler grubunun önemli bir üyesi olan mankozebin domates matrisindeki kalıntıları CS₂'e dönüştürülerek GC-MS sisteminde tanımlanmış ve bazı metot validasyon işlemleri uygulanarak yöntemin geçerliliği değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler (Kalay (II) klorid (SnCl₂), hidroklorik asit ve isooktan) Merck KGaA Darmstadt Almanya firmasından, sertifikalı mankozeb ve CS₂ referans standart maddeleri Dr. Ehrenstorfer GmbH

(Ausborg, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan domates örnekleri kontrollü şartlar altında serada yetiştirilmiş ve araştırılan tarım ilacı açısından deneysel çalışmalar öncesi analiz edilerek bu maddelerin örneklerde bulunmadığı doğrulanmıştır.

Domates örneklerinde bulunan mankozeb kalıntılarını kütle spektrometri dedektörüne sahip Varian 220-MS GC Ion Trap cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Cihazda kromatografik ayırım için VF-5MS (Sabit faz: %5 fenil, %95 dimetilpolisiloksan; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) analitik kolon ve taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta (%99.999) helyum gazı kullanılmıştır.

Yöntem

Analitik çalışmalarda Cesnik ve Gregorcic tarafından DTC pestisitler grubunda diğer bir pestisit olan thiuramdisülfid'in çeşitli tarım ürünlerindeki kalıntı analizleri için önerilen yöntem referans olarak kabul edilmiştir. Ancak referans yöntemde analit olarak kullanılan thiuramdisülfid yerine bu çalışmada mankozeb kalıntı düzeylerinin belirlenmesine yönelik bazı metod validasyon parametreleri araştırılmış ve önerilen yöntem bazı değişikliklere uğratarak kullanılmıştır. Yöntem, kalıntı miktarı araştırılan mankozebin SnCl₂ katalizöründe asit ve sıcaklık etkisi ile yıkılıma uğratarak açığa çıkarılan CS₂'ün isooktan fazında tuzaklanması ve tuzaklanan CS₂ miktarının GC-MS cihazında tespit edilmesi esasına dayanmaktadır.

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerden olan SnCl₂ çözeltisi; 1 litrelik cam balon içinde 20 g SnCl₂ 50 mL derişik (%35-37) hidroklorik asit ile çözündürüldükten sonra cam balonun 1 L çizgisine kadar deiyonize su

ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti günlük olarak kullanılmıştır.

CS₂ standart çözeltileri; yüksek konsantrasyon 10.00 ve 5.00 orta konsantrasyon 1.00 ve 0.50 düşük konsantrasyon olarak ise 0.10 ve 0.05 ml/L düzeylerinde isooktan fazında hazırlanmıştır. Bu düzeylerin sırasıyla 12.632, 6.316, 1.263, 0.632, 0.126 ve 0.063 mg CS₂/L isooktana eşit olduğu hesaplanmıştır. CS₂ çalışma solüsyonu GC-MS cihazının analitik parametrelerin optimize edilmesi, GC-MS cihazında ölçümleme grafiğinin oluşturulması ile tekrarlanabilirlik, tayin sınırı (LoD) ve ölçüm sınırı (LoQ) gibi bazı metod validasyon parametrelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Çalışmalarda özütlemeye işleminin etkinliği ve % geri kazanım çalışmalarında kullanılan mankozeb çalışma çözeltileri (3.0, 1.5 ve 0.3 mg/L) saf su (18.2 MΩ cm, Millipore/Milli-Q) kullanılarak hazırlanmıştır.

Kalıntı Analizleri

Yaklaşık 200 g domates örneği laboratuvar tipi karıştırıcı kullanılarak yüksek devirde 3 dakika homojenize edilmiş ve 50±0.1 g ağırlığındaki homojenat amber renkli laboratuvar şişesine konularak üzerine 40 mL isooktan ve 100 ml SnCl₂ çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra laboratuvar şişesinin kapağı kapatılmış ve şişe 80°C sıcaklık ve 100 devir/dakika hızdaki çalkalamalı su banyosunda 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda laboratuvar şişesi su banyosundan alınarak oda sıcaklığına hızla soğutulmuş, üst isooktan fazından otomatik pipet yardımıyla 2 mL amber renkli bir vialle alınarak çalışma şartları Tablo 1'de verilen GC-MS cihazına 2 µL hacminde enjeksiyon yapılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kromatografik şartlar

| | |
|-----------------------------|---|
| Gaz Kromatografi cihazı | Varian 220-MS GC Ion Trap |
| Dedektör | MS |
| Kolon | VF-5MS (Sabit faz: %5 fenil, %95 dimetilpolioksan 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) |
| Enjeksiyon tipi | Manuel / Pulsed Splitless |
| Enjeksiyon bloğu sıcaklığı. | 280 °C |
| Dedektör sıcaklığı | 150 °C |
| İyon kaynağı sıcaklığı | 230 °C |
| Fırın sıcaklığı | 50 °C'de 2.2 dakika 35 °C artışla 270 °C 270 °C'de 3 dakika |
| Taşıyıcı gaz | Helyum |
| Taşıyıcı gaz akışı | 1 mL/dakika, sabit akış |
| Tanımlama | Selective Ion Monitoring (SIM) |
| Hedef iyon | 76 m/z |
| Spektral veritabanı | National Institute of Standards and Technology (NIST) |
| Enjeksiyon hacmi | 2 µL |

Analitik Performans Testleri

Örnekler üzerindeki mankozeb kalıntılarının sağlıklı bir şekilde tespit edilebilmesini sağlamak amacıyla yöntemin analitik performans testleri ile optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla; seçicilik, ölçüm aralığı, ölçüm sınırı, tespit sınırı, % geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve matris etkisinin belirlenmesi

çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar kısa adı SANCO olan Avrupa Birliği "Gıda ve Yemlerde Pestisit Kalıntı Analizine Yönelik Metod Validasyonu ve Kalite Kontrol Prosedürleri"ne göre değerlendirilmiştir [21].

Bu prosedürlerde belirtilen seçicilik; yöntemin analiti örnek matrisindeki diğer maddelerden ayrılabilme

özelliğidir. Bu amaçla mankozzeb ilave edilmiş ve edilmemiş domates homojenatları yöntem bölümünde belirtildiği şekilleriyle ayrı ayrı özütlenerek analiz edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

Ölçüm aralığı; yöntemin kesinlik, gerçeklik gibi ölçütleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır. Ölçüm aralığının belirlenmesi için CS₂'ün yüksek, orta ve düşük konsantrasyon değerlerindeki standart çalışma çözeltileri GC-MS cihazına enjekte edilmiştir ve uygulanan konsantrasyon değerleri ile bu değerlere ait elde edilen pik alanları karşılaştırılmıştır.

Ölçüm sınırı (LoQ) kabul edilebilir kesinlik (precision) ve gerçeklikle (trueness) ölçülen en düşük analit konsantrasyonudur. Tayin sınırı (LoD) ise analitin, bir "boş" örnektekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük konsantrasyon düzeyidir. Bu değerlerin tanımlanması amacıyla, CS₂ için ölçümleme eğrisindeki en düşük ölçümlenen seviyesi (LCL) olan 0.063 mg/L 10 kez analiz edilmiş ve aşağıda belirtilen eşitlikler kullanılarak tayin ve ölçüm sınır değerleri belirlenmiştir.

LoD = LCL düzeyindeki analiz sonuçlarının standart sapması x 3
LoQ = LCL düzeyindeki analiz sonuçlarının standart sapması x 10

Analitik performans testlerinin en önemli göstergelerinden birisi de % geri kazanım çalışmasıdır. Bu çalışma, matris içindeki analitin özütlenmesi ile elde edilen miktarın, analitin saf çözeltilisine göre % olarak ne kadar geri kazanıldığına analiz edilmesi olarak özetlenebilir. Yüzde geri kazanım çalışması aşağıda belirtilen formül aracılığı ile tespit edilmiştir.

% Geri kazanım = Bulunan miktar / Eklenen miktar * 100

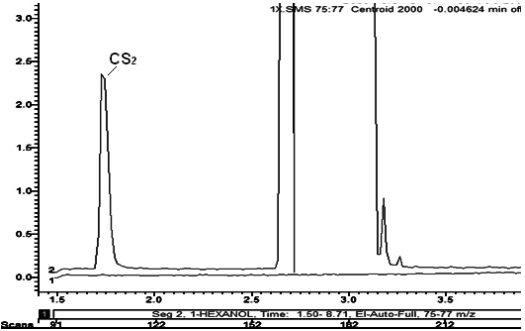
Bir diğer önemli performans testi olan tekrarlanabilirlik; bir yöntemin aynı laboratuvarında, aynı cihazla, aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Repeatability olarak da literatürde yer alan bu çalışmada tekrarlanabilirlik değeri; aynı gün içerisinde LCL düzeyi için yapılan analizlerden elde edilen sonuçların (en az 5 analiz) standart sapmaları (SD) veya bağıl standart sapmaları olarak (%RSD) ifade edilmektedir. Tekrarlanabilirlik çalışması konsantrasyon ve çıkış süresi tekrarlanabilirliği olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu değerler kullanılarak hesaplanan tekrarlanabilirlik belirsizliği ise $U_r = t_{(95;9)} \times S_r$ eşitliğine göre belirlenmiştir.

Bazı tanımlama sistemlerinde (Örn., GC, LC-MS, ELISA) belirli analitler, örnek matrisinden gelen materyallerden (co-extractive) etkilenebilir. Örnek matrisi etkisi; örnekte gelen bir veya daha fazla bileşenin analit konsantrasyonu ölçümü üzerine olan etkisidir. Mankozebin önerilen analitik yöntemle domates matrisinde doğru olarak ölçümlenebilmesi için domates matrisinden kaynaklanabilecek herhangi bir CS₂ etkileşiminin olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle matris etkisinin belirlenmesi çalışmasında öncelikle, mankozzeb içermeyen domates

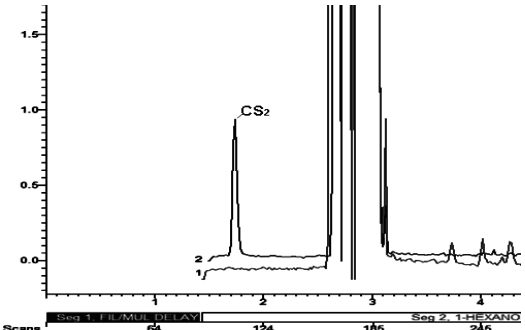
homojenatı özütlenerek matristen kaynaklanan CS₂ girişimi olup olmadığı tespit edilmiş, sonraki aşamada mankozzeb su matrisine ve domates matrisine ilave edilerek tespit edilen CS₂ miktarları ikili karşılaştırma testlerine tabi tutulmuştur. Böylelikle mankozzeb'in ilave edildiği domates homojenatının özütlenmesi sonucu elde edilen CS₂ miktarı üzerine matris kaynaklı bir etkileşimin varlığı test edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

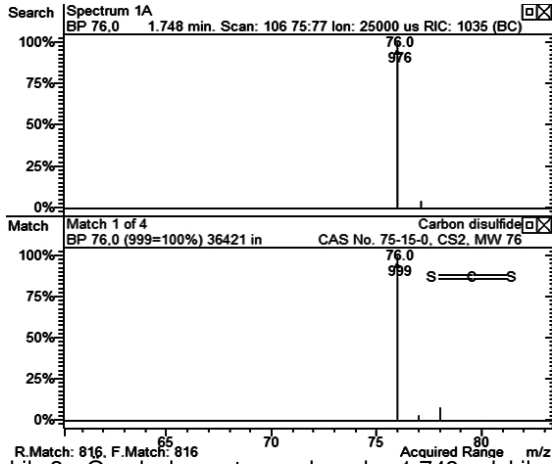
Metot performans testlerinde öncelikle sistemin analite karşı bir sinyal üretip üretmediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Analist; örnekte analitin birden fazla formda olabileceğini ve girişimlerin analitle çok benzer davranabileceğini her zaman göz önünde tutmalıdır. Bu amaçla yapılan seçicilik çalışması standart madde denemesi ve gerçek örnekle yapılan çalışmalar olarak yürütülmektedir. Çalışmada CS₂'ün standart enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogramlar (Şekil 1) ile mankozzeb içermediği tespit edilen ve 1 mg/L konsantrasyonunda mankozzeb içeren domates özütlerinin belirtilen koşullarda GC-MS cihazında analiz edilmeleriyle elde edilen kromatogramlar Şekil 2'de sunulmuştur. Aynı zamanda tüm kromatogramlarda CS₂'ün çıkış süresinde elde edilen pikler kütle tarama kütüphanesi ile eşleştirilerek piklerin CS₂'e ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3).



Şekil 1. GC-MS cihazına enjeksiyon yapılmadan (1) ve 1 mg/L CS₂ standart enjeksiyonu sonucu elde edilen (2) kromatogramlar

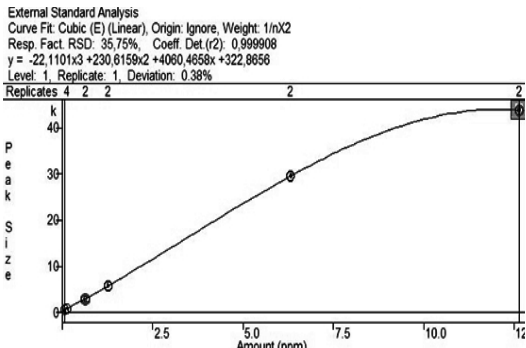


Şekil 2. Mankozzeb içermeyen (1) ve içeren (2) domateslerin özütlenmesi sonucu elde edilen GC-MS kromatogramları



Şekil 3. Örnek kromatogramlarında 1.748. dakikada çıkan GC-MS pikine ait örnek bir spektrum ve eşleşen referans CS_2 kütle spektrumu

Gıda ve yemlerde pestisit kalıntı analizine yönelik metod validasyonu ve kalite kontrol prosedürleri'ne göre bir yöntemin seçici olarak kabul edilebilmesi için kör çalışmada elde edilen değerlerin raporlama sınırı değerinin %30'undan büyük olmaması ölçütünü getirmektedir [21]. Domates özütü ile yapılan kör denemelerde belirlenen çıkış süresinde herhangi bir pike rastlanılmamıştır. Bu nedenle belirtilen analiz koşullarının domates homojenatında mankozep analizi için seçici olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. GC-MS cihazında 0.063-12.632 mg CS_2 /L aralığındaki CS_2 ölçümleme eğrisi

Analitik koşulların farklı konsantrasyon değerlerine karşı doğrusal bir sinyal üretip üretmediğinin belirlenmesine yönelik yapılan doğrusallık çalışmasında hazırlanan yüksek (12.632 ve 6.316 mg/L), orta (1.263 ve 0.632 mg/L) ve düşük konsantrasyon (0.126 ve 0.063 mg/L) değerleri ile bu değerlere ait pik alanları kullanılarak oluşturulan ölçümleme eğrisi Şekil 4'te sunulmuştur.

Elde edilen ölçümleme eğrisine göre, GC-MS cihazına uygulanan 6.316 mg/L düzeyinden sonra üretilen cevabın uygulanan konsantrasyon değeri ile doğrusal olarak artmadığı ve dolayısıyla doğrusallığın 0.063 mg/L ile 6.316 mg/L arasında olduğu sonucuna varılmıştır. Doğrusal aralıkta elde edilen ölçümleme eğrisinin matematiksel eşitliği $y = 4,391.550 x + 298.490$ ve korelasyon katsayısı $r^2 = 0.999635$ olarak belirlenmiştir.

Elde edilen doğrusal aralığın en düşük ölçümlenen düzeyinde (0.063 mg/L) yapılan paralel analizlerde (n=10) ve bu analizlerin standart sapması kullanılarak yapılan hesaplamalarda LoD ve LoQ değerleri sırasıyla 0.013 ve 0.043 mg/L olarak belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında, LCL düzeyi olan 0.063 mg/L'lik konsantrasyon GC-MS cihazına on kez enjekte edilmiş ve elde edilen verilere göre, konsantrasyon tekrarlanabilirliğinin standart sapması 0.004 ve %RSD değeri 7.673; çıkış süresi tekrarlanabilirliğinin standart sapması 0.009 ve %RSD değeri 0.498 olarak belirlenmiştir. Bu değerler kullanılarak hesaplanan tekrarlanabilirlik belirsizliği ise, konsantrasyon ve çıkış süresi için sırasıyla 0.009 mg/L ve 0.020 dakika olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, bir sonraki 0.063 mg/L konsantrasyonundaki maddenin belirtilen koşullardaki analizinden elde edilen konsantrasyonun 0.056 ± 0.009 ve çıkış süresi değerinin 1.741 ± 0.020 dakika sınırları içinde olması gerekmektedir. Bu sınır değerlerinin dışına çıktığı durumlarda kullanılan analitik yöntem ve cihaz yeniden kontrol edilerek gerekli önlemler alınmalıdır. Bu durum genel olarak, standart hazırlamadaki hatalardan kaynaklanabileceği gibi, kullanılan analitik kolonun ayırma yeteneğindeki azalma veya cihazın donanımsal hatalarından kaynaklanabilmektedir. Donanım ile ilgili hatalar, cihazın ayarlanan sıcaklık ve basınç değerlerinde olmaması, cihazda kullanılan filamentin kararsız elektronlar üreterek moleküler yapıyı uygun olmayan şekilde parçalaması, septum, liner, iyonlaşma odası, taşıyıcı gaz veya filtrelerde kirlilik unsurlarının bulunması gibi faktörlerden meydana gelebilmektedir. Ayrıca manuel enjeksiyon tekniğinin de belirtilen sınır değerlerinin dışına çıkılmasında etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Sınır değerlerinin dışına çıktığı durumlarda cihazın donanımı ile ilgili hatalar giderildikten ve manuel enjeksiyon tekniği en uygun hale getirildikten sonra kullanılan analitik kolonun ayırma yeteneği bilinen standart çözeltilerle denenmesi önerilmektedir.

Mankozep'in MRL düzeyinde yapılan % geri kazanım çalışmasında mankozep içermediği ön denemelerle belirlenen domates homojenatına son konsantrasyon 3 mg/kg olacak şekilde mankozep ilave edilmiş ve özütlenerek analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin % geri kazanımının %98.45±1.46 (n=6) olduğu hesaplanmıştır. Tespit edilen düzeyin Cesnik ve Gregorcic tarafından domates homojenatında diğer bir DTC'lı pestisit olan thiuramdisulfidin analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlara ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle mankozepin de sıcak asit hidrolizi yöntemiyle özütlenerek analiz edilebileceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda yüzde geri kazanım çalışmasından elde edilen verilere, AB "Gıda ve Yemlerde Tarım İlacı Kalıntı Analizleri için Kalite Kontrol Prosedürleri ve Metot Validasyonu" dökümanında belirtilen ölçütlere uygun olduğu belirlenmiştir.

Metodik performansın ölçülmesinde diğer önemli bir parametre olan matris etkisinin değerlendirilmesi çalışmasında mankozep içermeyen domates

homojenatına ve suya mankozeb ilave edilerek yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre; su ve domates homojenatına ait konsantrasyon düzeyleri sırasıyla 1.860 ± 0.084 ve 1.799 ± 1.112 ($n=4$) olarak belirlenmiştir. Bu değerlere uygulanan F test sonucuna göre, su ve domates homojenatı matrislerinden elde edilen verilerin varyansları arasında, t test sonucuna göre ise ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$). Dolayısıyla kullanılan analitik yöntem ve cihazla mankozeb'in domates homojenatında CS_2 'e dönüştürülerek analiz edilmesinde domates matrisinden kaynaklanabilecek bir etkileşim olmadığı sonucuna varılmıştır.

SONUÇ

Günlük diyetle sıklıkla tüketilen gıda maddelerinin başında gelen ve ülkemiz tarımsal üretiminde de büyük önem taşıyan domates; üretimi sırasında hastalıklara direnç ve verim artışının sağlanması için tarım ilaçlarının sıklıkla kullanılmasından dolayı tarım ilacı maruziyeti açısından riskli gıda maddelerinin başında gelmektedir.

Bununla birlikte, gerek günlük tüketimde, gerekse salça, ketçap, domates suyu vb. gibi endüstriyel ürünlerin üretiminde çeşitli ısı işlem uygulamaları, domateslerde sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulanan ısı işlemler DTC kalıntısı bulunan tarım ürünlerinde kanserojenik ETU oluşumuna neden olmaktadır. Bu noktadan hareketle, günlük diyetle sıklıkla tüketilen ürünlerde DTC kalıntılarının en aza indirilmesi gerekmekte olup bunun sağlanmasının bir yolu da tarım ürünlerindeki kalıntıların doğru ve güvenilir bir şekilde analiz edilmesinden geçmektedir.

Yapılan çalışmada DTC'lı pestisit grubunun önemli bir üyesi olan mankozebin domates ürünlerindeki kalıntılarının sağlıklı bir şekilde ölçümlenebilmesi amacıyla önerilen yöntem değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucuna göre elde edilen bulgular ve Avrupa Birliği "Gıda ve Yemlerde Pestisit Kalıntı Analizine Yönelik Metot Validasyonu ve Kalite Kontrol Prosedürleri"ne göre bir yöntemin geçerliliği için bildirilen bazı kriterler Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. SANCO'ya göre bazı metot validasyon parametreleri ile çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması

| Parametre | Kriter | Bulunan değer |
|-------------------------------|------------------------|--|
| Doğrusallık | Kalıntılar $< \pm\%20$ | 0.063 mg/L ile 6.316 mg/L aralığı için uygun |
| Matriks etkisi | - | F testi ve t testi sonuçlarına göre uygun |
| LOQ | \leq MRL (3 mg/L) | 0.043 mg/L ($n=10$) |
| Seçicilik | $<\%30$ LOQ | <0.013 mg/L |
| Doğruluk (% geri kazanım) | $\%70-120$ | $\%98.45 \pm 1.46$ ($n=6$) |
| Keskinlik (RSD _r) | $<\%20$ | $\%7.67$ ($n=10$) |

Elde edilen sonuçlara göre kullanılan yöntemin domateslerde mankozeb kalıntılarının tanımlanabilmesi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak DTC'lı pestisitlerin özellikle ısı işlemler gibi çeşitli gıda işleme teknikleri ile ana bileşenden daha fazla toksik özellikler gösteren ETU'ye dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle DTC'lı pestisitlerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde sadece bu maddelerin kalıntılarının değil; ETU'nin de hesaba katılması gerekmekte olup, çeşitli gıda işleme tekniklerinin ETU oluşumu üzerindeki etkilerinin toplum sağlığı adına ciddiyle araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Anonim 2012. FAO, *FAOSTAT data* [Online]. Food and Agriculture Organization, (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>) Erişim tarihi: 02 Ocak 2012.
- [2] Anonim 2007. DPT 9. Kalkınma Planı (2007-2013). Bitkisel Üretim Özel İhtisas Komisyonu Raporu, No: DPT 2713-ÖİK: 666.
- [3] Anonim 2007. The use of plant protection products in the European Union. Eurostat Statistical Books, Luxembourg. p. 215.
- [4] Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalması sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre, Ankara, Türkiye.
- [5] Delen, N., Kınay, P., Yıldız, F., Yıldız, M., Altınok, H. H., Uçkun, Z. 2010. Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşım olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongre, Ankara, Türkiye.
- [6] Anonim 2007c. European Commission Health & Consumer Protection Directorate. Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2005 Report, SEC (2007) 1411. Brussels.
- [7] Anonim 2009. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Gıdalarda Maksimum Bitki Koruma Ürünleri Kalıntı Limitleri Tebliği. Resmi Gazete, 31 Aralık 2009, Sayı: 27449.
- [8] Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D., Maltoni, C., 2002. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Annals of New York Academy of Science* 982: 123–136.
- [9] Knio, K.M., Saad, A. Dagher, S., 2000. The fate and persistence of zineb, maneb, and ethylenethiourea on fresh and processed tomatoes. *Food Additives and Contaminants* 17(5): 393-398.
- [10] Biswas, S.K., Banerjee, K., Handa, S.K., 2003. Metabolic fate of mancozeb in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Toxicological and Environmental Chemistry* 85(1-3): 33-38.

- [11] Kontou, S., Tsipi, D., Tzia, C., 2004. Kinetics of maneb degradation during thermal treatment of tomatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 1212-1219
- [12] Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2006. Urinary Ethylenethiourea as a biomarker of exposure to ethylenebisdithiocarbamates. *Pesticide Protocols* 79-89.
- [13] Lee, P.W., 2003. Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals. Volume1 and Volume 2. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex (England). 1350p.
- [14] Keppel, G.E., 1969. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 52: 162-167.
- [15] Vryzas, Z., Emmanouil, N.P., Mourkidou, E.P., 2002. Microwave-assisted extraction (MAE) acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 2220-2226.
- [16] Lowen, W.K., 1951. Determination of dithiocarbamate residues on food crops. *Analytical Chemistry* 23(12): 1846-1850.
- [17] Walash, M.I., Belal, F., Metwally, M.E., Hefnawy, M.M., 1993. Spectrophotometric determination of maneb, zineb and their decomposition products in some vegetables and its application to kinetic studies after greenhouse treatment. *Food Chemistry* 47 (4): 411-416.
- [18] Malik, A.K., Faubel, W., 2000. Capillary electrophoretic determination of zincdimethyldithiocarbamate (Ziram) and zinc ethylenebisdithiocarbamate (Zineb). *Talanta* 52: 341-346.
- [19] Van Lishaut, H., Schwack, W., 2000. Selective trace determination of dithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection, *Journal of AOAC International* 83 (3): 720-727.
- [20] Cesnik, H.B., Gregorcic, A. 2006. Validation of the method for the determination of dithiocarbamates and thiuram disulphide on apple, lettuce, potato, strawberry and tomato matrix. *Acta Chimica Slovenica* 53: 100-104.
- [21] Anonim 2007. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No SANCO/2007/3131.
-