



Araştırma Makalesi/Research Article

# Elmalarda İmidacloprid ve Dimethoate Kalıntıları için QuEChERS ve LC–MS/MS ile Metot Validasyonu

Ezgi Özel<sup>1</sup> Osman Tiryaki<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Çanakkale, TÜRKİYE  
\*Sorumlu Yazar: osmantiryaki@yahoo.com

Geliş Tarihi: 22.02.2017

Kabul Tarihi: 04.04.2017

## Öz

Pestisit kalıntı analizlerinde kullanılan tüm metotların, orijinal laboratuvar örneklerinin analizinden önce validasyonu yapılmalıdır. Bu çalışmada elmalarda imidacloprid ve dimethoate kalıntı analizi için analiz prosedürünün valide edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hiçbir ilaçlama yapılmamış Golden Delicious ve Starking Delicious elma örnekleri homojenize edilmiş ve pestisitlerle 3 farklı seviyede zenginleştirilmiştir. 10 g elma örneği QuEChERS yöntemi ile ekstraksiyon ve clean up işlemine tabi tutulmuştur. Takiben LC-MS/MS sisteminde imidacloprid ve dimethoate analizleri yapılmıştır. Her iki pestisit ve elma çeşidi için matris etkisi önemli bulunduğundan, miktarasal hesaplama matrisli kalibrasyon (MC) ile yapılmıştır. Analiz metodunun validasyonu, geri alım, metot dedeksiyon limiti, tekrar edilebilirlik, kesinlik gibi metot performans kriterleri ile gerçekleştirilmiş ve tüm değerler olması gereken limitler içinde bulunmuştur. Her iki elma çeşidi için imidacloprid ve dimethoate geri alım değeri ortalaması %88.34 (RSD %7.72) olarak tespit edilmiştir. Tüm metodun geri alımı ise %89.50 (RSD %12.02) olarak bulunmuştur (n = 150). Bu rakamlar olması gereken ortalama geri alım (%70–120) ve tekrar edilebilirlik (RSD ≤ %20) değerleri ile uyumludur. Pestisitlerin metot dedeksiyon limiti, AB ve Türk Gıda Kodeksi MRL değerlerinden düşük olduğu tesbit edilmiştir. Her iki pestisit için kalibrasyon eğrisi 5–200 ng/mL konsantrasyon sınırlarında doğrusal bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Metot validasyonu, pestisit kalıntısı, matris etkisi, QuEChERS

## Abstract

### Method Validation for Imidacloprid and Dimethoate Residues in Apples by QuEChERS and LC–MS/MS Analysis.

All methods used for pesticide residue analysis must be validated prior to implementation of original laboratory samples analysis. This study performed to validate analytical procedure for imidacloprid and dimethoate residues in apples. For this aim, untreated blank Golden Delicious and Starking Delicious samples were homogenized and fortified at 3 levels with pesticides. 10 g of apples were subjected to QuEChERS extraction and cleanup procedure. Pesticide analysis performed with LC-MS/MS. Since matrix effect was important for both pesticides and both apple varieties, matrix matched calibration (MC) was used for quantification. Method validation was carried out by performance parameters such as, recovery, method detection limit, repeatability, precision. All parameters figures were within the required limits. For imidacloprid and dimethoate analytes, recoveries (n=150) averaged 88.34% (RSD 7.72%), for two apple commodities over the validation range. For overall recovery of the analytical procedure was 89.50% (RSD 12.02%). These values were compatible with the required figure for recovery (70–120%) and repeatability (RSD ≤ 20%). Method detection limits of analytes were below the EU MRLs and also TGK MRLs. Calibration curve of two compound were linear with the 5–200 ng/mL range.

**Keywords:** Method validation, pesticide residue, matrix effect, QuEChERS

## Giriş

Pestisit kalıntı analizlerinde metot geçerli kılma (method validation, MV) metodun ilgili validasyon parametrelerine uygunluğunun belirlenmesi amacıyla, metot parametre değerlerinin incelendiği bir geçerlilik prosedürüdür. Belirli bir örnek için geliştirilen yöntemin, o laboratuvarla güvenilir olarak çalıştığı doğrulanmasıdır. Tek bir laboratuvar ya da birden fazla laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Metot validasyonu analizi yapan için bir sigortadır. OECD-GLP ve ISO 17025 kalite sistemlerine göre, kalıntı analizlerinde valide edilmiş metotlarla çalışmak bir zorunluktur (Tiryaki ve Baysoy, 2006). Metodun işlerliği kanıtlandıktan sonra gerçek örneklerle analize başlanmalıdır. Bir metot uluslararası literatürde valide edilmiş olsa bile, o metodun çalışılan laboratuvar koşullarında aynı sonucu vereceğinin garantisi yoktur. Metot validasyonu geri alım, gerçeğe yakınlık (accuracy), doğrusallık (linearity), kesinlik (precision, repeatability,



reproducibility), LOD (dedeksiyon limiti), LOQ (hesaplama limiti), hassasiyet, matris etkisi, hedef ve özgülük gibi bir çok parametreden oluşan bir iç prosedür olup bu parametreler başka bir literatür ya da laboratuvarından kopya edilemez (SANCO, 2013;Tiryaki, 2017).

Tarım ürünlerinin pestisit kalıntıları bakımından temiz olması yerli tüketim ve uluslararası ticaret bakımından çok önemlidir. Bunun için Avrupa ülkelerine ulaşan tarım ürünleri için kalıntı uyarısı alan ülkeler Hızlı Alarm Sistemi'nde (Rapid Alarm System for Food and Feed, RASFF) günlük olarak duyurulmaktadır. Pestisit kalıntı analizlerinin hassas ve uluslararası boyutta yapılabilmesi için ISO17025 (International Organization for Standartization) ve OECD (Organization for Economic Co-operation and Devolopment)- GLP kalite sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerin en önemli unsuru metot validasyonudur (Tiryaki, 2006).

Pestisit kalıntı analizlerinde Anastassiades ve ark. (2003) tarafından geliştirilen meyve ve sebzelerde pestisit analizlerine imkan veren "QuEChERS" (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) metodu kullanılmaktadır. Bu yöntem toprak örneklerinde de önerilmektedir. Bu çalışmanın amacı da Çanakkale tarımında önemli olan elma üretiminde kullanılan dimethoate ve imidacloprid kalıntılarının analizi için kullanılacak olan QuEChERS yönteminin valide edilmesidir.

## **Materyal ve Yöntem**

### **Materyal**

Dimethoate ve imidacloprid pestisitlerini etken maddesi Dr. Ehrenstorfer Laboratories GmbH, Germany'dan %99 saflıkta temin edilmiştir. Çalışmada ayrıca; toluen (%99.0 saflıkta LiChrosolv, Merck ), asetonitril (%99.9 saflıkta LiChrosolv, Merck ), sodyum klorür (NaCl, Merck), magnezyum sülfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Merck) ve PSA (Primary Secondary Amine, 40  $\mu m$ , Analitik saflıkta, Varian) kimyasalları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar; ÇOBİLTUM'da bulunansızı kromatografi-kütle spektrofotometresi (Quadrupole Shimadzu LC-MS/MS-8040) sistemi, 50 mL'lik tüpe uygun rötarlı santrifüj (Nüve NF 800), mikrosantrifüj (Eppendorf 5418), örnek homojenizasyonu için Waring blender, Vortex tüp karıştırıcı (Velp scientifica), GC viyali (Agilent technologies, 1.5 mL), azot gazı olarak sıralanabilir. Bunlara ilaveten çeşitli hacimlerde mikropipet, hamilton enjektör, 50 mL'lik santrifüj tüpü, 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü ve diğer temel cam malzeme ve ekipmanlar analizlerin çeşitli basamaklarında kullanılmıştır.

### **Homojenizasyonu ve fortifikasyon**

Laboratuvar örneği olarak AB Directive 79/700/EEC'e uygun şekilde blank (pestisit içermeyen) 10 adet elma alınmış (Anonymous, 2002), her birinden küçük parçalar kesilerek 1 kg elma blenderda homojenize edilmiştir (Şekil 1a.). Homojenize elma örneğinden 10 g'lık analitik örnek 50 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha önceden hazırlanan pestisit fortifikasyon solüsyonlarından Çizelge 1.'de görülen formatta 10 g'lık Golden D ve Starking D elma üzerine 3 farklı fortifikasyon seviyesinde 5 tekerrürlü olarak ilave edilmiştir. Kontrol örneğine pestisit ilave edilmemiş 3 paralelli yapılmıştır. Örneğin, 0.5 mg/kg fortifikasyon için 50 ng/ $\mu L$  den 100  $\mu L$ , santrifüj tüpündeki 10 g'lık örneğe aktarılmıştır. Tüm bu fortifikasyonlar her iki elma çeşidinde yapılmıştır.

Pestisit çalışma solüsyonları, kalibrasyon solüsyonları ve fortifikasyon solüsyonları daha önceden şu şekilde hazırlanmıştır: Dimethote ve imidacloprid etkili maddelerinden hassas terazi ile 11.4 mg tartılarak, 25 mL toluen içinde 456  $\mu g/mL$  stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar karanlıkta 4°C'de korunmuştur. Stok solüsyondan seyreltilmesi için MeCN içinde 10  $\mu g/mL$  ara solüsyonlar hazırlanmış ve bu ara solüsyondan bir seri seyreltme ile 5, 20, 50, 100, 200 pg/ $\mu L$  konsantrasyonlarında MeCN içinde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi Çizelge 1 formatında fortifikasyon solüsyonları da hazırlanmıştır.

### **Ekstraksiyon, arındırma (clean up) ve kromatografi**

Ekstraksiyon ve ekstraktın istenmeyen bileşiklerden arındırılması (clean up), için QuEChERS metodu uygulanmıştır. 50 mL'lik santrifüj tüpündeki örnek üzerine 100  $\mu L$  fortifikasyon solüsyonu ve 10 mL MeCN konulmuştur ve 1 dak. Vorteks ile karıştırılmıştır. Üzerine 8.0 g magnezyum sülfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ve 1 g NaCl eklenerek ve 1 dak. Vortekste karıştırılmıştır (Şekil 1b.). Örnekler 7 dak. 4100 rpm hız ile santrifüj edilmiştir (Şekil 1c.). Clean up için ise tüpteki üstte sıvı haldeki MeCN fazından (süpernatant) 1 mL alınarak içerisinde 25 mg PSA ve 307 mg  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  bulunan 1.5 mL'lik tüpe aktarılmıştır (Şekil 1d.). Karışım 1 dak. Vorteks ile karıştırılmış ve 5 dak. süre ile 6000 rpm hızında

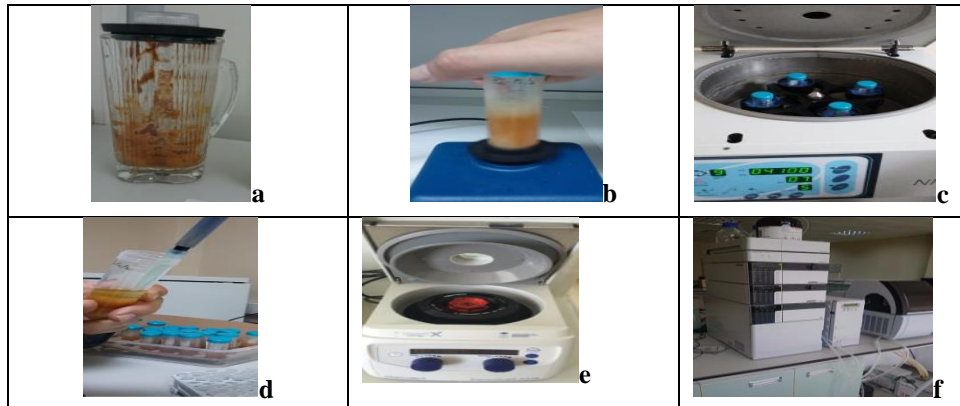
santrifüjlenmiştir (Şekil 1e.). LC/MS analizi için 0.5 mL ekstrakt GC viyaline alınmıştır. Şekil 2’de QuEChERS analiz metodunun tüm analiz basamaklarını açıklamaktadır. Fortifiye edilen, kontrol ve blank örneklerinin hepsine aynı analitik işlemler uygulanmıştır.

Çizelge 1. MRL değerine göre elma örneklerinin fortifikasyon seviyeleri.

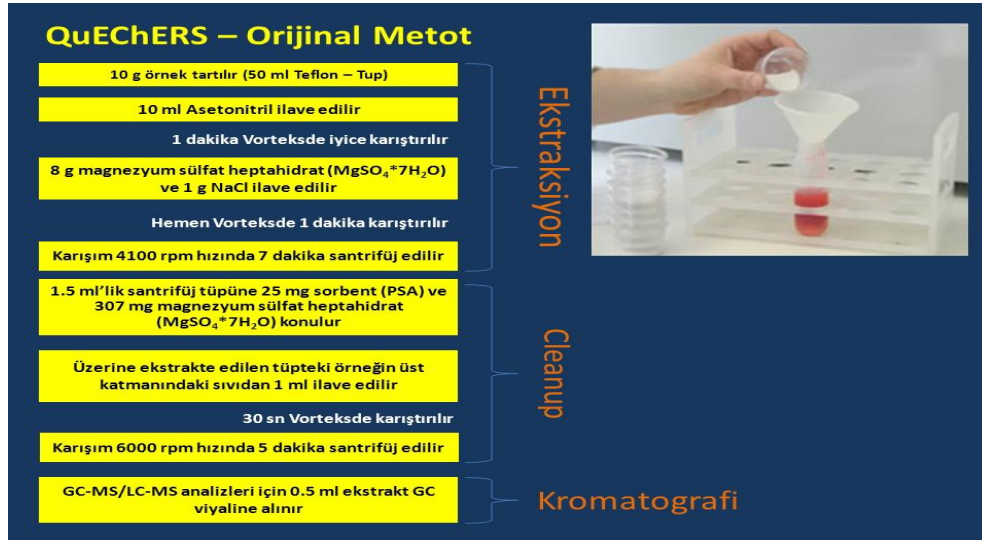
Fortifikasyon seviyesi	Fortifikasyon düzeyi, mg/kg, imidacloprid	Fortifikasyon düzeyi, mg/kg, dimethoate	Kodlama
0.1 x MRL	0.05	0.002	F <sub>1</sub> /1-5
1x MRL	0.50	0.02	F <sub>2</sub> /1-5
10 x MRL	5.00	0.2	F <sub>3</sub> /1-5
Kontrol Örneği			F <sub>0</sub> /1-3
Blank			Bl/1-2

Kromatografik analizler, Shimadzu marka LC/MS-8040 model Sıvı Kromatografisi (LC)-Kütle Spektrometresi (MS) ile yapılmıştır (Şekil 1f.). LC sisteminde ODS-4 C<sub>18</sub> (4.6 x150 mm iç çapı, 3 µm partikül büyüklüğü) kolonu kullanılmıştır. Kromatografik sisteme pozitif ESI MRM modunda çalışan LC-MS/MS-8040 (Triple Quadrupole Shimadzu) kütle spektrofotometresi bağlanmıştır. Sistem şu koşullarda çalıştırılmıştır; Hareketli faz 10 mM amonyum asetat +su (A) ve MeCN solusyonundan (B) oluşmuş ve gradient programında çalışılmıştır; başlangıç %30 B/ %70 A oranında 1 dak. tut → %50B/%50 A oranında 1 dak tut → %90 B/%10A oranında 2 dak. tut → %50 B/%50 A oranında 5 dak. tut → %30 B/%70 A oranında tekrar 6 dak. tut). Enjeksiyon hacmi 10 µL, fırın sıcaklığı 40°C, toplam elusyon zamanı 15 dak., hareketli faz akış hızı 0.5 mL /dak. , sprayleme gaz akış hızı 3 mL/dak., ısı blok sıcaklığı 400°C, DL sıcaklığı 250°C ve ESI voltage:3.5 kV.

Her analitik porsiyondan 3 enjeksiyon yapılmıştır. Analiz metodu tekli laboratuvar validasyon yaklaşımına göre valide edilmiştir (Thompson ve ark., 2002). Metodun performansı EU-SANCO dökümanlarındaki validasyon parametreleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Kanrar ve ark., 2010).



Şekil 1. Analiz basamakları; a) Örneklerinin homojenizasyonu, b) Örneklerin Vorteks ile karıştırılması, c) Örneklerin ekstraksiyonu, d) Ekstraktan cleanup için örnek alınması, e) Mikrosantifruj ile clean up f) Kullanılan LC-MS/MS-8040 kütle spektrofotometresi.



Şekil 2. QuEChERS yöntemin analitik işlem basamakları.

## Bulgular

### Kalibrasyonun doğrusallığı

Kalibrasyonda 3 veya daha fazla seviye kullanılmışsa, uygun kalibrasyon fonksiyonu hesaplanabilir ve en düşük ve en yüksek kalibrasyon seviyesi arasındaki ölçümlerde bu fonksiyon kullanılır. Kalibrasyon noktaları düz bir doğrusal hattalarsa,  $y=a+bx$  formülü uygulanır. Kalibrasyon noktaları, çizilen eğrideki ilgili bölgeden %20'den fazla sapıyorsa başka bir kalibrasyon fonksiyonu kullanılmalıdır (Tiryaki, 2017).

Kalibrasyonun doğrusallığı sadece korelasyon katsayısı olarak ifade edilen  $r$  değerinin 0.99'a yakın olmasına bağlı değildir, relatif kalıntıl standart sapmanın (Relative Residual Standart Deviaton,  $S_{\Delta y/y}$ ) da %10'dan küçük olması gerekir.  $S_{\Delta y/y}$  Denklem 1'e göre hesaplanmış ve doğrusallık için gereken 0.1 değerinden düşük bulunmuştur (Huber 2004; Miller ve Ambrus, 2005; Gonzales ve ark., 2006; Ellison, 2006; Tiryaki, 2006).

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

Denklemdaki  $n-2$  serbestlik derecesi ile hesaplanan relatif kalıntıl (kalıntıl/denklemden hesaplanan  $\Delta y = y_i - \hat{y}$ ;  $Y_{rel} = \Delta y / \hat{y}$ ) standart sapma ( $S_{\Delta y/y}$ ), ile gösterilmiştir.

Çalışmada, her iki pestisit kalibrasyon doğrusunun (curve) eğimi solvent kalibrasyonda ve Golden D elmasında matrisli kalibrasyon ( $MC_{Golden D}$ ) ve Starking D elmasında ( $MC_{Starking D}$ ) kalibrasyonları olarak 5–200 ng/mL arasında değişen kalibrasyon standartlarının kontsantrasyonlarına karşı grafikte işaretlenmiştir. Her iki matrisli kalibrasyon solüsyonlarında örnek eşdeğer miktarı 1g/mL dir. 5 seviyeli yapılan kalibrasyonda, kalibrasyon denklemi veya analitik fonksiyon Excel programında hesaplanmış ve relatif kalıntıl standart sapma ( $S_{\Delta y/y}$ ) da bulunmuştur. Doğrusallık  $MC_{Golden D}$  ve  $MC_{Starking D}$  ve SC kalibrasyonlarında hesaplanmıştır.  $MC_{Golden D}$  ve  $MC_{Starking D}$  ve SC kalibrasyon eğrileri için  $r$  değeri 0.998973-0.999812 arasında,  $S_{\Delta y/y}$  ise 0.05386832-0.099939904 arasında bulunmuştur. Bu değerler istenen limitler arasında olduğundan her 3 kalibrasyon da doğrusaldır. Her 3 kalibrasyon sistemine ait grafikler Şekil 3. ve 4.'te görülmektedir.

### Cihaz tesbit limiti ve tahmini metot tesbit limiti hesaplanması

Cihaz tesbit limiti (Instrument Detection Limit, IDL) cihaza enjekte edilebilen pestisit standardının en düşük konsantrasyonudur. Pestisitlerin IDL'si LC-MS/MS sisteminin yazılım programından elde edilmiş ve Denklem 2 kullanılarak 200 pg/mL standart çözeltinin 10 tekrarlı enjeksiyonu ile belirlenmiştir (Singh ve ark., 2007).

$$IDL (\mu\text{g/mL}) = SD \times t_{95} \quad (2)$$

Denklemdaki SD tekrarlı enjeksiyonların pik alanlarını standart sapmasıdır,  $t_{95}$  %95 güven seviyesinde Student T testi değeridir.

Tahmini metot tesbit limiti (Estimated Method Detection Limit, EMDL)ise ilgili pestisit, belirli bir örnek matrisinde ve belli bir metot ile saptanabilen yaklaşık en düşük konsantrasyonudur (Singh ve ark., 2007). Denklem 3'deki gibi hesaplanmıştır.

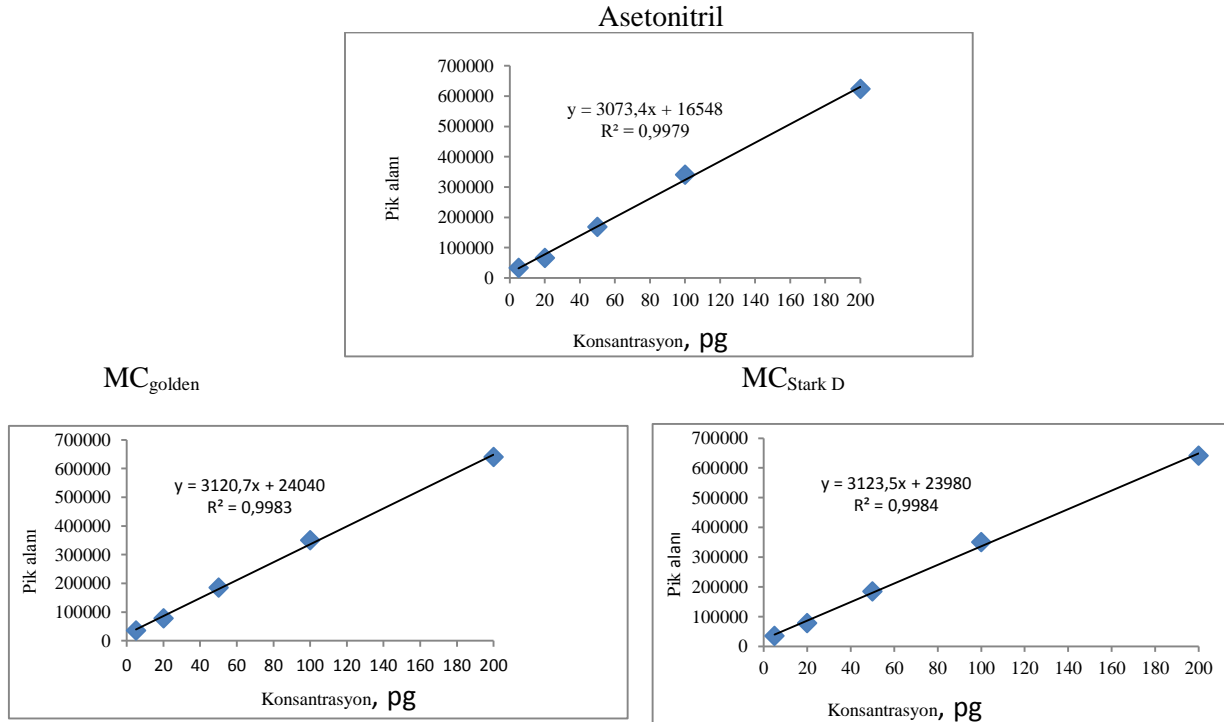
$$EMDL (\mu\text{g/g}) = \frac{IDL \times 100 \times V}{M \times \%Rec} \quad (3)$$

Denklemdaki M örnek ağırlığı (g) ve % Rec ise uygulanan metot ile elde edilen pestisit ortalama geri alım yüzdesidir. V kromatografik sistemine mL olarak enjekte edilen hacimdir.

Her iki pestisit için ve her iki örnek matrisleri için IDL ve EMDL değerleri Çizelge 2.'de verilmiş olup, EMDL ≤ MRL olarak bulunmuştur.

Çizelge 2. Dimethoate ve İmidacloprid için IDL ve EMDL değerleri.

Pestisit	IDL (mg/L)Saf standart	EMDL (mg/kg)		MRL (mg/kg)
		MatrisGolden D	MatrisStarking D	
Dimethoate	0.012	0.0143	0.0148	0.02
İmidacloprid	0.032	0.0336	0.0344	0.5



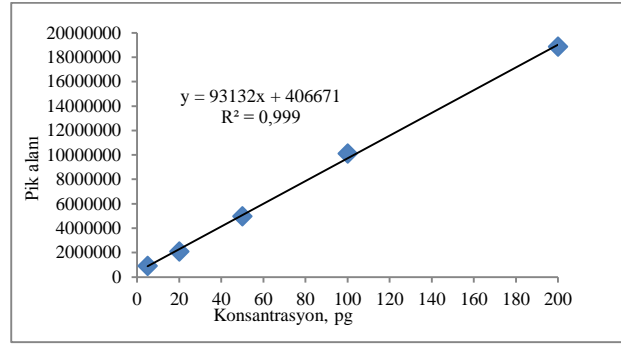
Şekil 3. Çözücü kalibrasyonda (SC) ve her iki matrisli kalibrasyonda İmidaclopridin kalibrasyon eğrileri.

### Matris etkisi (ME)

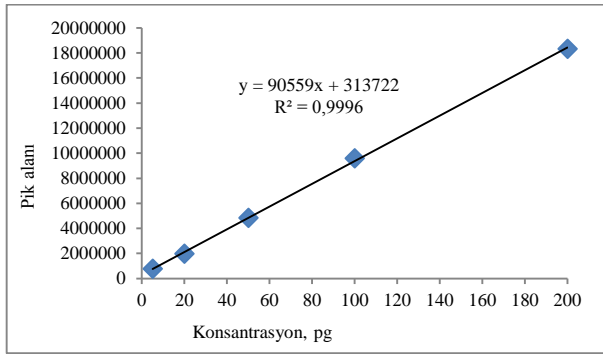
Matris etkisi; ekstraksiyon sürecinde örnekten gelen bileşiklerin, kromatografide pestisit analizi üzerine yaptığı etkidir (SANCO, 2013). Matris etkisinin engellenmesi mümkün değildir. Bu yüzden Matrisli (MC) analitin pikleri ile aynı miktarda çözücü (solvent) (SC) solusyonundaki analitin pikleri karşılaştırılmıştır. Her iki elma çeşidi ve her 2 pestisit için matrisli kalibrasyon standartları 5 farklı konsantrasyonda ve elma blank ekstraktları içinde hazırlanmıştır. Matrisli kalibrasyon hazırlamada gerekli örnek eş değer miktarları hazırlamak için N<sub>2</sub> gazı ile evaporasyon yapılmıştır. Matrisli kalibrasyon, örnek eşdeğer belirlenmiş gerçek örneği temsil edecek şekilde hazırlanmıştır. Matris etkisi (ME%), Denklem 4 ile hesaplanmıştır (Kanrar ve ark., 2010).



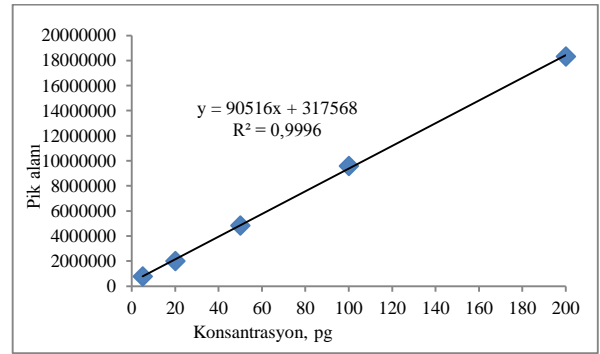
### Asetonitril



### MC<sub>golden</sub>



### MC<sub>Stark D</sub>



Şekil 4. Çözücü kalibrasyonda (SC) ve her iki matrisli kalibrasyonda Dimethoate'nin kalibrasyon eğrileri.

$$ME, \% = \frac{(MC \text{ alan pik değeri} - SC \text{ alan pik değeri}) * 100}{SC \text{ alan pik değeri}} \quad (4)$$

SC-MC<sub>Golden D</sub> ve SC-MC<sub>Stark D</sub> arasındaki farkların istatistiksel önemi Denklem 5 ve 6 kullanılarak *Student testi* ile değerlendirilmiştir (Anonymous, 1999).

$$t = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_D}$$

(5) Farklılıkların ortalaması  $\bar{d}$ ,  $\bar{d}$ 'nin standart sapması  $S_D$  ile gösterilmiştir.

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

Serbestlik derecesi  $n-1$  ve veri çiftleri adedi  $n$  olarak gösterilmiştir.

Matris etkisini dengelemek için MC kullanılır. Matrisli kalibrasyonlar hazırlarken, analiz edilecek örnekteki örnek eşdeğer miktarı ile, matrisli kalibrasyon çözeltilerindeki örnek eşdeğer miktarının aynı olması gerekir. Pestisit içermediğini bildiğimiz blank örnek ve analiz edilecek gerçek örnek aynı analiz işlemlerinden geçirilmelidir (Tiryaki, 2011). Her iki elma çeşidi için 5, 10, 20, 50 ve 200 ng/mL olarak 5 farklı konsantrasyonda pestisit standartları blank ekstraktlar üzerine ilave edilmiştir. Gerekli örnek eşdeğer miktarları hazırlamak için  $N_2$  gazı ile evaporasyon yapılmıştır. Böylece matrisli analitin pikleri ile aynı miktarda MeCN içindeki analitin pikleri karşılaştırılmıştır.

Her iki pestisit için bulunan ME değerleri SC-MC<sub>Golden D</sub> çifti için ve SC-MC<sub>Stark D</sub> çifti için hesaplanmış ve ilgili veriler Student T testine tabi tutulmuştur. İmidacoprid için her iki örnek matrisinde ortalama ME değeri ve ortalama t değeri, sırasıyla, %7.27 ve 4.075 olarak hesaplanmıştır. Dimethoate için ise aynı değerler sırasıyla %13.53 ve 2.785 olmuştur. Hesaplanan değer; tablo değeri olan [%95 güven seviyesinde ve  $n-1$  serbestlik derecesinde ( $5-1$ )  $t_{\text{tablo}, 4, 0.05}$  değeri olan] 2.77'den fazla olması durumunda fark önemli az olması durumunda önemsiz kabul edilir. İlgili hesaplamaların detayı Çizelge



3. ve 4.'te verilmiştir. Her iki pestisitte matris etkisi önemli bulunmuştur. Bu nedenle tüm kantitatif hesaplamalar ve tüm geri alım hesaplamaları matrisli standart kalibrasyonu ile yapılmıştır.

Alıkonma zamanları (retention time,  $r_t$ ) tekrar edilebilirliği matrisli kalibrasyonla hesaplanmıştır (Rashid ve ark., 2010). İmidacloprid için  $MC_{Golden D}$  ve  $MC_{Stark D}$  da ortalama ( $n=90$ ) alıkonma zamanı, %0.1180 RSD ile 5.459 olarak bulunmuştur. Dimethoate için ise ilgili değer, % 0.285985 RSD değeriyle 5.548 olmuştur( $n=90$ ).

### Geri alım (Recovery) ve Kesinlik (Precision)

Geri alım çalışması 0.1MRL, 1.0 MRL, 10.0 MRL düzeyinde bir pestisit etkili maddesi için iki elma çeşidinde, üç fortifikasyon seviyesinde 5 analitik porsiyonda ve LC-MS/MS e 3 enjeksiyonla toplam 90 adet veri ile gerçekleştirilmiştir. Ancak Dimethoate'da 0.1 MRL (0.002 mg/kg seviyesinde analiz sonuçları IDL ve dolayısıyla EMDL düzeyinin altında kalmış ve geri alım elde edilememiştir. Dolayısıyla dimethoate için MV 60 veri ile yapılmıştır. Her iki pestisit için tüm metod validasyon çalışması 150 veri ile yapılmıştır. Geri alım değeri, geri alınan pestisit seviyesinin uygulanan fortifikasyon seviyesine bölünmesi ile elde edilir. İmidacloprid için (3 fortifikasyon seviyesi,  $n = 45$ ) Golden D örneğinde geri alım değerleri %72.85-113.88 arasında , RSD değeri ise ortalama %10.09 olarak bulunmuştur. Starking D elma örneğinde ise geri alım değerleri %71.14-111.27 arasında, RSD değeri ise %11.77 olarak bulunmuştur(Çizelge 5.). İmidacloprid için tüm metdun geri alımı ( $n=90$ ) %94.12 RSD ise %11.28 olmuştur. Dimethoate için (F2 ve F3,  $n = 30$ ) Golden D örneğinde geri alım değerleri %78.51-89.97 arasında, RSD değeri ise ortalama %4.21) olarak bulunmuştur.

Çizelge 3. İmidacloprid'in oluşturduğu matris etkisinin önemlilik testi (Student t testi).

	SC-MC <sub>GoldenD</sub> Karşılaştırması					SC-MC <sub>StarkingD</sub> Karşılaştırması				
	Kalibrasyon Düzeyleri									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
X, enjekte edilen miktar (pg/ $\mu$ l)	5	20	50	100	200	5	20	50	100	200
Y... çözücü kalibrasyonu	34274	66673	169333	341035	623958	34274	66673	169333	341035	623958
Y <sub>matr</sub> matris kalibrasyonu(1g/ml seq, örnek eşdeğeri)	35600	78050	185500	350990	640334	35821.48	78146.86	185010.94	351360.69	640884.3
Fark; Y <sub>matr</sub> -Y...= d <sub>i</sub>	1326	11377	16165	9955	16376	1347.48	11473.86	15675.94	10325.69	16926.3
Farkların ortalaması (d)			-11039.8					-11189.854		
Farkların standart sapması (SD)			6131.702675					6058.766283		
Ort. $t=d\sqrt{n}/SD$						4.075				
Ort. ME, %						7.27				

Çizelge 4. Dimethoate'in oluşturduğu matris etkisinin önemi (Student testi)

	SC-MC <sub>GoldenD</sub> Karşılaştırması					SC-MC <sub>StarkingD</sub> Karşılaştırması				
	Kalibrasyon Düzeyleri									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
X, enjekte edilen miktar (pg/ $\mu$ l)	5	20	50	100	200	5	20	50	100	200
Y... çözücü kalibrasyonu	899924	2099212	4967486	1011587	18875283.33	899924	2099212	4967486	1011587	18875283.33
Y <sub>matr</sub> matris kalibrasyonu(1g/ml seq, örnek eşdeğeri)	779484	1989901	4839948	9589987	1832904	776726	1998912	4833724	9399938	18319999
Fark; Y <sub>matr</sub> -Y...= d <sub>i</sub>	120440	109311	127538	525890	546259.333	123198	100300	131762	513939	555284.333
Farkların ortalaması (d)			285887.6667					284896.6667		
Farkların standart sapması (SD)			228594.2865					228715.1586		
Ort. $t=d\sqrt{n}/SD$						2.785				
Ort. ME, %						13.53				



Çizelge 5. QuEChERS metoduyla yapılan geri alım çalışmasında her iki pestisit ve her iki elma matrisi için elde edilen, geri alım ve RSD değerleri.

Pestisit	Fortifikasyon, mg/kg	MatriksGolden D		MatriksStark D	
		Geri alım, %	RSD, %	Geri alım, %	RSD, %
Dimethoate	0.02-0.2	78.51-89.976	4.21	71.82-96.71	9.77
İmidacloprid	0.05-5.0	72.85-113.88	10.09	71.14-111.27	11.77
	Dimethoate için metodun geri alımı (n=60) ; %94,12		RSD %11.28		
	İmidacloprid için metodun geri alımı (n=90) ; %82.57,		RSD %7.74		
TOPLAM	İmidacloprid ve dimethoate geri alım değeri ortalaması	%88.34,	RSD %7.72		
	Tüm metodun geri alımı (n=150)	%89.50 ,	RSD %12.02		

Starking D elma örneğinde bu değerler%71.82-96.71 ve %9.77 olmuştur. Dimethoate için tüm metodun geri alımı ise ( n=60) %82.57, RSD ise%7.74 olarak bulunmuştur(Çizelge 5.). Her iki elma ve 2 pestisit geri alım değeri ortalaması %88.34 (RSD=%7.72) olarak bulunmuştur. Tüm metodun (n=150) geri alımı%89.50, RSD ise %12.02 olarak bulunmuştur

### Tartışma ve Sonuç

Bulunan geri kazanım sonuçları istenen geri kazanım aralığına (%70-120) tekrarlanabilirlik şartı için belirtilen değerlere (RSD ≤%20) uygundur (SANCO, 2013). Nitekim, Aysal ve ark. (2007), Temur ve ark. (2012) çalışmalarında geri alımları olması gereken limitler içinde bulunmuşlardır. Yine benzer şekilde, Aysal ve ark. (2004) çalışmalarında %93; Lehotay ve ark. (2005) %95±10 arasında; Lesueur ve ark. (2008) %70-110 arasında; An and Shin (2011) %76.40-120 arasında ve Lemes ve ark. (2014) %84-100 arasında geri alım elde etmişlerdir. Bu verilerin hepsi SANCO (2013)'de belirtilen geri alım limitlerine uygundur. Her 2 pestisit için bulunan EMDL değerleri MRL değerinden küçük olduğu için QuEChERS metodu laboratuvar koşullarımızda analiz için uygundur. Çalışmada 5–200 ng/mL konsantrasyon sınırlarında kalibrasyon doğrusalığı araştırılmıştır. Çözücü kalibrasyonu ve her iki matrisli kalibrasyonda, korelasyon katsayısı (r) ve relatif kalıntısız standart sapma ( $S_{Ay/y,n-2}$ ) olması gereken limitler içinde ( $r \geq 0.999$  ve  $S_{Ay/y,n-2} \leq 0.1$ ) bulunmuştur. Bunlardan başka kromatografik tekrar edilebilirlik, matris etkisinin öneminin araştırılması ve diğer MV parametreleri de çalışmada değerlendirilmiştir.

Özetle çalışma süresince metod validasyonu parametreleri tek tek değerlendirilmiş ve hesaplanmıştır. Bulunan değerler AB SANCO dökümanlarında belirtilen limitler ile karşılaştırılmıştır. Bu bulgular ile QuChERS analiz yönteminin elmalarda İmidacloprid ve Dimethoate analizi için olması gereken MV performans limitleri laboratuvarımız analiz koşullarında sağlanmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışma, ÇOMÜ BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenen FBA-2014-389 kodlu projeden üretilmiş olup özeti Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi'nde sunulmuştur.

### Kaynaklar

- 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., Stajnbäher, 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
- Anonymous, 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.
- Aysal, P., Ambrus, A.R., 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.
- Ellison, S.L.R., 2006. In defence of correlation coefficient. *Accreditation and Quality Ass.* (11): 146–152.
- Gonzales, A.G., Herrador, M.A., Asuero, A.G., Sayago, A., 2006. The correlation coefficient attack again. *Accreditation and Quality Assurance*. (11): 256–258.
- Huber, W., 2004. On the use of correlation coefficient for testing the linearity of calibration function. *Accreditation and Quality 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. *J. of Chromatography A*. 1217: 1926–1933.





- Lehotay, S. J., Maštovská, 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.
- Lemes, V.R.R., Martins–Júnior, H.A., Souza, S.V.C., Colacioppo, S., 2014. Ethylenethiourea in fruits: optimization and in–house validation of a method by liquid chromatography tandem mass spectrometry, occurrence and dietary exposure assessment. *Food Control*. 42: 321–328.
- 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.
- SANCO, 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2013, Document No. SANCO/12571/2013 [http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2013\\_12571.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf) Erişim:13.05.2014).
- Singh, S.B., Foster, G.D., Khan, S.U., 2007. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave–assisted extraction. *J. of Chromatography A*. 1148: 152–157.
- Temur, C., Tiryaki, O., Uzun, O., Başaran, M. 2012. Adaptation and validation of QuEChERS method for the analysis of Trifluralin in wind–eroded soil. *J of Environmental Science and Health Part B*. 47: 842–850.
- 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., 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., 2017. Pestisit Kalıntı Analizlerinde Kalite Kontrol (QC) ve Kalite Güvencesi (QA), Geliştirilmiş ve Güncelleştirilmiş 2. Basım, Nobel Yayın No: 1697, Fen Bilimleri:129, ISBN 978–605–320–604–0. Mart 2017, Ankara. <https://nobelyayin.com/detay.asp?u=3230>
- Tiryaki, O., Baysoyu, D., 2006. Estimation of sample processing uncertainty for chlorpyrifos residue in cucumber. *Accreditation and Quality Assurance*. 10 (10): 550–553.