



PESTİSİT KALINTI ANALİZLERİNDE ÖRNEK MATRİSİ SORUNU VE ÇÖZÜM YOLLARI

OSMAN TİRYAKİ^{1,*}

¹Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, KAYSERİ

ÖZET

Pestisit (bitki koruma ürünü) kalıntı analizlerinde analiz edilecek örnekten ekstraksiyon çözeltilisine geçen bileşikler matris etkisi oluşturarak kantitatif analizlerin sonucunu pozitif veya negatif yönde etkileyebilir. Bu çalışmada; güncel literatürlerin ve Avrupa Birliği (AB) direktiflerinin ışığında matris etkisinin mekanizması, bu etki üzerine önemli olan faktörler, matris etkisinin önemini istatistiksel olarak ortaya konması ve bu sorunun çözüm alternatiflerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Matris etkisi sorununa çözüm yolları aranırken; matrisli kalibrasyonun doğrusallığı, metodun hesaplama limiti (LOQ), geri alımları ve tekrar edilebilirlikleri ile birlikte değerlendirilmelidir. Bu olgu her bir pestisit ve matris bazında metod validasyonunu sürecinde rutin olarak değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Matris etkisi, Matrisli kalibrasyon, Düzeltme faktörü, Analit koruyucu.

SAMPLE MATRIX PROBLEM AND ITS SOLUTION IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS

ABSTRACT

In pesticide residue analysis, co-extracted compounds may effect the quantitation of analytical results at both side by inducing matrix-effect. With the update references and European Union (EU) Guides, this review article deals with the mechanism of matrix effect, effecting factors on matrix effect, the statistical significance of it, and alternative approaches for the solution of matrix problem. While the find out the solution of matrix-induced effect, the assessment should be together with the some other criteria, such as, linearity of calibration, limit of quantitaion (LOQ), recovery, and repeatabilities. This phenomena must be evaluated routinely during the validation of method, based on each pesticide and matrix.

Keywords: Matrix effect, Matrix-matched calibration, Correction factor, Analyte protectans.

*E-posta: osmantiryaki@yahoo.com

1.GİRİŞ

Pestisit kalıntı analizlerinde kalite kontrol ve kalite güvencesi sisteminde üzerinde durulması gereken konulardan biri de ekstrakte edilecek materyalden (toprak, bitki, bitkisel ürün ve gıda) ekstraksiyon çözeltilisine geçen materyallerin kromatografide oluşturduğu sorunlardır.

Pestisit kullanımındaki etkili madde (e.m.) ve ürün bazında günümüzde artan çeşitliliğe karşı AB direktiflerinde çeşitli ürün ve pestisitler için 1700' ün üzerinde maksimum kalıntı limitleri (MRL) belirlenmiştir. Bebek gıdalarında bu limit 10 µg/kg olup bu da ≤5 µg/kg LOQ değerlerine karşılık gelmektedir. Bu sonuçlara çok ayrıntılı analizlere olanak veren etkin çoklu kalıntı analiz metotlarıyla (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe; QuEChERS gibi) çalışılması ile ulaşılabilir. Bu anlamda analitik ayrıştırma ve dedeksiyon işleminde örnek ekstraktından gelen matrisin kantitatif analizlerde önemi büyüktür [1].

Kromatografik analizlerde örnek matrisi etkisi ilk olarak Erney et al. [2] tarafından geniş bir şekilde irdelenmiş ve çözüm alternatiflerini açıklanmıştır.

Matris etkisinin önemi Avrupa Birliği direktiflerinde açıklanmıştır. Örnek matrisi etkisi; örnekten gelen bir veya daha fazla bileşenin analit konsantrasyonu ölçümü üzerine olan etkisidir. Bazı dedeksiyon sistemlerinde (Örn., GC, LC-MS, ELİSA) belirli analitler, örnek matrisinden gelen materyallerden (co-extractive) etkilenebilir. Matris etkileri, çeşitli fiziksel ve kimyasal işlemlerden kaynaklanabilir ve bunun engellenmesi zordur veya mümkün değildir. Bu etkiler, çözücü (solvent) solusyonundaki analitin pikleri ile karşılaştırıldığında, artan veya azalan pik alanları olarak gözlemlenir. Bu etkilerin varlığı yada yokluğu, çözücü solusyonu içindeki analitin piki ile aynı miktar analitin örnek ekstraktı içinde elde edilen pikinin karşılaştırılması ile görülebilir [3].

Kalıntı analizlerinde ekstraktın istenmeyen bileşiklerden arındırılması (cleanup) gerekmektedir. Çok etkin cleanup işlemi analitte kayıplara neden olduğu gibi işgücü ve maliyeti de arttırmaktadır. Fakat uygun yada yeterli olmayan bir cleanup işlemi de verilerin kalitesi açısından olumsuz etkiye sebep olabilir: (i) analit pikleri matrisden birlikte gelen bileşenler tarafından maskelenebilir, (ii) pozitif hatalara neden olabilir, (iii) gerçek dışı kantitatif

hesaplamaya neden olabilir. Tüm bu etkiler matris etkisi olarak bilinir. Matris etkisi özellikle düşük konsantrasyonlarda ve özellikle de GC-ECD analizlerinde çok önem arz etmektedir. Bazı bileşiklerde bu etki geri alım değerlerini gerçekten çok uzak şekilde artırmaktadır [4].

Matris etkisi eğer çözücü kalibrasyonu kullanılıyorsa pestisitlerin kantitatif analizinde kullanılan kromatografik sistemin koşullarına bağlı olarak çeşitli derecelerde sistematik hatalara neden olabilir. Hangi cleanup sistemi kullanılırsa kullanılsın örnekten ekstraksiyon çözücüsüne geçen materyaller kromatografide artan yada azalan pik alanları şeklinde etki yapabilir [5- 8].

Matris etkisini elimine etmenin çeşitli yolları olmakla birlikte en çok kullanılanı; kalibrasyonu standartlarla birlikte örnek matrisi ile beraber yapmaktır. Genel olarak, çözücü içinde yapılan kalibrasyon (solvent calibration, SC) sonucu elde edilen denkleme “kalibrasyon fonksiyonu”, örnek matrisi içinde yapılan kalibrasyon sonucu elde edilen denkleme “analitik fonksiyon” denilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise validasyonu yapılmak koşuluyla düzeltme fonksiyonu kullanmanın, maliyet ve zamandan tasarruf edilmesi, kör (blank) ekstrakt yapmaya gerek kalmaması, çözücünden tasarruf edilmesi, çok geniş bir kromatografik örnekle çalışılması ve çözücü kalibrasyonu ile kantitatif hesaplamayı kolaylaştırması gibi avantajlarıyla, daha geçerli olduğu vurgulanmaktadır [5].

Krichner et al. [1] matris etkisini dengelemek için; (1) standart ekleme metodunu, (2) izotopik etiketli standart kullanımını, (3) matrisli standart kullanımını, ve (4) analit koruyucu kullanımını önermişlerdir.

Kruve et al. [9] ise Luke metodu (AOAC 985.22), QuEchERS metodu (AOAC 2007.01) ve matris-katı faz dağılım (MSPD) metodu olmak üzere 3 ayrı metodla çeşitli sebze ve meyvelerde 14 adet pestisit kalıntısını LC/MS de analiz ederek, matris etkisi ve geri alım değerleri farklılığını araştırmışlardır. Luke ve QuEchERS metodu tüm sonuçlarda iyi ve yeterli bulunmuştur. Luke metodu iyon baskılamasında QuEchERS metoduna göre daha az etki yapmasına rağmen, geri alım değeri QuEchERS’ da çok yüksek olduğu için tercih nedeni

olmuştur. MSPD de ise matris etkisi az fakat geri alım değeri kabul edilemez düzeyde düşük olmuştur. Araştırmacılar matris etkisi ve geri alımın matrise bağlı olduğunu ve metot validasyonu sürecinde matris etkisi ve geri alım üzerine birlikte çalışılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Vryzas et al. [10] 28 adet karbamat grubu pestisitlerin analizlerinde, tütün ekstaktının matris etkisini araştırmak için QuEchERS ve metanol (MeOH) ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. MeOH yöntemi, QuEchERS e göre daha fazla matris etkisi göstermiştir. QuEchERS metodu ile tek noktalı matrisli kalibrasyon kullanılarak 3 fortifikasyon seviyesinde (0.1, 0.5 ve 1 ppm) % 60-110 arasında geri alım elde edilmiştir. Araştırmacılar, matris etkisinin çoğunlukla matrisli kalibrasyon ile dengelenebileceğini ve kantitatif hesaplamada tek noktalı matrisli kalibrasyonun en iyi sonucu verdiğini vurgulamışlardır.

Kmellar et al.[11] rutin tarama çalışmalarında önemi olan 160 adet pestisit e.m. ile domates, armut ve portakal örnek matrisleri ile çalışmışlardır. Hem çözücü hemde 3 adet matris içinde; 5, 10, 25, 50, 100, 250 and 500 ng ml⁻¹ konsantrasyonlarında olmak üzere 7 noktalı kalibrasyon yaparak, doğruluk, matris etkisi, geri alım, dedeksiyon limiti (LOD) ve tekrar edilebilirliklerini karşılamışlardır. Pestisitlerin % 67, % 21 ve % 12 si, sırasıyla, az (<% 20), orta (% 20-50) ve güçlü (> % 50) matris etkisi göstermiştir. Çalışılan 5- 500 ng ml⁻¹ kalibrasyon sınırında,10 adet pestisitte hassaslık ve doğruluk problemi bulunmuştur. 100 µg kg⁻¹ fortifikasyon seviyesinde geri alımlar, kabul edilebilir sınırlar içinde [3], sırasıyla domates, armut ve portakalda % 97, % 98 ve % 97 olarak bulunmuştur. Çoğu domates örnek matrisinde olmak üzere oransal standart sapma (RSD) değerleri birkaç durumda % 20 yi aşmıştır.

Bu çalışmada, güncel literatürlerin ve direktiflerin doğrultusunda örnek ekstraktında bulunan ve örnekten gelen bileşiklerin kromatografik analizlerde oluşturduğu matris etkisi, geniş bir şekilde ele alınmıştır. Matris etki mekanizması ve etkinin koşulları, etkinin öneminin araştırılması ve matris etkisinden korunma yolları ortaya konmuştur.

2. ÖRNEK MATRİSİNİN ETKİSİ

2.1. Etki Mekanizması

Örnek matrisi, matris ekstraktı içindeki pestisit kalıntılarının kromatografide pik alanlarında, matrisli olmayan aynı konsantrasyon ile karşılaştırıldığında, bir artışa sebep olabilir. Bu problem, sıcak enjektör çıkışından kolona pestisit transferinde matrisin işin içine karışması şeklinde tanımlanmıştır. Örnek matrisi, buharlaşma sürecinde bozulmaya eğilimli bileşikler için termal stresi azaltarak ve polar pestisitlerin adsorbsiyon ve düşük salımını minimize ederek enjektördeki aktif bölgeleri maskeleyerek pestisit ayrıştırma kolonuna transferini artırır. Bu etki “matrisin oluşturduğu kromatografik sinyal artışı” veya kısaca “matrisin oluşturduğu artış” olarak tanımlanmıştır [8].

Analiz edilen örnekte safsızlık ve kirlilikten dolayı enjektör ve dedektör sisteminde problemler olabilir. Örnek matrisinin enjektörün aktif bölgesini bloke etmesi, dolayısıyla analitlerin termal degradasyonunu/adsorbsiyonunu engellemesi nedenleriyle, GC kolonuna artan oranda örnek transferi olabilir. Bu artış, çoğu literatürün desteklediği gibi % 100 ü çok aşan geri alım değerlerine neden olur [4].

Kromatografik analizlerdeki büyük gelişmelere rağmen matrisin oluşturduğu kromatografik sinyal artışı olarak matris etkisi konusu hala gündemdedir. Gerçek örnek enjekte edildiğinde, matris bileşenleri GC inlet ve kolon sisteminde aktif bölgeleri bloke edebilir, bu da aktif bölgelerde adsorbsiyon ve degradasyonun sebep olarak anlatitte hassasiyet kaybına neden olur. Bu olay, matris içeren solusyonlarda, matristen arı solusyonlardakine göre, analitin pik alanında (sinyal) bir artışa sebep olur [1].

LC/MS sisteminde co-elute materyallerin oluşturduğu iyonizasyonun baskılanması yada artırması sözkonusudur. İşte bu başka bileşiklerin olması durumunda iyonizasyon verimindeki değişiklikler matris etkisi olarak bilinir. İyon baskılanmanın tam mekanizması bilinmemekle birlikte, matris etkisi buharlaşma özelliğinde olmayan materyaller veya yüksek yüzey aktivitesine sahip olan bileşikler tarafından oluşturulur. Matris etkisi analitin kimyasal yapısına bağlıdır. Co-eluting bileşikler, polar bileşiklerin iyonizasyon verimini, daha az polar bileşiklerin iyonizasyonuna göre daha fazla etkiler [9].

2.2. Matris Etkisini Etkileyen Koşullar

Araştırmacılar, matris etkisinin; ekstrakttaki matrisin tipi ve konsantrasyonuna, enjektörün konfigürasyonuna ve koromatografik kolon koşullarına, ekstrakttaki analit konsantrasyonuna bağlı olarak değişebileceğini vurgulamışlardır. Bu etki, çok uzun kromatografik koşullarında bile olsa, günden güne değişebilir. Bundan dolayı metod validasyonu sürecinde geniş bir matris etkisi çalışması yapılması çok anlamlı değildir. Buna rağmen, kesin bir kantitatif hesaplama istendiğinde, matrisli standart solüsyonlarla (matrix calibration, MC) dar aralıklı konsantrasyonlarla parantez kalibrasyonu uygulanmalıdır. Matris etkisi MC ve SC ile hesaplanan analit konsantrasyonları arasındaki relatif farklılık olarak açıklanabilir. Bazı bileşiklerin ortalama geri alım değerleri kabul edilebilir % 70 limitinin altında olursa MC uygulanmalıdır. Ayrıca, GC veya HPLC kolonunu kontamine etmemek ve matris etkisinden kaçınmak için ilave bir cleanup uygulanmalıdır [12, 13].

Erney et al. [2] matris etkisine, örnek matrisi tipinin etkisi konusunda geniş bilgiler vermişlerdir. Araştırmacılar, örnek matrisinin oluşturduğu artırıcı etki üzerine matris tipinin, matris:analit konsantrasyonu oranının, enjektör tipi ve sıcaklığının etkili olduğunu belirtmişlerdir (Tablo 1). Organik fosforlu pestisitlerde matris etkisini minimize etmek için splitless modda sıcak kolona enjeksiyon yapmak önerilmiştir. Süt kaymağı ekstraktları, süt ekstraktı ile karşılaştırıldığında daha düşük sinyal artışı göstermiştir. Enjeksiyon sıcaklığını artışıında bazı pestisitlerde artan bir matris etkisi görülürken bazılarında ise azalmıştır.

Tablo 1. Bazı organik fosforlu pestisitlerde sıcak kolon enjeksiyonu kullanarak matrisin oluşturduğu sinyal artışı (matris standart/matris içermeyen çözücü standardı) üzerine örnek matris tipinin ve enjeksiyon koşullarının etkisi [2].

Enjektör sıcaklığı, °C	Matris ekstraktı	Organik fosforlu pestisitler			
		Acephate	Omethoate	Dimethoate	Chlorpyrifos
170	Süt	1.67	1.79	1.32	1.33
	Kaymak	1.50	1.18	1.14	1.15
210	Süt	1.61	1.79	1.46	1.33
	Kaymak	1.42	1.52	1.31	1.03
230	Süt	1.59	1.58	1.24	1.23
	Kaymak	1.28	1.30	1.10	0.94

Ayrıca **Tablo 2**'de domates, biber ve hıyar matrislerinde, matris etkisi varyasyonu görülmektedir. Burada sonuçlar, matris olmaksızın ve matrisli kalibrasyona göre elde edilen geri alım % lerine göre açıklanmıştır. Domates ve biber örneklerinde, düşük pestisit konsantrasyonlarında, elde edilen yüksek geri alım değerleri ile güçlü bir matrisin oluşturduğu artış etkisi gözlemlenmiştir. Genel olarak matrisli yapılan kalibrasyon, matrisli olmayan kalibrasyona göre geri alım belirlenmesinde daha gerçekçi sonuçlar vermiştir [14].

Tablo 2. Domates, biber ve hıyar örneklerinden matrisli kalibrasyon ve çözücü kalibrasyon kullanılarak pestisitlerin geri alımı üzerine konsantrasyonun etkisi [14].

Konsantrasyon (mg/kg)	Pestisit	Matris	Kalibrasyon		
			Örnek matrisi olmayan	Örnek matrisli	
<0.02 (LOQ)	Chlorothalonil	Domates	253	120	
		Biber	154	80	
		Hıyar	105	80	
	Captan	Domates	245	210	
		Biber	257	120	
		Hıyar	184	70	
	Primicarb	Domates	114	85	
		Biber	117	80	
		Hıyar	87	87	
	0.21→ 2	Chlorothalonil	Domates	230	115
			Biber	88	86
			Hıyar	99	95
Captan		Domates	146	106	
		Biber	104	90	
		Hıyar	150	82	
Primicarb		Domates	106	100	
		Biber	118	102	
		Hıyar	93	93	

Poole [8]'e göre matrisin oluşturduğu sinyal artış etkisi, analit konsantrasyonu/matris konsantrasyonu oranına bağlıdır. Krueve et al.[9] ise bu etkinin analite, matris tipine ve örnek hazırlama/işleme durumuna bağlı olarak değişebileceğini vurgulamışlardır.

Hajslova et al. [4], matris etkisi üzerine etkili olan faktörleri şöyle açıklamışlardır; (i) pestisit karakteri: polar pestisitler yüksek geri alma daha yatkındırlar, (ii) matris tipi: ekstrakt içine geçen co-ekstraktlar önemlidir, matris respons artışına sebep olanlar, portakaldaki esensiyel yağlar, hububatın mumsu bileşenleri, (iii) analit/matris konsantrasyonu: ençok matris etkisi, düşük analit konsantrasyonlarında ve/veya örnekteki yüksek matris konsantrasyonlarında görülür. (iv) GC sisteminin geçmişi: GC inlet kısmını kontamine durumu.

Tablo 3. Çözücü ve örnek matrisi içinde kalibrasyon standartlarının GC de sinyal farklılıkları [15].

Analit	Kalibrasyon Seviyeleri						
	1	2	3	4	5	6	7
Dimethoate							
X, enjekte edilen miktar (pg)	9.2	36.8	184	368	552	827	1103
Y_{solv} , çözücü kalibrasyonu	385	3337	20006	40669	59065	82929	109285
Y_{matr} , matris kalibrasyonu (2.5 mg örnek eşdeğeri)	897.66	3739.33	18834.33	37550.33	55553	79397	100381.3
Fark; $Y_{matr}-Y_{solv}=d_1$	512.66	402.33	-1171.67	-3118.67	-3512	-3532	-8903.67
Farkların ortalaması (\bar{d}):	-2760.43						
Farkların standart sapması (SD)	3221.49						
Chlorothalonil							
X, enjekte edilen miktar (pg)	16.3	65.2	326	652	979	1468	1958
Y_{solv} , çözücü kalibrasyonu	0	61.3	2318	4653	7007	10215	13521
Y_{matr} , matris kalibrasyonu (2.5 mg örnek eşdeğeri)	40.66	476	2434	5010	7336	10665	14164
$Y_{matr}-Y_{solv}=d_1$	40.66	414.7	116	357	329	450	643
Farkların ortalaması (\bar{d}):	335.766						
Farkların standart sapması (SD)	203.94						

3. MATRİS ETKİSİNİN ÖNEMİNİN İSTATİSTİKSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI

Yapılan bir çalışmada dimethoate ve chlorothalonil'in kalıntı analizlerinde örnek matrisi etkisi araştırılmış ve istatistiksel olarak önemi değerlendirilmiştir. Bu amaçla GC analizi için; 7 ayrı konsantrasyonda hem çözücü, hem de 2.5 g örnek eşdeğeri blank içeren temizlenmiş ekstrakt

inde kalibrasyon karışımları hazırlanmıştır (Tablo 3). Standartlar GC kolonuna 2 tekrarlı olarak (bir dedeksiyon sistemi için enjeksiyon sayısı $k=2*7=14$) enjekte edilmiştir. Kalibrasyon noktası sayısının etkisini göstermek için; 3 seviyeli kalibrasyon ($k=2*3=6$) da uygulanmış (Tablo 3'de koyu yazılanlar), 4 seviye hesaplamalara dahil edilmemiştir [15].

Çözücü ve örnek matrisi içinde dimethoate ve chlorothalonil için doğrusal regresyon denklemleri ve diğer kalibrasyon parametreleri Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Kalibrasyon parametrelerinin özeti [15].

Analit	Kalibrasyon seviyesi	Regresyon denklemleri	R ²	S _b
Çözücü içinde dimethoate	7	Y=99.5x +1318	0.9975	878
Matris içinde dimethoate	7	Y=92.2x + 1798	0.9967	906
Çözücü içinde dimethoate	3	Y=98.6x +1459	0.9987	1612
Matris içinde dimethoate	3	Y=90.1x + 1815	0.9979	1412
Çözücü içinde chlorothalonil	7	Y=7.03x - 97	0.9987	150.5
Matris içinde chlorothalonil	7	Y=70.26x + 67.8	0.9993	128.4
Çözücü içinde chlorothalonil	3	Y=6.95x - 17.7	0.9980	179.3
Matris içinde chlorothalonil	3	Y=7.24x + 69.7	0.9950	310.1

Her iki pestisit için matris etkisinin önemi data çiftleri ile *t* -testi uygulanarak araştırılmıştır (Eşitlik 1).

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_D} \quad (1)$$

\bar{d} = Farkların (d_i) ortalaması ve S_D = Farkların (d_i) standart sapmasıdır.

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

serbestlik derecesi $v=n-1$, n = data çifti sayısı

Eşitlik (1) ile dimethoate için hesaplanan t_{hesap} değeri, 2.267 dir. Tablo değeri ise % 95 güven seviyesinde ve n-1 serbestlik derecesinde (7-1) $t_{tablo,6,0.05}$ değeri 2.45 dir. $t_{tablo} > t_{hesap}$ olduğundan çözücü içinde yapılan kalibrasyon ile, örnek matrisi ile yapılan kalibrasyonlar arasındaki farklılık, diğer bir ifade ile matris etkisi önemsiz bulunmuştur.

Oysa Eşitlik (1) ile chlorothalonil için hesaplanan t_{hesap} değeri, 4.36 dir. Tablo değeri ise yine $t_{tablo,6,0.05}$ değeri 2.45 dir. Bu defa $t_{tablo} < t_{hesap}$ olduğundan çözücü içinde yapılan kalibrasyon ile, örnek matrisi ile yapılan kalibrasyonlar arasındaki farklılık, diğer bir ifade ile matris etkisi önemli bulunmuştur.

Ayrıca Tablo 4’de matris etkisi kesim noktalarının (regresyon doğrusunun y eksenini kestiği noktanın orijine olan uzaklığı) karşılaştırılması ile de görülebilir. Chlorothalonilde kesişim, çözücü kalibrasyonu ile karşılaştırıldığında artmış, dimethoate’da ise azalmıştır. Diemthoateda eğim farklılığı (varyansı) daha geniş olmasına rağmen, çiftli t-testi matris etkisi göstermemiştir. Bazı araştırmacılar [12] bu testin matris etkisini arştırmak için hassas bir indiktor olmadığını belirterek alternative yaklaşımlardan bahsetmişlerdir.

Oniki adet pestisit ile 4 fortifikasyon seviyesinde (0.02-2mg/kg) yapılan method validasyonu çalışmasında [15], kantitatif hesaplama SC’a göre yapılmış ve bütün pestisitler için ortalama geri alımlar kabul edilebilir sınırlarda (% 70-110) bulunmuştur [16]. Eğer çözücü kalibrasyonunda geri alımlar kabul edilebilir sınırların dışında olursa, hesaplama matrisli kalibrasyona göre yapılır. Ancak matris etkisi, kromatografik koşullara göre günden güne değişebilir. Laboratuvar içi kalite kontrolün (IQC) bir parçası olarak bu düzenli aralıklarla kontrol edilmelidir. Direktiflerde önerildiği gibi uygulanan metot ile örnekteki kalıntılar 0.7 AL (accepted limit=AL) ile 2 AL arasında ise, analit konsantrasyonunun doğrulaması matris kalibrasyonu ile yapılmalıdır. Alternatif olarak blank ekstraktan olabilecek şüpheleri ortadan kısmen kaldıran, standart ilaveli kalibrasyon kullanılmalıdır.

Jarju et al. [13], elma, havuç, marul, portakal, domates örneklerinde chlorothalonil, lindane ve permethrin pestisitlerinin GC de geri alım çalışmalarında matrisli kalibrasyon kullanmışlar ve çözücü kalibrasyonu ile karşılaştırmışlardır. Blank ekstraktlarını matris kalibrasyonu için

kullanmışlardır. Her matris için 3 tekrarlı analizler yapılmıştır. Kalibrasyon denkleminde elde edilen analit konsantrasyonuna matris etkisinin önemini istatistiksel olarak değerlendirmek için, isoocatane çözücüsü ve matrisli kalibrasyonda, kalibrasyon çizgisinin güven aralıkları hesaplanmıştır. SC denklemiyle analit konsantrasyonu hesaplandığında, MC ile hesaplanan analitin güven aralıklarının dışında ise matris etkisi önemli olarak kabul edilmiştir. Chlorothalonilin MC da kalibrasyon noktalarının güven aralıkları, her bir kalibrasyon seviyesi için matris etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Permethrin’de ise matris etkisi önemli bulunmamış, ancak artan analit konsantrasyonlarında bunun değişebileceği vurgulanmıştır. Matris etkisini belirlemek için “güven aralıkları yaklaşımı”nın kullanımının tek dezavantajı kalibrasyon çizgisinin doğrusallığıdır. Eğer kalibrasyon çizgisinin eğrisel olduğuna dair bir delil varsa çok geniş bir güven aralığı sözkonusu olacağından bu yaklaşım geçerli olmayabilir.

Yüzde olarak matris etkisi, MC da elde edilen analit sinyalinin (pik alanı), SC da ki sinyale bölümü ve 100 ile çarpımı olarak açıklanabilir. Matris etkisi, analit konsantrasyonları arasındaki relatif farklılığın hesaplanması şeklinde de açıklanabilir. Bu farklılık, enjekte edilen analit konsantrasyonuna bağlı olarak, matris etkisini göstermede en iyi yaklaşımdır. Araştırmacıların yaptıkları çalışmada 50 pg’dan düşük enjeksiyonlarda matris etkisi daha etkin bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlarda matris etkisi daha önemlidir. Hatta analitlerin düşük konsantrasyonları degradasyona daha yatkındır. Bundan dolayı her iki proses (matris etkisi ve degradasyon) ilk kalibrasyon seviyesini daha çok etkiler [7].

Matris etkisinin istatistiksel önemini açıklayan geniş bir çalışma da Gonzales et al. [17], tarafından yapılmıştır. 8 adet organik fosforlu pestisit 8 adet meyve sebze kalıntı araştırmaları için yapılan geri alım çalışmasında 4 seviyeli SC ve MC kullanılmış ve her iki kalibrasyon sonuçlarının istatistiksel önemi kovaryans analizi (ANCOVA) ile araştırılmıştır. Denemeler Haziran-Eylül arasında her ay tekrar edilmiştir. Bu amaçla kalibrasyon solusyonları (SC ve MC), blank örnek ve spike edilmiş örnek ekstraktları 3 tekrarlı olarak analiz edilmişlerdir. Her tekerrürün dataları en az kareler metodu kullanarak düz bir regresyon çizgisi çizilmiş ve her tekerrürün kalibrasyon denklemini hesaplanmıştır [15, 18]. İlk aşamada tek bir gündeki tekrar edilebilirliklerini kontrol etmek için SC ve MC nin günlük tekerrür değerlerine ANCOVA testi uygulanmıştır. Prosedür F testi ile eğim (b) ve kesişim (a) değerlerinin

karşılaştırılmasından ibarettir. İlgili parametre için eğer hesaplanan F değeri (F_{hesap}) tablo F değerinden (F_{tablo}) küçük ise farklılık önemli değildir.

Tablo 5. Ko-varyans analizi (ANCOVA) testi sonuçları SC ile MC verilerinin karşılaştırılması^a [17].

Analit/matris	$F_{hesaplanan}$		Analit/matris	$F_{hesaplanan}$	
	Eğim	Kesişim		Eğim	Kesişim
Chlorpyrifos-methyl			Parathion-methyl		
Domates	14.40	62.00	Domates	35.49	167.89
Biber	3.58 ^b	4.17 ^b	Biber	0.81 ^b	4.24 ^b
Kavun	16.32	21.61	Kabak	1.48 ^b	1.76 ^b
Karpuz	0.84 ^b	7.25	Hıyar	25.41	82.67
Ethoprophos			Ethoprophos		
Domates	49.34	204.85	Domates	58.59	262.04
Biber	16.54	79.83	Biber	15.20	29.27
Kavun	56.54	160.54	Kavun	29.57	74.98
Karpuz	0.41 ^b	1.49 ^b	Karpuz	11.56	38.87

^a: Eğim için $F_{tab}=4.35$; kesişim için $F_{tab}=4.33$

^b: Eğim ve kesişim farklılıkları

istatistiksel olarak önemsizdir.

Örnek olarak haziran ayında ki denemelerde yapılan değerlendirmeler Tablo 5’de sunulmuştur. Chlorpyrifos–methyl’in biberde, ethoprophos’un karpuzda ve parathion-methyl’in biber ve dolmalık kabakta yapılan kalibrasyon denklemlerinin eğim değerleri önemli derecede fark etmemiştir. ($F_{hesap} < F_{tablo}$). Kesişim değerleri de istatistiksel olarak aynıdır ki bu da ethoprophos ve parathion-methyl’in kantitatif analizinde matris etkisi herhangi bir etki yapmadığını gösterir. Fakat chlorpyrifos–methyl karpuzda eğim benzer, ancak kesişim farklı bulunmuştur ki burada kantitatif analiz sistematik bias etkisi sözkonusudur. Geri kalan tüm durumlarda, her iki eğim ve kesişim parametreleri için $F_{hesap} > F_{tablo}$ olduğundan, SC ve MC kalibrasyonları arasındaki farklılık önemlidir. Bu matris içeriğinin kalıntı analizlerinde kantitatif hesaplamada orantılı ve sistematik bias oluşturduğu anlamına gelir [17].

Pool [8] de SC ve MC kalibrasyonları arasında yapılan F testi ile eğim ve kesişim değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı ($F_{hesap} < F_{tablo}$) sürece SC nin kullanılabilceğini belirtmiştir.

4. MATRİS ETKİSİNE EĞİLİMLİ PESTİSİTLER VE ÖRNEKLER

Çoğu bileşikler, termal olarak stabil olmaları veya sıcak enjektör çıkışında kısıtlı adsorbsiyona eğilimli olmaları gibi nedenlerle, matrisin oluşturduğu artış etkisinden etkilenmezler. Matrisin oluşturduğu artış etkisine hassas olan pestisitler Poole [8] tarafından 57 adet olarak açıklanmıştır. Bu bileşikler; polardır ve güçlü hidrojen bağları vardır. Organikfosforlu pestisitler [(-P=S) grubu olanlar] bünyelerindeki (-P=O) grubu ile matrisin oluşturduğu artış etkisine hassas değildirler. Değişik literatürlerde matris artışı etkisi gösteren pestisit-örnek çiftleri; insan ürünü-acepahate, sert çekirdekli meyve ve meyve suyu-pestisitler, bal-pestisit, üzüm şırası ve şarap-akarisit fungusit, bitkisel yağ-pestisit, et-pestisit, sediment toprak-pestisit, kokulu gül ve ürünleri-chlorpyrifos, içme suyu-hajojenli furanonlar, hububat-fusarium toksinleri olarak verilmiştir.

Hajslova et al.[4] ise, acepahte, methamidophos, omethoate, iprodione, dimethoate, malathion, methidation pestisitlerini, matris etkisi nedeniyle yüksek geri alım eldesine eğilimli pestisitler olarak sıralamışlardır.

5.MATRİS ETKİSİ SORUNUNUN ÇÖZÜM YOLLARI

5.1. Örnek Matrisli Kalibrasyon

Kalibrasyon, matris etkisini ve kabul edilebilir interference'ı dengelemek için yapılır. Matris blank analizler için hazırlanmalıdır. Pestisit standardı analiz edilecek olan örnek matrisinin blank ekstraktı üzerine ilave edilir. Matris etkisi oluşturmaya eğilimli olan teknik yada ekipmanlar kullanılmasının gerekli olduğunda, örnek matrisli kalibrasyon ile daha güvenilir kalibrasyon yapılmış olur. Örnek matrisli kalibrasyon matris etkisini telafi eder ama etkiyi tamamen elimine etmez. Çünkü temelinde yatan etki kalır ve etkinin derecesi, bir matris ya da örnekten diğerine - özellikle de matris konsantrasyonuna- göre değişir. Matris etkisi örneğe bağımlı olduğunda standart ilavesi yöntemi uygulanır [19].

Örnek matrisli kalibrasyon, Hill and Reynolds [20] tarafından, analiz edilecek ürün ekstraktı içinde hazırlanan standartların kullanılması ile yapılan kalibrasyon olarak tanımlanmıştır. Matris konsantrasyonu analiz edilecek örneğin konsantrasyonu ile aynı olmalıdır. Burada amaç determinasyon sistemi üzerine ko-ekstraktive'lerin etkisinin dengelenmesidir. Bu etkiler çoğunlukla tahmin edilemez, ancak eğer ko-ekstraktive'lerin etkisinin olmadığı saptanmış ise MC kullanmak gereksizdir.

Bu tür çalışmalarda hazırlanan matrisli kalibrasyonlardan injekte edilen hacim içindeki örnek eşdeğer miktarı ile analiz edilecek örnek ekstraktından enjekte edilen hacim içindeki örnek eşdeğer miktarı aynı olmalıdır. Aksi halde uyumsuzluk olur. Tiryaki ve ark. [21] tarafından yapılan böyle bir çalışmada, çalışılan tüm örneklerin kapsanması açısından, 0.25 g/ml örnek eşdeğeri ve 2.5 g/ml örnek eşdeğerinde olmak üzere iki farklı örnek matrisli kalibrasyon kullanılmıştır. Bu çalışma ile ilgili kalibrasyon parametreleri Tablo 6'da özetlenmiştir.

Matris etkisi olasılığı metot validasyonunda değerlendirilmelidir. Kullanılan teknik, matris etkisinden arı değilse, doğrulukta aynı veya daha üstün bir etki sağlayan alternatif bir yaklaşım olmadıkça, kalibrasyon örnek matrisi içinde yapılmalıdır. Blank matris ekstraktları (veya örnekleri) kalibrasyon için kullanılabilir. Her bir matris etkisini elimine etmek için en iyi yöntem standart ekleme ile kalibrasyon yapmaktır. Burada potansiyel problem, değişik örnekler, değişik ekstraktı tipleri, değişik ürünler ve farklı matris konsantrasyonları farklı büyüklükte matris etkisi gösterebilir.

Eğer kalibrasyonda düşük bir hata kabul edilebilirse, temsili matris geniş bir örnek grubu analizinde kalibrasyon amaçlı kullanılabilir. Temsili matris onların biyolojik veya analitik benzerliklerine göre seçilmelidir. Bu, su, lipit, şeker içerikleri ve pH ile ilgili olabilir. Örneğin, portakal turunçgiller için, marul yeşil yapraklı sebzeler için temsili olarak seçilebilir [19, 22, 23, 24].

Özetle örnek matrisi etkisini elimine etmek için en iyi yolun örnek matrisli standartlarla kalibrasyon olduğu ve matrisli kalibrasyonlarda da çözücü kalibrasyonunda olduğu gibi, kalibrasyonun doğrusallığının kontrol edilmesi gerektiği bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda ve çeşitli AB direktif ve kılavuzlarında belirtilmiştir [1, 2, 3, 4, 8, 9, 15, 16, 19, 20,

24, 25, 26, 27]. Ancak Kirchner et al, [1] bu yaklaşımın çok kullanılmasına rağmen, bir kritik durumundan bahsetmişler ve matris etkisini dengeleyebilmesi için; matrisli standanın kompozisyonu gerçek örnek matrisindeki kompozisyona mümkün olduğu kadar yakın olmalıdır.

Tablo 6. Çözücü ve iki farklı örnek eşdeğerinde matris kalibrasyonunda (beş seviyeli) kalibrasyon parametreleri [21].

Analit	Doğrusal limit, $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	Kalibrasyon veya analitik fonksiyon, ^a $y=a+bx$	Korelasyon katsayısı, R	Relative kalıntısasal standart sapma, $S_{\Delta y/\bar{y}}$
Çözücü kalibrasyonu				
Chlorpyrifos	20-60	$y = - 3.624 + 2.4597x$	0.970	0.059
Malathion	20-60	$y = - 4.853 + 1.8229x$	0.962	0.079
Matrisli kalibrasyon (0.25 g /mL ÖEM*)				
Chlorpyrifos	20-60	$y = 1.393 + 1.6978x$	0.971	0.071
Malathion	20-60	$y = 4.799 + 1.2821x$	0.958	0.087
Matrisli kalibrasyon (2.5 g/mL ÖEM)				
Chlorpyrifos	20-60	$y = - 6.968 + 2.2278x$	0.977	0.052
Malathion	20-60	$y = - 3.339 + 1.7321x$	0.976	0.049

*ÖEM:örnek eşdeğer miktarı

Menkissoglu and Fotopoulou [14] matrisli yapılan kalibrasyonun matrisli olmayan kalibrasyona göre geri alım belirlenmesinde daha gerçekçi sonuçlar verdiğini, Patel et al. [6] de matrisli standartlar ile yapılan kalibrasyon kullanma ile matris etkisinin sebep olduğu sinyal artışı/baskılanması olayının minimize edilebildiğini belirtmişlerdir.

5.2. Düzeltme Fonksiyonu

Bazı araştırmacılar matrisli kalibrasyon kullanmayı analizlerde zaman kaybedici bir faktör olarak düşünmüşler, matris etkisini elimine edecek alternatif çözümler araştırmışlardır. Bunlardan biri de düzeltme faktörü kullanmaktır [17]. Araştırmacıların yukarıda geniş olarak açıklanan

denemelerinde, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin ve düzeltme fonksiyonunun (CF) stabilliğini test etmek için 4 ay denemeleri tekrar etmişlerdir. Her ay yapılan denemede SC ve MC regresyon doğrularının eğim ve kesişimlerinden CF hesaplanmıştır. Her iki kalibrasyonun çizgileri doğrusal düzeltme fonksiyonu, kullanarak ilişkilendirilmiştir.

$$C_{CF}=A+B.C_{sc} \quad (3)$$

Förmülde, C_{sc} , spike edilen örneklerde SC kullanarak bulunan konsantrasyondur. C_{CF} sonuçlara düzeltme uygulayarak elde edilen konsantrasyondur. A ve B ise her bir kalibrasyonun regresyon katsayılarından Eşitlik 4 ile hesaplanan düzeltme katsayılarıdır.

$$B = \frac{b_{SC}}{b_{MC}} \quad A = \frac{a_{SC} - a_{MC}}{b_{MC}} \quad (4)$$

Eşitlik 4 deki küçük harfler, ilgili SC ve MC deki kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayılarıdır.

Daha sonra Haziran Temmuz, Ağustos ve Eylül de elde edilen düzeltme katsayılarının ortalaması alınarak CF elde edilir. Araştırmacılar 8 ayrı pestisit için çeşitli matrislerde elde edilen düzeltme fonksiyonlarını bir tablo ile özetlemişlerdir. Gonzales et al.[17] CF nun validasyonunu da yapmışlardır. Pestisitlerin kantitatif analizinde matris etkisinin oluşturduğu biasdan kaçınmak için CF'lerin kullanımının güvenilirliği, aynı spike edilmiş örneklerin SC ve MC ile analiz edilerek hesaplanması ve SC ile elde edilen sonuçlara CF uygulanması şeklinde test edilmiştir. C_{SC} C_{MC} ve C_{CF} yaklaşımları ile analit geri alım oranları bulunmuştur. Ortalama geri alım değerlerine t testi uygulanmasıyla SC kalibrasyonu ile elde edilen geri alım oranları % 100 geriden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($t_{hesaplanan} > t_{tab}$). Oysa MC kalibrasyonu ile elde edilen geri alım oranları % 100 geri alım ile istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($t_{hesaplanan} < t_{tab}$). Bu da matris etkisinden kaçınarak doğru sonuçlar elde etmek için MC kullanımının etkili bir yol olduğunun göstergesidir. Son olarak da SC ile elde edilen sonuçlara düzeltme faktörü uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar eşli örnek testi ile karşılaştırılmışlardır. Her iki metot arasında % 5 den büyük olasılıkla istatistiksel farklılık görülmemiştir. $t_{hesaplanan} < t_{tab}$ olduğundan MC ve CF ile elde edilen geri alım değerleri arasında önemli farklılık olmamıştır.

Yani SC kullanıp buna düzeltme fonksiyonu uygulamak, MC ile yapılan hesaplamalarla istatistiksel olarak aynı sonucu vermiştir. Araştırmacılar, CF ile kantitatif analizin belirsizlik bütçesine katkısını da değerlendirmişler, genel olarak % 11 den daha az bir ilave belirsizlik bulmuşlardır.

Matris etkisini elimine etmek için Pool et al [8] de düzeltme faktörü üzerine çalışmışlardır. Uzun süre ve bir seri enjeksiyonlarda kullanmaya uygun ve stabil bir metot geliştirmek için yapılan çalışmalarda SC ile yapılan kurveyi kullanarak MC ile eşdeğer sonuçları yansıtması ve bu şekilde analitin gerçek konsantrasyonunu bulunması olanağı vardır. Ancak bu şekilde düzeltme faktörü uygulamak, SC ve MC sonuçlarının önceden bilinmesini gerektirir. Her kurve doğrusal olmalı ve uzun ve çok geniş örnek koşullarında ve kalibrasyon solusyonu enjeksiyonlarında stabil olmalıdır [5].

5.3. Analit Koruyucular (Analyte Protectans, AP)

Örnek matrisinin oluşturduğu artış etkisini elimine etmek için analit koruyucu kullanmanın da bir çözüm olduğunu belirtilmektedir [8, 26]. Analit koruyucular, örnek matrisi içindeki analiti koruyan tek bileşik yada basit karışımlardır [28]. Matrisden ari standart solusyonlarına ve örneğe aynı konsantrasyonlarda ilave edildiğinde, kalibrasyon standartları ve örneklerde matrisin oluşturduğu sinyal artışı etkisini dengelerler. Analit koruyucular, enjektör sisteminin aktif bölgesinde analit ile yarışan maddelerdir ki bu da analit matrisinden bağımsız olarak, analit için maksimum ve eşit sinyal artışını sağlar. Bu rolü yerine getirecek bileşikler genellikle güçlü hidrojen bağlama kapasitesindedirler.

Anastassiades et al. [28], GC sisteminde aktif bölgeleri maskeleyen maskeleyen ajanlarını bulmak için ve pestisitlerde güçlü bir sinyal artışını sağlamak için, Erney et al. [2] nin girişimlerini revize etmişlerdir. Analit koruyucu (AP) olarak, üç bileşik (ethylglycerol, gulonolactone ve sorbitol) çalışılan farklı kimyasal sınıftaki 90 bileşik arasından seçilmiştir. Bunlar GC sisteminde, matrisle enjekte edilen (co-injected) analitleri degradasyon ve/veya adsorbsiyona karşı korurlar. Bu görüşte, sinyal artışı oluşturmak için, AP, örnek ekstraktına ve matristen ari çözücü standardına ilave edilir. AP kullanımının ana avantajı kalibrasyon standardı hazırlarken kolay oluşu ve analizin doğruluğunu iyileştirmesidir. Burada önemli olan

koruyucuların çözücü içindeki standartlarla, matris içindeki standartlara eşit olarak artırıcı etki yapması yada sinyal artışını dengelemesidir.

Başka bir çalışmada değişik oranda analit koruyucu karışımı (enjekte edilen örnekte 3-ethoxy-1,2-propanediol; gulonolactone ve sorbitol'un sırasıyla 10, 1 ve 1 mg/ml seviyesinde) ilave edilmiş ve edilmemiş asetonitril ekstraktında 100 ng/ml pestisit enjeksiyonunu sinyal artışları karşılaştırılmıştır. Kromatogramlarda analit koruyucu ilave edilenlerde eşit bir sinyal artışı gözlemlenmiştir [8].

Poole [8] analit koruyucularda olması gereken özellikleri şöyle sıralamışlardır; matrisden bağımsız olarak analitin korunmasını sağlamalıdır; solusyonda veya enjeksiyon sürecinde analit ile reaksiyona girmemeli veya analiti degrade etmemelidir; matrisden ari standartlar ve örnek ekstraktı için matris artış etkisini eşitlemek için gerekli olan konsantrasyonda ekstraksiyon çözücüsü içinde çözülebilir olmalıdır; kromatografik sistemde akümüle olmamalı ve analitin dedeksiyonunda interferens oluşturmamalıdır.

Kirchner et al. [1] da QuEChERS metoduyla GC-MS kullanarak yaptıkları pestisit kalıntı analizlerinde matris etkisini elimine etmek için AP kullanmışlardır.

5.4. Standart Ekleme

Matrisli kalibrasyonun alternatifi standart ekleme olabilir. Bu, bilinen miktar analitin, ekstraksiyondan hemen önce iki analitik örnekte birisine ilave edilmesi diğerine edilmemesi ile yapılır. Spike edilen ve edilmeyen ekstraktların dedektörden elde edilen pik alanları arasındaki fark, ilave edilen bilinen miktar analitin gerçek pik alanıdır, bu geri alımı da dengeler. Spike edilmeyen örnek ekstraktındaki analitin miktarı bir orantı [(spike edilmeyen örnek sinyali x ilave edilen miktar)/(spike edilen örnek sinyali – spike edilmeyen örnek sinyali)] ile hesaplanabilir. Matris etkisi böylece dengelenmiş olur. Bu teknik, örnekteki analit konsantrasyonu hakkında bilgi sahibi olunduğunu varsayar, böylece ilave edilen miktar örnekte var olan ile benzer olmuş olur. Eğer hiçbir bilgi yoksa, artan miktarlarda analit ile örneğin spike edilmesi gerekir, kalibrasyon eğrisi de çizilebilir. Bu teknik otomatik olarak geri alım ve kalibrasyonu ayarlar. Standart ilave etme tekniği, ekstrakte edilen materyale geçen bileşiklerin

oluşturduğu piklerin sebep olduğu kromatografik interference'ı engellemez. Bilinen miktardaki analitin, bir kısım örnek ekstraktına enson determinasyon işleminden hemen önce ilave edilmesi de bir standart ilave etmedir, fakat bu sadece kalibrasyonu dengeler, geri alımla ilgili fikir vermez [19, 22, 24].

Thomson et al. [29]' a göre matris etkisini elimine etmenin yolu standart ya da analit ilavesidir. Matris etkisini elimine etmek için, en doğru olanı standart ilavesidir, fakat bu da enjeksiyon sayısını artırır. Matris etkisi çoğunlukla bileşiğe bağlı olduğu için, iç standart (IS) kullanımı çoklu kalıntı metodunda (MRM) sık kullanılmaz. İdeal IS izotopik olarak etiketli standarttır, ancak bunlar pahalıdır [9].

5.5. Enjeksiyon Sisteminde Carbofrit Uygulaması

Yüksek kaynama özelliğine haiz olan matris bileşiklerinin tuzaklanması ve yoğun matris etkisinden kaçınılması için enjeksiyon çıkışı liner'i Carbofrit ile doldurulur. Carbofrit çok dikkatli bir şekilde yerleştirilmelidir ki örnek Carbofrit yüzeyine verilebilsin. Böylelikle örnek ile cam liner arasındaki interaksyonun önüne geçilebilir. Ancak Carbofrit her 30 örnekten sonra, GC performansındaki dereceli azalmayı engellemek için değiştirilmelidir [25].

5.6. Etkiyi Azaltmak için Matrisde Yapılabilecek Kolaylıklar

Matris etkisini elimine etmek için ilave etkin cleanup işlemleri uygulanabilir. Böylece sinyal artırma durumu dengelenir ve çözücü kalibrasyonu ile kantitatif analiz yapılabilir. Bu bir yönden istenir, başka bir yönden de, matris artırıcı etkisi olmadığından analitin sinyali azaldığından analitin dedeksiyon limitini azaltır. Pratik olarak bu yaklaşım çok inandırıcı değildir. Ayrıca çoklu kalıntı metodlarında, matrisin tamamen elimine edildiği temiz ekstrakt elde etmek olası değildir [8].

Bu konuda temsili matris kullanılabileceği SANCO/2007/3131 [19] da belirtilmiştir. Hill and Reynolds [20] ise günlük olarak çok sayıda örnek analiz etmek zorunda olan rutin analiz laboratuvarları için, kalibrasyon amaçlı referans yada temsili matris seçimini önermişlerdir. Farklı ürün tipleri için, su, şeker, yağ ve/veya asit içerikleri benzer olan temsili matris seçilebilir.

Örneğin kalibrasyonda sebze referans matrisi olarak hıyar, sakız kabağı, biber patlıcan matrisi yerine kullanılabilir.

Ancak, bu görüşe karşı fikirler de vardır; çünkü matrisin oluşturduğu artış etkisi matris tipine bağlıdır ve en gerçek sonuçlar her bir örnek tipi için örneğin kendisinin kullanılmasıyla yapılan kalibrasyon ile elde edilir. Dolayısıyla burada uygunluk ile istenen doğruluk arasında bir denge oluşumu sözkonusudur. Çünkü tam kendi örneği ile yapılan kalibrasyon çoğunlukla metot performansını artırır. Öte yandan, düşük belirsizlik elde etmenin çok önemli olmadığı rutin tarama analizlerinde referans matris belki uygun olabilir. Birçok pestisitler ekstarkt içinde, oda sıcaklığında veya buzdolabında saklandığında makul bir süre stabildirler. Bu özellik referans matris ile kalibrasyonu kolaylaştırır [8].

Kirchner et al. [1] matris etkisini elimine etmek için kullanılan yöntemleri karşılaştırmışlardır. Seçilen pestisitlerde analit koruyucu performansı, matrisli standart kalibrasyonu ile, kalibrasyonun doğrusallığı, ölçümlerin tekrar edilebilirliği ve kullanılan cihazın LOQ'si (LOD: kromatografide S/N'nin 3:1 olduğu analit konsantrasyonu, LOQ: kromatografide S/N'nin 10:1 olduğu analit konsantrasyonudur) bazında karşılaştırılmıştır. Araştırmalarında, AP ile veya olmaksızın çözücü kalibrasyonu; AP ile veya olmaksızın matrisli kalibrasyon, olmak üzere 4 lü kalibrasyonu karşılaştırmışlardır. Çoğu pestisitlerde çözücü kalibrasyonunda, düşük tekrar edilebilirlik elde edilmiş, ancak bunu kolon liner ve retention gap in yeni olmasına bağlamışlar, matris enjeksiyonundan sonra signal:noise oranı değişmiştir. Matrisli kalibrasyon ve AP-matrisli kalibrasyon ile çoğu pestisit için RSD değerleri % 10 un altında kalmıştır. Bir yada 2 istisna hariç olmak üzere tüm kalibrasyon standartları, en düşük kalibrasyon seviyelerinde (LCL) AB kriterlerinde RSD için konulan \leq % 20 değerinin [30] altında tekrar edilebilirlik vermiştir. Yine LOQ değerlendirmesinde, çoğu pestisitlerde çözücü kalibrasyonunda en düşük LOQ elde edilmiştir. Bu da aynı mantıkla matrisden gelen herhangi bir bileşik olmadığından yüksek S/N oranından kaynaklanmaktadır. Kalibrasyonun doğrusallığı karşılaştırılmasında da, AP-çözücü kalibrasyonunun doğrusallık sinyalleri matrisli kalibrasyonunki ile karşılaştırılabilir bulunmuştur. Araştırmacılar çalışmalarının sonunda, doğrusallık, tekrar edilebilirlik (% RSD) ve LOQ kavramları temelinde her 4 kalibrasyon için yapılan değerlendirmelerin, pestisitlerin sorunlu (dichlorvos, methamidophos, acephate ve deltametrim gibi) yada sorunsuz (malathion,

methidathion, cyprodinil gibi) oluşlarına göre de değiştiğini belirtmişlerdir. Ancak en güçlü analit sinyali artışının, AP-matrisli kalibrasyon ile elde edildiğini belirterek bunun kantitatif analizler için en iyi kombinasyon olduğunu vurgulamışlardır.

6. TARTIŞMA

Kromatografik analizlerde analitin verdiği tepki üzerine matris etkisinin oluşturduğu azalan yada artan (çoğunlukla artan etki) etki kantitatif hesaplamayı etkileyen bir faktördür. Matris etkisi problemini ortadan kaldırmayı amaçlayan, matrisli kalibrasyon, analit koruyucu, düzeltme fonksiyonu, referans matris kullanımı ve standart eklemesi gibi alternatiflerin her birinin avantajı ve üstünlükleri vardır. Ancak, bunların problemi çözmeleri, örnek tipi ve varyetesine, ve pestisit özelliğine göre değişmektedir. Genel olarak bu konuda çalışan araştırmacılar, en iyi ve pratik yolun matrisli kalibrasyon ile olabileceğini belirtmektedirler. Ancak üzerinde durulması gereken bir nokta da matris etkisi değerlendirmesinde çok olumlu sonuç veren çözüm alternatifi veya bir analiz metodu düşük geri alımlar verebilmekte yada tekrar edilebilirliği daha yüksek olmaktadır. Bu da matris etkisiyle beraber diğer kalite kriterlerinin metot validasyonu sürecinde beraber değerlendirilmesi gerektiğinin göstergesidir.

KAYNAKLAR

1. Kirchner M., et al., Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 1186, 271–280, 2008.
2. Erney D.R., et al., Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection, *J. Chromatogr.* 638, 57-63, 1993.
3. Anonymous 2004. Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis. Document N° SANCO/10476/2003; 5/February/2004.
4. Hajšlová J., et al., Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *Journal of Chromatography A* 800, 283-295, 1998.
5. Gonzalez F.J.E., et al., Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multi residue analysis. *J.Chromatography A*, 966, 155-165, 2002.
6. Patel K., et al., Analysis of pesticide residues in lettuce by large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS). *Analyst*, 128, 1228-1231, 2003.
7. Soboleva E, Mageto A, Zecchini A, Ambrus A, Matrix effect in GC analysis. In: Applied Research, Agrochemicals Unit, Background Document of “FAO/IAEA Workshop on Introduction to QA/QC Control

- Measures in Pesticide Residue Analytical Laboratories Seibersdorf Laboratories, Austria 12 September - 7 October 2005”.
8. Poole C.F., Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1158, 241-250, 2007.
 9. Krueve A., et al., Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58–66, 2008.
 10. Vryzas Z., Myresiotis C., Papadakis E., Kyrgidou A., and Papadopoulou- Mourkidou E, 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, 13-14 November 2008, Piacenza-Italy, Proceedings Book, PP, p: 58.
 11. Kmellar et al., Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58–66, 2008.
 12. Soboleva E., Rathor N., Mageto A., Ambrus A., Estimation of significance of matrix induced chromatographic effects In: Fajgelj A, Ambrus A (eds) Principles of method validation. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 138-156, 2000.
 13. Jarju PO, El-Bidaoui M, Soboleva E, Turcu MS, and Ambrus A, Reproducibility of GPC separation. In: Applied Research, Agrochemicals Unit, Background Document of “FAO/IAEA Workshop on Introduction to QA/QC Control Measures in Pesticide Residue Analytical Laboratories Seibersdorf Laboratories, Austria 12 September - 7 October 2005”.
 14. Menkissoglu-Spiroudi, U. and Fotopoulou, A., Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables, *J. Environ. Anal. Chem* 84, 1-3, 15-27, 2004.
 15. Anonymous 1999. Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals AOAC/FAO/IAEA/IUPAC Expert Consultation Meeting, Miskolc, Hungary, 8-11 November, 1999. http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val_guide.pdf
 16. Anonymous 2006. Quality control procedures for pesticide residue analysis, EU Document N° SANCO/10232/2006, 24/March/2006.
 17. Gonzalez F.J.E., et al., Estimation and correction of matrix effects in gas chromatographic pesticide multiresidue analytical methods with a nitrogen-phosphorus detector *Analyst*, 127, 1038-1044, 2002.
 18. Anonymous, 1990. ISO 8466-1: Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function International Organization for Standardization, Genève, 1990.
 19. Anonymous 2007. European Commission DG SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed, N° SANCO/2007/3131/31 October 2007.
 20. Hill A.R.C., and Reynolds S.L., Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. *Analyst*, 124, 953-958, 1999.

21. Tiryaki O., Baysoyu D., Seçer E., Aydın G., Testing the stability of pesticides during sample processing for the chlorpyrifos and malathion residue analysis in cucumber, including matrix effects. *Bull.of Environ. Contam. Toxicol.* 80, 1, 38-43. 2008
22. Visi E., 2002. Quality Assurance/Quality Control in pesticide residue laboratories. Possibilities of controlling the various analytical steps. FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control Training workshop on Introduction to QC/QA measures in Pesticide Residue Analytical Lab. 17 June - 26 July IAEA's Laboratories Seibersdorf, Austria.
23. Anonymous, 2004. Guidance document on residue analytical methods, SANCO/825/00 rev.7 17/03/2004.
24. Hill A.R.C., Quality control for pesticide residues analysis-guidelines for residues monitoring in the EU, Document 7826/VI/97, 1997.
25. Agüera A, Piedra L, Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. and Contreras M., Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *Analyst*, 125, 1397–1402, 2000.
26. Cajka T., et al., Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues. *J Sep Sci.* 28(9-10), 1048-1060, 2005.
27. Hill A. 2000. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Doc. SANCO/3103/2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/index_en.htm.
28. Anastassiades M., et al., 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, 2, 421-431, 2003.
29. Thomson, M., et al., Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure App. Chem.*, 74(5), 835-855, 2002.
30. Anonymous 1994. Council Directives 94/43/EC, off. J. Eur.Com. L 22, 31, 1994.