

Bazı meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının analizinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çoklu kalıntı analiz metodunun geliştirilmesi¹

Nuran YİĞİT²

A. Bayhan ÖKTEM³

Gülderen YENTÜR³

SUMMARY

Improvement of multi residue analysis method for pesticide residues in some fruits and vegetables using high pressure liquid chromatography (HPLC)

Multi-residue analyse method using high-pressure liquid chromatography (HPLC) with Diode Array Detector was investigated for the determination of 19 pesticides. Acetonitrile, anhydrous magnesium sulphate and sodium chloride were used in extraction process via anhydrous magnesium sulphate and primary secondary amine were used in cleanup process. Pesticide free samples of eggplant, peach, tomato, mandarin were used for method validation studies and results were found at acceptable range. Instrument Detection Limit (IDL) and Estimated Method Detection Limit (EMDL) were calculated for each pesticide. Correlation coefficient which were acquired from matrix matched calibration graphs were higher than 0.99. Mean recoveries were between 75.39-121.95% and relative standart deviations (RSD%) were lower than 20% for accuracy. Also the RSD which were calculated for precision (intra-day repeatability and inter-day reproducibility) were found lower than 10%. It is thought that, this method can be used easily for residue monitoring programmes. It is simple, economic and has small waste.

Key words: Multi residue analyse method, HPLC, pesticide residue, fruit, vegetable

ÖZET

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)-Diode Array Dedektör kullanılarak 19 tane pestisit kalıntılarının analizine imkan sağlayan çoklu kalıntı analiz metodu geliştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminde asetonyitril, susuz magnezyum sülfat ve sodyum klorür ile temizleme işleminde susuz magnezyum sülfat ve primer sekonder amin kullanılmıştır. Metod geçerli kılma çalışmalarında pestisit içermeyen patlıcan, şeftali, domates, mandalina

¹ Bu makale "Bazı Meyve ve Sebzelerde Pestisit Kalıntılarının Analizinde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Çoklu Kalıntı Analiz Metodunun Geliştirilmesi" isimli Yüksek Lisans çalışmasının bir bölümüdür.

² Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, 06172 Yenimahalle, Ankara

³ Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara

Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: nuran_hayran@hotmail.com

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 21.01.2012

örnekleri kullanılmış ve sonuçlar kabul edilebilir aralıklarda bulunmuştur. Her bir pestisit için cihazın dedeksiyon limiti (IDL) ve Metot dedeksiyon limiti (EMDL) hesaplanmıştır. Matriksde hazırlanan kalibrasyon grafiklerinden elde edilen korelasyon katsayıları 0.99'dan yüksektir. Doğruluk için ortalama geri kazanımlar %75.39-121.95 arasında ve bağıl standart sapmalar (%RSD) %20'den düşüktür. Ayrıca kesinlik (gün içi tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrar üretilebilirlik) için hesaplanan %RSD değerleri %10'dan düşük bulunmuştur. Geliştirilen metod basit, atığı az ve ekonomiktir. Kalıntı izleme programlarında kolaylıkla kullanılabilceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Çoklu kalıntı analiz metodu, HPLC, pestisit kalıntısı, meyve, sebze

GİRİŞ

Kullanılabilir tarım alanlarından kaliteli ve yüksek verim alabilmek için uygulanabilecek yollardan birisi Bitki Koruma Ürünlerinin (BKÜ) diğer adıyla pestisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadeledir. Pestisit kullanımı, artan dünya nüfusunun besin ihtiyacının karşılanmasında, böceklerden kaynaklanan zararların kontrol edilmesinde, hasat öncesinde ve sonrasında ürün kayıplarının azaltılmasında fayda sağlar (González-Rodríguez et al. 2008).

Pestisit kullanımının, pek çok yararına karşın; yetiştirme periyodu süresince ya da depolama sırasında yoğun veya bilinçsiz pestisit kullanımı sonucu ürünlerde, kullanılan bileşiğin kendisi veya parçalanma ürünleri/metabolitleri kalabilmektedir (Tiryaki 2003).

Ürün üzerinde veya içinde bulunan pestisit ve/veya pestisit türevlerine pestisit kalıntısı denilmektedir. Pestisit kalıntıları, kendi kimyasal yapıları veya metabolitleri halinde bulunabilmektedir. İyi tarım uygulamaları (Good Agricultural Practices, GAP) sonucu gıdalarda, tarımsal ürünlerde veya hayvansal yemlerde yasal olarak bulunmasına izin verilen en yüksek pestisit kalıntı miktarı maksimum kalıntı limiti (Maximum Residue Level, MRL) olarak tanımlanmakta ve 1 kg üründe bulunmasına izin verilen mg aktif madde (mg e.m./kg ürün) olarak ifade edilmektedir (Aksu 2007, Anonymous 2007).

Halk sağlığı, çevre ve ticaret açısından sebze ve meyvelerde pestisit kalıntılarının izlenmesi çok önemlidir. Son zamanlarda gümrüklerde yaşanan problemler, tarımsal ürünlerde bulunan pestisit kalıntılarının ve aynı zamanda bazı ürünler için yasaklı olan pestisitlerin sürekli ve doğru bir şekilde izlenip hesaplanmasını gerektirmektedir. Pestisit kalıntı analizlerindeki analitik performansın artırılması daha etkin, düşük zaman ve maliyet gerektiren analizlerin kullanılmasını zorunluluk haline getirmektedir. Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography, GC), Yüksek Basıncılı/Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Pressure/Performance Liquid Chromatography, HPLC) gibi analitik teknikler bu tür maddelerin toprakta, havada, suda ve gıdalarda bulunup bulunmadığını, bulunuyorsa da hangi miktarlarda bulunduğunu ortaya koymak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Columé et al. 2000, Arrebola et al. 2003, Melo et al. 2005, Pizzutti et al. 2007).

Çevre ve gıda örneklerindeki pestisit kalıntı analizleri yıllardır dünyanın her yerinde birçok resmi ve özel laboratuvar tarafından yapılmaktadır. Hiç şüphesiz pestisit kalıntı analizleri için en etkin yaklaşım birden çok pestisit sınıfını içeren çoklu kalıntı analiz metotlarıdır. Çoklu kalıntı analiz metotları, yüksek analiz maliyetini düşürerek laboratuvarların performanslarının artmasını ve daha fazla talebin karşılanmasını sağlar. Dikkate değer ilk çoklu kalıntı analiz metodu 1960'larda Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi kimyagerlerinden P.A. Mills tarafından geliştirilmiştir (Anastassiades et al. 2003).

Tarımda kullanılan pestisitlerin teknolojilerindeki gelişmeler, farklı özelliklere sahip pestisitlerin sentezlenmesi, var olan metotların ihtiyaca cevap verememesi veya daha az kimyasal kullanımı ile daha kısa sürede sonuç veren basit ve hızlı metot arayışları, metot geliştirme çalışmalarının sürekli olarak güncel kalmasına neden olmaktadır. Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde 2007-2009 yılları arasında yürütülen bu çalışmada, yüksek sıcaklıkta bozulan ve uçucu olmayan bazı pestisitler için HPLC/DAD (Diode array detector) kullanılarak basit, hızlı, ekonomik ve güvenilir çoklu kalıntı analiz metodu geliştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan aktif maddeler: Bu çalışmada acetamiprid, azadirachtin, benomyl, cyhexatin, cyromazine, dinocap, flufenoxuron, folpet, oxamyl, azoxystrobin, bifenthrin, buprofezin, carbaryl, diethofencarb, imazalil, imidacloprid, propargite, pyrimethanil, pyriproxyfen, tetradifon, thiacloprid ve thiamethoxam aktif maddeleri kullanılmıştır.

Sebze ve meyve örnekleri: Metot validasyonu çalışmalarında, organik tarım yapılan tarla ve bahçelerden alınan ilaçsız şeftali (İzmir), patlıcan (Ankara), mandalina (Antalya) ve domates (Tokat) örnekleri kullanılmıştır. Örnekler homojenize edildikten sonra analiz edilinceye kadar -18 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Kimyasallar: Asetonitril (%99.9 saflıkta Lichroma, Merck), metanol (%99.5 saflıkta Lichroma, Merck), su (Lichroma, Merck), asetik asit (CH₃COOH) (%100'lük derişik, Merck), sodyum klorür (NaCl) (ekstra saf, Merck), susuz magnezyum sülfat (MgSO₄) (Merck), N₂ gazı (%99.99 saflıkta, Boss), primer-sekonder amin (PSA) (Varian, 1231603), aminopropyl (NH₂) (Macharey-Nagel, 711014.100), Chromabond Diamino (Macharey-Nagel,730653.20), Florosil (MgSiO₃) (Merck, 12518), ve silikajel (SiOH) (Merck, 7733) kullanılmıştır.

Cihaz ve gereçler: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi/Diode Array Dedektör Otomatik enjektörlü (100 örnek kapasiteli) Agilent 1100 HPLC/G1315B DAD model HPLC cihazı, kolon (Nucleosil 100-5C18-250A (25cm x 4.6 mm i.d., 5 µm), homojenizatör, terazi, tüp karıştırıcı, su banyosu, tek kullanımlık filtre (0.45 µm),

N₂ tüpü (%99.99), pH metre, yüksek devirli soğutmalı Santrifüj [60.000×g, 30.000 rpm, (-20)–(+40)°C] ve hesaplamalarda ChemStation LC 3D (rev. B.01.01) data analiz programı kullanılmıştır.

Metot

Standartların hazırlanması

İlk olarak aktif maddelerin metanolde veya asetonitrilde 1.0 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri ve stok çözeltilerin seyreltilmesi ile çalışma çözeltileri (1.0, 10.0 ve 100.0 µg/ml) hazırlanmıştır.

Farklı hareketli faz denemeleri ve kromatografik şartların belirlenmesi

Aktif maddelerin farklı dalga boylarında spektrumları alınarak maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları tespit edilmiştir. Bazı aktifler 254.4 nm dalga boyunda bazıları da 272.4 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı için çalışmada her iki dalga boyu da kullanılmıştır. Daha sonra farklı hareketli faz bileşimleri [su-asetonitril (40:60, 20:80 ve farklı gradient şartlar), su-metanol (40:60, 20:80 ve farklı gradient şartlar), asetik asitli su-asetonitril (40:60, 20:80 ve farklı gradient şartlar)] (Masqué et al. 1998, Otero et al. 2003, Garrido Frenich et al. 2004, Topuz ve ark. 2005), sıcaklık, akış hızları ve analiz süreleri denenmiş ve ayrılmaların en iyi olduğu şartlar belirlenerek metot oluşturulmuştur. Kullanılan bazı pestisitlerin alıkonma zamanlarının birbirine eşit veya çok yakın olması nedeniyle pestisitler 3 farklı gruba ayrılmıştır.

Örneklerin ekstraksiyonu ve temizlenmesi

Örneklerin ekstraksiyonunda ve temizlenmesinde Anastasiades et al. (2003) metodu ile (40 ml'lik santrifüj tüpüne 10.0 g homojenize örnek+10.0 ml asetonitril konur ve 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır, bunun üzerine 4.0 g MgSO₄ ve 1.0 g NaCl ilave edilerek yine 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır ve 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenir. Temizlemede ise bir önceki aşamada elde edilen asetonitril fazından 1.0 ml alınır ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne konur. Bunun üzerine 25 mg PSA ve 150 mg susuz MgSO₄ ilave edilerek 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılır ve 1 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenir.) Aksu (2007) nun metotları kullanılmış, bunlarda bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Temelde her iki yöntem aynı iken ekstraksiyon solventleri, (birinde asetonitril diğerinde asetonitril:diklorometan (1:1) karışımı) ve temizlemede kullanılan kimyasallar (birinde primer seconder amin diğerinde chromabond diamino) yönüyle farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmada referans alınan metotlardaki kimyasalların aynı ve farklı miktarları da denenerek en uygun şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Örnek ekstraksiyonu iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada örnek, çözücü ve nem tutucu ile muamele edilerek aranılan bileşenlerin organik faza geçirilmesi sağlanmış, ikinci aşamada organik faz içerisinde aranılan bileşiklerin dışındaki kirliliklerin, sorbent ilavesi ile ortamdan uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Ekstraksiyonla ilgili

çalışmalarda diğer ürünlere göre daha fazla kirliliğin gözlemlendiği mandalina örneği kullanılmıştır.

Ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi

Bu amaçla yapılan denemelerde sırasıyla asetik asit çözeltisi (suda) (%0.1'lik), asetonitril:asetik asit çözeltisi (suda) (1:1; v/v), metanol ve asetonitril kullanılmıştır.

MgSO₄ ve NaCl kullanımı için yapılan denemeler

Bu aşamada yalnızca yüksek miktarda su tutma kapasitesine sahip olan MgSO₄ kullanımı denenmiştir (Erdik ve ark. 2000). Susuz MgSO₄, suyu tutarak pestisitlerin organik fazdaki dağılımının artmasını sağlar. Ekstraksiyon işlemi 4.0 g susuz MgSO₄ kullanılarak ve kullanılmadan yapılmıştır. Ayrıca 0.5 ve 1.0 g NaCl kullanılarak faz ayırımlarının tam olup olmadığı incelenmiştir.

Temizleme (clean up) aşamasında kullanılacak sorbent ve miktarının belirlenmesi

PSA (Anastassiades et al. 2003, Balinova et al. 2007, Shimelis et al. 2007) chromabond diamino (Aksu 2007), NH₂ (Melo et al. 2005), silikajel (Miliadis et al. 1999) ve florosil (Patil et al. 2009) adsorbanları farklı miktarlarda ayrı ayrı ve birbirleri ile karıştırılarak kullanılmıştır.

Çözücü ve sorbent seçiminin tamamlanmasının ardından geliştirilen metodun geçerliliğinin ortaya konması amacıyla performans karakteristikleri çalışılmıştır. Metot validasyonu, laboratuvar-İçi metot validasyon kriterlerine göre yapılmıştır. Doğrusallık (Linearity), korelasyon katsayısı (r²), IDL, EMDL, doğruluk (accuracy), % geri kazanım (recovery) ve kesinlik (precision) değerleri belirlenmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

HPLC'de metot oluşturulması

Bu çalışmada HPLC kullanılarak, taze meyve ve sebzelerde bulunabilecek pestisit kalıntılarının tespitine yönelik çoklu kalıntı analiz metodu geliştirilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen analiz metodu hem örneklerin kısa sürede, ekonomik ve güvenilir bir şekilde ekstrakte edilebilmelerine hem de HPLC ile analizine imkan sağlamaktadır.

Pestisit kalıntı analizleri ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan cihaz koşulları (Miliadis et al. 1999, Caboni et al. 2005) incelenmiş ve çalışmada yararlanılmıştır. Araştırmada ilk olarak aktif maddelerin metanolde veya asetonitrilde 1.0 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri (Vázquez et al. 2000, Garrido Frenich et al. 2004, Topuz ve ark. 2005) ve stok çözeltilerin asetonitrille seyreltilmesi ile çalışma çözeltileri (1.0, 10.0 ve 100.0 µg/ml) hazırlanmıştır. Pestisit aktif maddelerinin

farklı dalga boylarında spektrumları alınarak maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları tespit edilmiştir. Azadirachtin, cyhexatin ve imazalil aktif maddelerinden sinyal alınmadığı için çalışmadan çıkarılmıştır. Sinyal alınamayan bu aktif maddelerin farklı cihaz ve dedektör kullanımı ile tespit edilebileceği düşünülmektedir. Bazı aktif maddeler 254.4 nm dalga boyunda bazıları da 272.4 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı için çalışmada her iki dalga boyu da kullanılmıştır. Daha sonra farklı hareketli faz bileşimleri (su-asetonitril, su-metanol, asetik asitli su-asetonitril vb.) (Masqué et al. 1998, Otero et al. 2003, Garrido Frenich et al. 2004, Topuz ve ark. 2005), sıcaklık (25.0, 30.0, 35.0, 40.0 ve 45.0 °C), akış hızları (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 ml/dak), analiz süreleri (15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 37.0 40.0, 50.0 ve 60.0 dakika) ve enjeksiyon hacimleri (5.0, 10.0 ve 20.0 µL) denenmiştir. Her defasında yukarıda sayılan parametrelerden yalnızca biri değiştirilerek diğerleri sabit tutulmak koşuluyla pik ayrımlarının sağlanıp sağlanmadığı, pik şeklinin korunup korunmadığı araştırılmıştır. Uzun denemeler sonucunda ters faz sıvı kromatografi ve dereceli elüsyon kullanılarak çalışılan pestisitler için, en kısa sürede en iyi ayrımın sağlandığı Çizelge 1’de verilen koşullar elde edilerek metod oluşturulmuştur. Pestisitlerden bazılarının alıkonma zamanlarının birbirine çok yakın olması veya üst üste çakışması nedeni ile pestisitler alıkonma zamanlarına göre üç farklı gruba ayrılmış bu şekilde çoklu kalıntı analizi yapılmıştır.

Çizelge 1. Agilent 1100 HPLC çalışma koşulları

HPLC bölümleri	Analiz koşulları
Otomatik örnekleyici (ALS)	Agilent 1100 Series otomatik örnekleyici, 100 örnek kapasiteli
Dedektör	G1315B DAD
Kolon	NC100-5C18-250A (25cm x 4.6mm i.d., 5 µm),
Hareketli faz	Asetik asit suda (% 0.14):ACN (v/v) dereceli elüsyon (t=0. dak. % 63 asetik asitli su: % 37 ACN; t=37.dak % 7 asetik asitli su+% 93 ACN.
Akış hızı	1 ml/dak.
Enjeksiyon hacmi	10 µl
Kolon sıcaklığı	40°C
Dalga boyu (λ)	254.4 ve 272.4 nm
Analiz süresi	37 dakika
Bekleme süresi	12 dakika

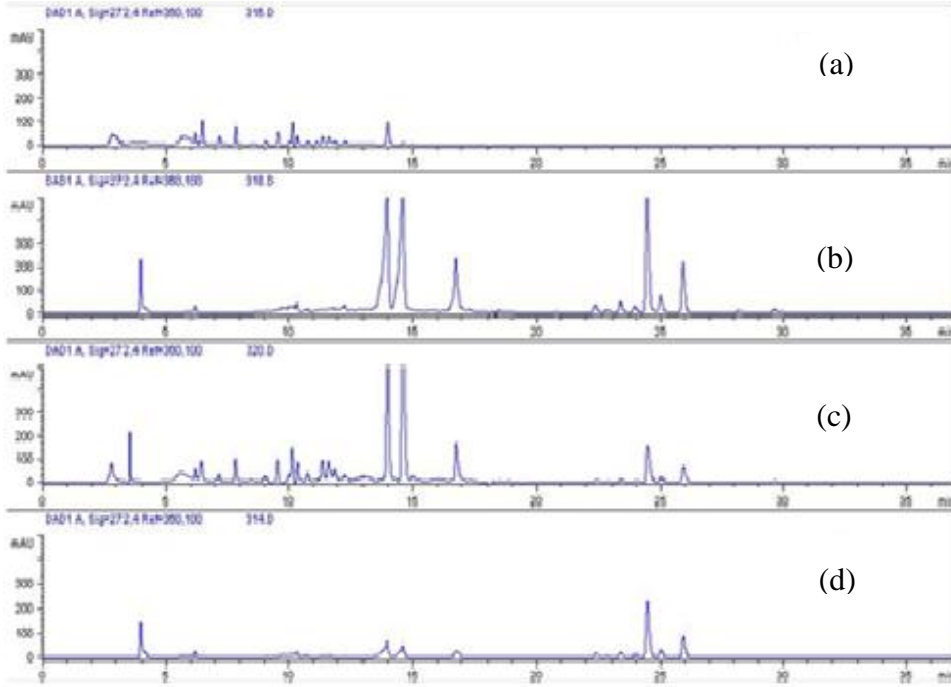
Pestisit aktif maddelerinin yaklaşık 1.0 ve 10.0 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilerinden elde edilen kromatogramlar doğrulamada kullanılmıştır.

Ekstraksiyon metodu ile ilgili çalışmalar

Kromatografik şartlar belirlendikten sonra ekstraksiyonla ilgili denemeler yapılmıştır. Ekstraksiyonda Anastassiades et al. (2003) ile Aksu (2007)’nin metotları kullanılmış ve yukarıda belirtilen modifikasyonlar yapılmıştır. Bu çalışmada sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu yerine katı faz ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin, fazla miktarda çözücü kullanımı,

yeterli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, hassas kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara neden olduğu, ayrıca katı faz ekstraksiyonunun sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha iyi bir ayırım ve yüksek geri kazanım sağladığı bildirilmiştir (Synder et al. 1997, Yavuz ve Aksoy 2006).

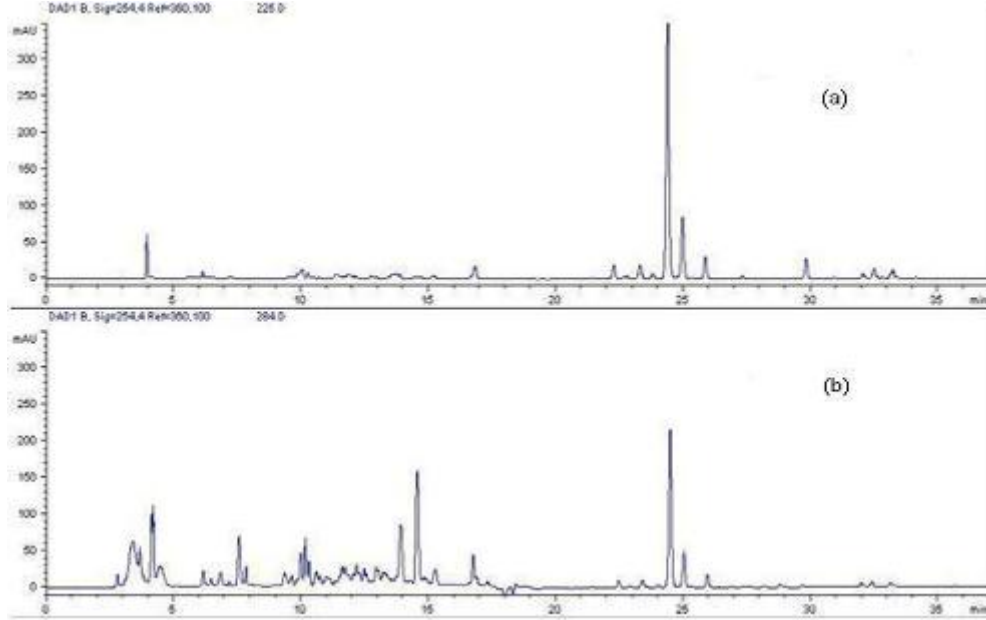
Ekstraksiyonla ilgili denemelerde ilk olarak sebze ve meyve örneklerinin ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları karşılaştırılmış ve en fazla kirliliğin gözleendiği mandalina örneği optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi için yapılan denemelerde asetik asitli su (%0.1'lik), asetik asitli su-asetonitril (1:1, v/v), metanol ve asetonitril ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmış ve en temiz temel hat çizgisi asetonitrilde elde edildiği için, ekstraksiyona asetonitril ile devam edilmiştir (Şekil 1). Asetonitrilin tercih edilmesinin diğer nedenleri de, düşük viskozitesi ve orta düzeydeki polaritesi nedeniyle katı faz ekstraksiyonu ve ters faz sıvı kromatografisi uygulamaları için uygun bir çözücü olması, polar olmayan bir çözücüye gerek kalmadan yalnızca tuz ekleyerek örnekteki suyun kolaylıkla uzaklaştırılabilmesidir (Synder et al. 1997, Anastassiades et al. 2003).



Şekil 1. Farklı ekstraksiyon solventleri; (a) % 0.1'lik asetik asit suda; (b) % 0.1'lik asetik asit su:asetonitril (1:1, v/v); (c) metanol; (d) asetonitril.

Asetonitrilin kullanıldığı geleneksel bazı metotlarda yalnızca NaCl kullanılarak elde edilen geri kazanımların yeterli görülmemesi (Anastassiades et al 2003), nedeniyle çalışmada MgSO₄ ve NaCl tuzları birlikte kullanılmıştır. Ekstraksiyon

işlemi, 4.0 g MgSO₄ kullanılarak ve kullanılmadan yapılmış, MgSO₄ kullanıldığında daha temiz bir kromatogram elde edilmiştir (Şekil 2). Bu da MgSO₄'ın suyu ve suda çözünen kirlilikleri tuttuğunu göstermesi bakımından önemlidir.



Şekil 2. MgSO₄ kullanımı (a) 4.0 g MgSO₄ kullanılmış; (b) MgSO₄ kullanılmamış.

Pestisitlerin iki faz (organik faz ve su fazı) arasındaki dağılımı bu tabakalar arasındaki polarite farkına bağlıdır. Ortama eklenen NaCl, polariteyi etkilediği için belirli miktarda kullanılmalıdır. Fazla miktardaki NaCl, polar pestisitlerin geri kazanımlarını düşürdüğü için (Anastasiades et al. 2003) çalışmada yalnızca 0.5 g ve 1.0 g NaCl kullanımı ile faz ayrımı olup olmadığı incelenmiş ve her iki durumda da faz ayrımı gerçekleştiği için analizlere 0.5 g NaCl ile devam edilmiştir.

Bir sonraki aşama ise bir çeşit süzme işleminin yapıldığı temizleme aşamasıdır. Temizleme aşamasında kullanılacak sorbent ve miktarı belirlenirken de diğer örneklerle göre daha fazla kirliliğin gözlemlendiği mandalina örneği kullanılmıştır. PSA (Anastasiades et al. 2003, Balinova et al. 2007, Shimelis et al. 2007) chromabond diamino (Aksu 2007), NH₂ (Melo et al. 2005), silikajel (Miliadis et al. 1999) ve florosil (Patil et al. 2009) adsorbanları farklı miktarlarda ayrı ayrı ve birbirleri ile karıştırılarak denenmiştir. Bu denemeler sonucunda PSA ile chromabond diamino'nun diğer sorbentlerden daha iyi ve birbirine çok yakın temizleme yaptığı görülmüştür. Buna ek olarak, patlıcan örneğinde bazı aktif maddeler için yaklaşık 1.0 µg/g seviyesinde üç tekrarlı yapılan zenginleştirme işleminin temizleme basamağında PSA ve chromabond diamino kullanımları ile

elde edilen geri kazanımlar karşılaştırılmıştır (Çizelge 2). Bu analizlerden de paralel sonuçlar alınması nedeni ile çalışmalara PSA ile devam edilmiştir.

Çizelge 2. Bazı pestisitlerin 1.0 µg/g zenginleştirme (fortifikasyon) seviyesinde ortalama geri kazanımları (%)

Aktif madde	Ortalama geri kazanım (%)		Pestisit	Ortalama geri kazanım (%)	
	PSA	Chromabond		PSA	Chromabond
Thiamethoxam	85.9	90.0	Oxamyl	89.0	100.8
Acetamiprid	93.3	75.5	Imidacloprid	94.0	93.5
Thiacloprid	93.1	96.3	Pyriproxyfen	90.1	88.8
Diethofencarb	82.8	83.1	Pyrimethanil	86.2	93.2

Temizleme aşamasında kullanılacak PSA'nın miktarını belirlemek için 0.05 g PSA/2 ml, 0.10 g PSA/2 ml, 0.15 g PSA/2 ml ve 0.30 g PSA/2 ml ekstrakt, kullanımları denenmiştir. Elde edilen kromatogramlardan 0.05 g PSA kullanıldığında kirlilik miktarının, diğerlerinden daha fazla olduğu ve 0.150 g ile 0.300 g PSA kullanımları arasında çok büyük bir fark olmadığı görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada fazla miktarda PSA kullanımının kirliliklerin yanında pestisitleri de alıkoyabileceğinin bildirilmesi (Patil et al. 2009) nedeni ile analizlere 0.150 g PSA (yani 0.075 g PSA/ml ekstrakt) ile devam edilmiştir. Temizleme basamağında PSA ile birlikte kullanılan susuz MgSO₄ miktarını belirlemek için yapılan denemeler sonucunda 0.5 g kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Metot geçerli kılma çalışmaları

Cihaz koşulları ve ekstraksiyon metodu ile ilgili çalışmalardan sonra metodun geçerli kılınmasına (metod validasyonu, MV) yönelik çalışmalar, laboratuvar içi MV kriterlerine göre yapılmıştır. Bu amaçla IDL, EMDL, doğruluk, doğruluk ve kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik) parametreleri çalışılmış, gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

MV çalışmalarında, kalibrasyon grafiklerinin üç veya daha fazla konsantrasyonda ikişer tekrarlı veya beş ya da daha fazla konsantrasyonda bir tekrarlı olarak hazırlanması ve bu grafiklerden elde edilen korelasyon katsayılarının (r^2), 0.99'dan büyük olması istenmektedir (Anonymous 2004, Anonymous 2007, Tiryaki 2011). Bu amaçla en az 6 farklı konsantrasyonda iki tekrarlı olarak hem solventte hem de matriksde hazırlanan kalibrasyon grafiklerine ait denklemler ve korelasyon katsayıları, 0.99'dan büyük çıkmıştır (Çizelge 3). Aynı çizelgede her bir pestisit için hesaplanan relatif kalıntısız standart sapma ($S_{\Delta y/\bar{y}}$) değerleri de verilmiştir (Tiryaki et al. 2008, Styarini et al. 2011). Çizelge incelendiğinde relatif kalıntısız standart sapma değerlerinin de doğruluk kriteri için gerekli olan 0.1'den küçük olma şartını sağladığı görülmektedir.

Çizelge 3. Çözücü ve örnek matrislerinden elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait denklemler, korelasyon katsayıları ve relatif kalıntısasal standart sapma ($S_{\Delta y/\bar{y}}$) değerleri

Aktif Madde	Doğrusal limit ($\mu\text{g/ml}$)	Çözücü		Domates		Patlıcan		Mandalina		Şeftali	
		Kalibrasyon Denklemi	$S_{\Delta y/\bar{y}}$	Analitik Fonksiyon	$S_{\Delta y/\bar{y}}$	Analitik Fonksiyon	$S_{\Delta y/\bar{y}}$	Analitik Fonksiyon	$S_{\Delta y/\bar{y}}$	Analitik Fonksiyon	$S_{\Delta y/\bar{y}}$
Acetamidrid	0.0505-2.02	$y=38008x$ $r^2=0.9955$	0.0007	$y=42364x$ $r^2=0.9997$	0.0007	$y=38777x$ $r^2=0.9987$	0.0007	$y=45012x$ $r^2=0.9985$	0.0007	$y=50216x$ $r^2=0.9987$	0.0007
Azoxystrobin	0.0104-2.074	$y=22621x$ $r^2=0.9999$	0.0008	$y=18814x+1.5437$ $r^2=0.9933$	0.0008	$y=24989x+5.9946$ $r^2=0.9943$	0.0008	$y=23014x+1.473$ $r^2=0.9974$	0.0008	$y=25110x$ $r^2=0.9999$	0.0008
Benomyl	0.0534-2.136	$y=19046x$ $r^2=0.9996$	0.0008	$y=19889x$ $r^2=0.9985$	0.0009					$y=18815x$ $r^2=0.9994$	0.0009
Bifenthrin	0.104-2.086	$y=38912x$ $r^2=0.9998$	0.0009	$y=39295x$ $r^2=0.9999$	0.0009					$y=40710x$ $r^2=0.9998$	0.0009
Buprofezin	0.0102-2.043	$y=20138x$ $r^2=0.9999$	0.0008	$y=17846x$ $r^2=0.9992$	0.0008	$y=20070x$ $r^2=0.9993$	0.0008	$y=18567x+0.6337$ $r^2=0.9999$	0.0008	$y=16843x+4.137$ $r^2=0.9924$	0.0008
Carbaryl	0.104-2.086	$y=16367x$ $r^2=0.9998$	0.0009			$y=16736x+1.2443$ $r^2=0.9997$	0.0009				
Cyromazine	0.0507-2.02	$y=13499x$ $r^2=0.9997$	0.0007	$y=12308x$ $r^2=0.9998$	0.0007	$y=14147x$ $r^2=0.9996$	0.0007			$y=17674x$ $r^2=0.9983$	0.0007
Diethofencarb	0.0512-2.05	$y=160317x$ $r^2=0.9988$	0.0001	$y=150139x$ $r^2=0.9998$	0.0001	$y=162430x$ $r^2=0.9991$	0.0001	$y=229877x$ $r^2=0.9988$	0.0001	$y=198164x$ $r^2=0.9999$	0.0001
Dinocap I+II	0.0262-1.047	$y=20594x$ $r^2=0.9983$	0.0005			$y=19776x$ $r^2=0.9988$	0.0003				
Dinocap III+IV	0.0262-1.047	$y=13539x$ $r^2=0.9984$	0.0004			$y=10260x$ $r^2=0.9948$	0.0007				
Flufenoxuron	0.0594-2.376	$y=2978.8x$ $r^2=0.9977$	0.0008	$y=2825x$ $r^2=0.993$	0.0009	$y=3210.5x+0.122$ $r^2=0.9949$	0.0008	$y=5421.7x+0.0126$ $r^2=0.9971$	0.0008	$y=3888.2x+0.1756$ $r^2=0.9961$	0.0008
Folpet	0.0103-2.06	$y=3568.9x$ $r^2=0.9993$	0.0008	$y=2336.7x$ $r^2=0.9996$	0.0008	$y=3366.3x$ $r^2=0.9993$	0.0008	$y=3916.1x+0.5953$ $r^2=0.992$	0.0008	$y=3064.1x$ $r^2=0.9982$	0.0007
İmidacloprid	0.0101-2.011	$y=46709x$ $r^2=0.9999$	0.0007	$y=41631x$ $r^2=0.9989$	0.0007	$y=47978x$ $r^2=0.9996$	0.0007	$y=46643x$ $r^2=0.9995$	0.0008	$y=42528x+0.9648$ $r^2=0.9992$	0.0008
Oxamyl	0.0102-2.043	$y=12250x$ $r^2=0.9997$	0.0008	$y=16499x$ $r^2=0.9988$	0.0008	$y=13868x$ $r^2=0.9998$	0.0008			$y=15755x+0.0857$ $r^2=0.9984$	0.0008

Çizelge 3. Devamı

Aktif Madde	Doğrusal limit (µg/ml)	Çözücü		Domates		Patlıcan		Mandalina		Şeftali	
		Kalibrasyon Denklemi	S _{Ay/ş}	Analitik Fonksiyon	S _{Ay/ş}	Analitik Fonksiyon	S _{Ay/ş}	Analitik Fonksiyon	S _{Ay/ş}	Analitik Fonksiyon	S _{Ay/ş}
Propargite	0.1-2.005	y=1686x r ² =0.9995	0.0009	y=1928.5x r ² =0.9978	0.0009					y=1614x r ² =0.9994	0.0009
Pyrimethanil	0.053-2.121	y=61678x r ² =0.9985	0.0008	y=60495x r ² =0.9998	0.0007	y=54524x+3.5678 r ² =0.9934	0.0007	y=53990x r ² =0.9985	0.0007	y=68853x+2.3339 r ² =0.9999	0.0007
Pyriproxyfen	0.0102-2.043	y=6609.4x r ² =0.9997	0.0008	y=9382.4x r ² =0.9991	0.0007	y=11578x r ² =0.9994	0.0008	y=11257x r ² =0.9941	0.0008	y=9280.7x r ² =0.9988	0.0008
Tetradifon	0. 1-2.09	y=33461x r ² =0.9997	0.0008	y=33220x r ² =0.9997	0.0008					y=34250x r ² =0.9998	0.0008
Thiamethoxam	0.0519-2.078	y=27155x r ² =0.9991	0.0007	y=32945x+3.3162 r ² =0.9963	0.0007	y=31777x+2.5165 r ² =0.9981	0.0007	y=36040x+2.7373 r ² =0.9978	0.0007	y=34751x r ² =0.9995	0.0007
Thiacloprid	0.0524-2.096	y=28894x r ² =0.9994	0.0007	y=25272x+0.5433 r ² =0.9987	0.0007	y=31762x r ² =0.9994	0.0007	y=33476x r ² =0.9997	0.0007	y=33031x r ² =0.9998	0.0007

Metodun geçerli olabilmesi için en önemli koşullardan birisi LOD ve LOQ değerlerinin çalışılan her bir aktif madde için hesaplanmasıdır. AB kılavuzlarına göre LOQ, MRL'nin altında veya MRL/2 olması gerekmektedir (Anonymous 2004, Anonymous 2007, Aksu 2007). Çalışılan aktif maddeler için sinyal/gürültü değerleri kullanılarak (Simplício et al. 1999, Aksu 2007, Liu et al. 2009, Patil et al. 2009) hesaplanan LOD ve LOQ değerleri, cihaza ait değerleri vermektedir. Metoda ait tespit limiti ise örnek homojenizasyonundan analize kadar bir çok ara basamak içermektedir. Bu nedenle belirlenen analiz koşullarında doğru/güvenilir bir şekilde dedekte edilebilen saf pestisit standartının en düşük konsantrasyonu olarak da tanımlanan IDL değerleri ile yine bir pestisit, belirli bir örnek matrisindeki geri alım değerleri kullanılarak saptanabilen yaklaşık en düşük konsantrasyonu olan EMDL değerleri ayrı ayrı hesaplanarak (Singh et al. 2007, Styarini et al. 2011, Temur et al. 2012) Çizelge 4'te verilmiştir. Çalışmada folpet 1000 µg/ml, benomyl, bifenthrin, propargite, tetradifon 200 µg/ml, ve diğer aktif maddeler 100 µg/ml konsantrasyonda yedi tekrarlı 10 µl hacimde HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Çizelge 4. Aktif maddelerin alıkonma zamanları, saf standart ve örnek matrislerinde hesaplanan IDL ve EMDL değerleri

Aktif madde	Alıkonma zamanı (t _R)	Saf standart	Domates	Patlıcan	Mandalina	Şeftali
		IDL (µg/ml)	EMDL (µg/g)	EMDL (µg/g)	EMDL (µg/g)	EMDL (µg/g)
Acetamiprid	5.54	0.0054	0.4925	0.5472	0.6020	0.6450
Azoxystrobin	16.25	0.0067		0.6344	0.6000	0.6225
Benomyl	9.15	0.0137	1.5262			1.5434
Bifenthrin	36.28	0.0042	0.4735			0.4682
Buprofezin	31.95	0.0085	0.9114		1.0212	
Carbaryl	10.45	0.0064		0.739		
Cyromazine	7.93	0.0186	1.8218	1.9157		
Diethofencarb	14.88	0.0020	0.1857	0.1575		0.1988
Dinocap I+II	31.95	0.0155		1.5230		
Dinocap III+IV	32.76	0.0206		2.0142		
Flufenoxuron	28.37	0.0663	6.6281	4.9464		6.6951
Folpet	18.14	0.0248	2.5077			2.6411
Imidacloprid	5.23	0.0046	0.4936	0.4989	0.5272	0.4593
Oxamyl	3.78	0.0085	0.9417	0.9742		0.8229
Propargite	29.62	0.0357	3.5682			3.8785
Pyrimethanil	16.60	0.0044	0.4357			0.6028
Pyriproxyfen	28.11	0.0207	2.1541	2.2725	2.0475	2.5530
Tetradifon	26.74	0.0106	1.1476			1.2721
Thiamethoxam	4.05	0.0126	1.1908	1.5026	1.0607	1.1371
Thicloprid	6.75	0.0120	1.1823	1.2496	1.0887	1.0182

*Benomyl, carbaryl, imidacloprid, propargite, pyrimethanil ve pyriproxyfen 272.4 nm, diğer aktif maddeler ise 254.4 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

Metodun doğruluğu farklı seviyelerde yapılan zenginleştirmelerden elde edilen geri kazanım çalışmaları ile belirlenmektedir. AB kılavuzlarına göre, pestisit kalıntı analizlerinde kullanılan çoklu kalıntı analiz metodlarının geçerli olabilmesi için,

geri kazanım yüzdesinin 70-120 arasında, bağıl standart sapmanın (% RSD) ise %20'den küçük olması gerekmektedir. Ancak kesinliğin iyi olması koşuluyla bazı çoklu pestisit kalıntı analiz metotlarında %70'in altındaki geri kazanımlar da kabul edilmektedir (Anonymous 2011). Geri alım çalışmalarında, örneklere aktif maddelerin Türk Gıda Kodeksi (TGK)'nde yer alan MRL'leri göz önünde bulundurularak farklı seviyelerde beş tekrarlı olarak zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Zenginleştirme yapılan meyve ve sebzelerden elde edilen ortalama geri alımlar Çizelge 5-8'de verilmiştir.

Çizelge 5. Domates örneğinden elde edilen % geri alımlar

Aktif madde	Zenginleştirme seviyeleri					
	0.1 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Thiamethoxam	105.3	22.5	117.1	3.4	110.7	4.1
Acetamiprid	109.3	5.0	109.1	0.7	109.6	3.5
Thicloprid	92.2	2.8	109.1	1.8	97.0	2.8
Cyromazine	102.2	2.9	99.1	2.4	62.3	5.4
Diethofencarb	106.1	1.4	114.0	4.7	119.6	3.3
Pyrimethanil	100.6	3.8	105.2	1.9	110.9	4.0
Flufenoxuron			99.8	7.0	124.8	9.5
	0.2 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Benomyl			89.5	10.6	91.2	4.5
Tetradifon	91.6	4.8	86.2	2.6	92.8	3.2
Propargite	99.8	20.3	85.8	12.7	89.6	4.1
Bifenthrin	88.1	3.8	91.2	2.8	98.8	2.5
	0.05 µg/g		0.2 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Oxamyl	89.8	6.9	102.6	4.5	105.2	2.5
Imidacloprid	93.3	2.3	99.7	2.5	101.5	1.9
Folpet					98.8	4.9
Pyriproxyfen			95.6	4.0	86.3	4.2
Buprofezin			92.4	7.9	99.5	4.9

Çizelge 6. Mandalina örneğinden elde edilen % geri alımlar

Aktif madde	Zenginleştirme seviyeleri					
	0.1 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Thiamethoxam	118.9	11.0	114.5	6.9	101.4	8.0
Acetamiprid	89.4	2.2	102.6	2.1	101.4	1.4
Thicloprid	101.3	2.8	100.1	3.2	98.7	0.7
Pyrimethanil			94.8	5.9	91.9	3.2
	0.05 µg/g		0.2 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Imidacloprid	87.4	9.3	96.4	3.5	97.7	1.7
Azoxystrobin					111.0	7.4
Pyriproxyfen			100.60	2.4	101.0	5.9
Buprofezin			82.63	12.3	87.0	8.8

Çizelge 7. Patlıcan örneğinden elde edilen % geri alımlar

Aktif madde	Zenginleştirme seviyeleri					
	0.1 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Thiamethoxam	83.7	22.0	99.2	5.2	97.4	8.0
Acetamiprid	98.8	8.5	99.3	2.0	101.4	5.4
Thicloprid	87.4	2.6	91.9	1.7	89.4	6.1
Cyromazine	96.9	3.4	65.0	3.1	64.3	5.7
Diethofencarb	124.4	2.3	95.0	2.0	102.2	4.1
Pyrimethanil			111.1	3.6	99.8	4.0
Flufenoxuron			133.9	3.5	110.0	5.6
Dinocap I+II			113.9	6.1	106.5	5.5
Dinocap III+IV			101.3	9.9	86.0	7.0
Carbaryl	67.4	13.7	85.8	6.38		
	0.05 µg/g		0.2 µg/g		1.0µg/g	
	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD	%Geri Alım	RSD
Oxamyl	86.9	8.0	101.2	3.9	99.5	2.1
Imidacloprid	92.1	4.5	105.0	4.6	103.9	1.0
Azoxystrobin					104.8	3.8
Pyriproxyfen	90.1	21.1	97.2	6.2	93.6	1.7

Çizelge 8. Şeftali örneğinden elde edilen % geri alımlar

Aktif madde	Zenginleştirme seviyeleri					
	0.1 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD
Thiamethoxam	110.7	6.7	105.0	10.7	102.6	1.8
Acetamiprid	83.9	7.2	88.5	8.3	98.7	3.4
Thicloprid	107.7	6.2	94.5	1.0	95.8	1.8
Diethofencarb	98.1	3.9	104.8	7.4	96.1	7.5
Pyrimethanil	72.2	1.9	94.3	6.4	91.2	6.5
Flufenoxuron			98.7	5.3	94.4	2.5
Benomyl	74.5	6.1	88.4	6.1	92.2	0.5
	0.2 µg/g		0.5 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD
Tetradifon	82.4	2.6	87.4	2.0	92.0	2.4
Propargite	91.9	20.7	83.6	3.2	104.9	4.4
Bifenthrin	89.7	3.0	91.8	2.3	98.5	2.3
	0.05 µg/g		0.2 µg/g		1.0 µg/g	
	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD	%Geri Alm	RSD
Oxamyl			103.2	3.5	103.1	2.3
Imidacloprid	101.4	2.0	111.7	7.2	104.0	1.5
Azoxystrobin			106.5	7.0	102.8	2.2
Folpet					93.5	5.4
Pyriproxyfen			80.10	9.2	105.9	3.4

Ülkemizde ruhsatlı olduğu üründe, kirlilik nedeniyle geri kazanımları hesaplanamayan pestisit aktif maddeleri azoxystrobin (domates), dinocap (şeftali) ve flufenoxuron (mandalina)'dur. Çizelgelerden de görüldüğü gibi elde edilen sonuçlar birkaç istisna dışında istenilen aralıkta bulunmuştur.

Okihashi et al. (2005), sebze ve meyvelerdeki 180 tane pestisit kalıntısı için bir metot geliştirmişlerdir. Ekstraksiyonda asetonitril, hemen sonrasında MgSO₄ ve NaCl kullanmışlardır. Sediment ve suyun uzaklaştırılması aynı anda santrifüj ile yapılmıştır. Örneklerin temizlenmesinde grafitize karbon siyahı (GCB) ve PSA'dan oluşan ikili katı faz ekstraksiyon kartuşu kullanmışlar; buradan elde ettikleri eluatu daha fazla temizleme yapmadan gaz kromatografisi alev fotometrik dedektör (Flame Photometric Detector, FPD) ve GC/MS'de analiz etmişlerdir. Geri kazanım çalışmalarını 0.05 ve 0.1 µg/g konsantrasyon seviyesinde dokuz örnek matriksine (domates, mandalina vb.) yapmışlardır. Çalışılan pestisitler için tespit limitini 0.01-0.05 µg/g arasında bulmuşlar ve 180 pestisit çoğunda %70-110 arasında geri kazanım ile %25'in altında RSD elde etmişlerdir. Bir diğer araştırmada, üç tane neonikotinoid insektisit (acetamiprid, imidacloprid ve nitenpyram) analizine imkan sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Analizde nitenpyram ve imidaclopridin uçucu olmamasından ve acetamipridin polar olması nedeniyle GC'de yüksek matriks etkisi göstermesinden dolayı HPLC/DAD ve C-18 kolonu kullanılmıştır. Sebze ve meyveler asetonitril ile ekstraksiyon yapılarak PSA içeren kartuştan geçirilmiştir. Bağlı standart sapma tüm geri kazanım çalışmaları boyunca %10'dan küçük çıkmıştır. Acetamiprid ve imidacloprid için 0.2 ve 2.0 mg/kg zenginleştirme

seviyelerinde hıyar, patates, domates, patlıcan, Japon turpu ve üzüm örneklerinde yaklaşık % 90 geri kazanım elde edilmiştir (Obana et al. 2002).

Kesinlik, belirli koşullarda elde edilen test sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Analizler arasındaki korelasyonu göstermesi bakımından önemlidir (Synder et al. 1997, Thompson et al. 2002). Kesinlik kriteri belirlenirken, tekrarlanabilirlik için her bir aktif madde, yaklaşık 1.0 µg/ml konsantrasyonda (çözücü ortamında) aynı gün 5 tekrarlı ve tekrar üretilebilirlik için 5 farklı günde, günlük bir kez olmak üzere toplamda 5 tekrarlı enjeksiyon yapılmış ve alıkonma zamanları ile pik alanları kullanılarak % RSD değerleri hesaplanmıştır (Arrebola et al. 2003, Aksu 2007). Elde edilen tüm % RSD değerleri %10'nun altında bulunmuş (Çizelge 9) ve metod validasyonu için gerekli olan (%RSD < 20) şartı sağladığı görülmüştür.

Çizelge 9. Kesinlik için tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrar üretilebilirlik % RSD değerleri

Aktif madde	Gün içi tekrarlanabilirlik		Günler arası tekrar üretilebilirlik	
	Pik alanı RSD %	Alıkonma zamanı RSD %	Pik alanı RSD %	Alıkonma zamanı RSD %
Acetamidrid	0.37	0.02	0.80	0.14
Azoxystrobin	1.00	0.07	1.03	0.27
Benomyl	0.90	0.21	2.91	4.91
Bifenthrin	0.21	0.01	1.66	0.16
Buprofezin	1.19	2.07	2.07	1.54
Carbaryl	1.21	0.09	1.50	0.98
Cyromazine	1.63	0.21	2.14	0.79
Diethofencarb	0.84	0.02	0.89	0.30
Dinocap I+II	1.59	0.03	4.15	0.25
DinocapIII+IV	2.63	0.03	2.26	0.24
Flufenoxuron	6.09	0.02	1.76	0.26
Folpet	7.15	0.08	3.22	0.30
Imidacloprid	1.17	0.09	1.09	0.12
Oxamyl	1.12	0.09	1.74	0.17
Propargite	3.28	0.03	2.29	0.19
Pyrimethanil	0.86	0.01	6.91	0.17
Pyriproxyfen	1.22	0.10	1.55	0.27
Tetradifon	0.52	0.02	1.97	0.23
Thiacloprid	0.16	0.19	0.76	0.09
Thiamethoxam	0.29	0.03	1.11	0.26

Tarımsal ürünlerde ve çevresel örneklerde kalıntı analizlerinin yapılması hem kendi insanımızın sağlığı hem de yabancı ülkelerle olan ticaretimiz açısından çok önemlidir. Bu nedenle kalıntı izleme çalışmalarının etkili ve hızlı bir şekilde yürütülebilmesi için, mümkün olduğunca çok pestisit içeren, çoklu kalıntı analiz metodlarına ihtiyaç vardır. Bu çalışma ile ülkemizde yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin kalıntı analizlerinin yapılmasına imkan sağlayan hızlı, basit, güvenilir ve ekonomik çoklu kalıntı analiz metodu geliştirilmiştir.

Geliştirilen çoklu kalıntı analiz metodu, geleneksel çoklu kalıntı analiz metodları ile karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptir. Metotta sadece 10 g homojenize

örnek ile yaklaşık 50 ml çözücü [10 ml ekstraksiyon çözücüsü (asetonitril), yaklaşık 37 ml hareketli faz (asetonitril + %0.14'lük asetik asitli su)] kullanılmıştır. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan susuz MgSO₄ (4.0 g) ve NaCl (0.5 g) ile temizleme işleminde kullanılan susuz MgSO₄ (0.5 g) ve PSA (0.150 g) miktarları da diğer metotlara göre oldukça düşüktür. Temizlemede kullanılan PSA'nın tek kullanımlık kartuşlar yerine santrifüj işleminde kullanılan tüplere tartılması ve atık sorununun en aza indirilmesi metodun avantajlarından biridir.

Geliştirilen metot 19 pestisit için kısa sürede kalıntı analizine imkan sağlamaktadır. Uygulaması kolay, atığı az ve ekonomik olması nedeni ile kalıntı izleme çalışmalarında kolaylıkla kullanılabilirliği düşünülmektedir. Çalışmanın devamında HPLC ile analiz edilebilen diğer aktif maddelere de analiz metodunun uygulanması ve çalışılan meyve ve sebzeler dışındaki tarımsal ürünlerde de metodun geçerliliğinin araştırılması, böylelikle daha geniş bir örnek grubunun bu metod ile analizinin yapılarak yüksek fayda sağlanması düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu proje, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü koordinatörlüğünde yürütülen "Tarımsal ürünlerde Ülkesel Maksimum Kalıntı Limitlerinin Belirlenmesi" isimli ulusal projenin alt projesi olarak çalışılmış ve Devlet Planlama Teşkilatı (DPT) tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya desteklerinden dolayı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne, Ankara Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsüne ve DPT'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Aksu P. 2007. Meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarının tayininde gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) ile çoklu kalıntı analiz yönteminin geliştirilmesi. Doktora Tezi (yayınlanmamış), E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 389 s
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher N. and 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 (2), 412-431.
- Anonymous 2004. Guidance document on residue analytical methods, SANCO/825/00 rev. 7 17/03/2004.
- Anonymous 2007. European Commission DG SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, N° SANCO/2007/3131/31 October 2007.
- Anonymous 2011. European Commission DG SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, N° SANCO/2011/12495/01 January 2012.

- Arrebola F. J., Martínez Vidal J. L., Mateu-Sánchez M. and Álvarez Castellón F. J. 2003. Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 484, 167-180.
- Balinova A., Mladenova R. and Shtereva D. 2007. Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography- electron capture detection of pesticide residues in crops. *J. of Chromatography A*, 1150, 136-144.
- Caboni P., Sarais G., Angioni A., Garau V. L. and Cabras P. 2005. Fast and versatile multiresidue method for the analysis of botanical insecticides on fruits and vegetables by HPLC/DAD/MS. *J Agric Food Chem.*, 53 (22), 8644-9.
- Columé A., Cárdenas S., Gallego M. and Valcárcel M. 2000. Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 882, 193-203.
- Diez C., Traag W. A., Zommer P., Marinero P. and Atienza J. 2006. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A*, 1131, 11-23.
- Erdik E., Obalı M., Yüksekışık N., Öktemer A., Pekel T. ve İhsanoğlu E. 2000. Denel organik kimya. A.Ü basımevi, Ankara, 805 s.
- Garrido Frenich A., Martínez Vidal J. L., López López T., Cortés Aguado S. and Martínez Salvador I. 2004. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 1048, 199-206.
- González-Rodríguez R. M., Otero Rial- R., Cancho-Grande B. and Simal-Gándara J. 2008. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. *Food Chemistry*, 107, 1342-1347.
- Liu Z. M., Zang X. H., Liu W. H., Wang C. and Wang Z. 2009. Novel method for the determination of five carbamate pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Chinese Chemical Letters*, 20 (2) 213-216.
- Masqué N., Marcé R. M. and Borrull F. 1998. Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 793, 257-263.
- Melo L.F.C., Collins C.H. and Jardim I.C.S.F. 2005. High-performance Liquid Chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory –made NH₂ and C₁₈ solid-phase extraction materials. *Journal of Chromatography A*, 1073, 75-81.
- Miliadis G. E., Tsiropoulos N. G. and Aplada Sarlis P.G. 1999. High-Performance Liquid Chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *J.Chromatogr A*, 835, 113-20.

- Obana H., Okihashi M., Akutsu K., Kitagawa Y. and Hori S. 2002. Determination of acetamiprid, imidacloprid and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem*, 50, (16) 4464-4467.
- Okihashi M., Kitagawa Y., Akutsu K., Obana H. and Tanaka Y. 2005. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. *J. Pestic. Sci*, 30 (4) 368-377.
- Otero R.R., Grande C. and Gándara J.S. 2003. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 992, 121-131.
- Patil S.H., Banerjee K., Dasgupta S., Oulkar D.P., Patil S.B., Jadhav M.R., Savant R. H., Adsule P.G. and Deshmukh M.B. 2009. Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2307-2319.
- Pizzutti I.R., Kok de A., Zenella R., Adaime M.B., Hiemstra M., Wickert C. and Prestes O.D. 2007. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain without clean up by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 1142, 123-36.
- Simplício A.L. and Boas L.V. 1999. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A*, 883, 35-42.
- Singh S. B., Foster G. D. and Khan S. U., 2007. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1148: 152–157.
- Shimelis O., Yang Y., Stenerson K., Kaneko T. and Ye M. 2007. Evaluation of a Solid-Phase Extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *Journal of Chromatography A*, 1165, 18-25.
- Snyder L.R., Kirkland J.J. and Glajch J.L. 1997. *Practical HPLC method development*. John Willey&Sons, USA, 765 p.
- Styarini D., Zuas O. and Hamim N. 2011. Validation and uncertainty estimation of analytical method for determination of benzene in beverages. *Eurasion J Anal Chem* 6(3), 159-172.
- Temur C., Tiryaki O., Uzun O. and 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. and Wood R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem*, 74 (5) 835-855.

- Tiryaki O. 2003. Nükleer ve Kromatografik tekniklerle pestisit kalıntılarının analiz edilmesi. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 15-17 Ekim 2003, Kayseri, Bildiri Özetleri 15 s.
- Tiryaki O., Baysoy D., Seçer E. and Aydın G. 2008. Testing the stability of during sample perocessing for chlorprifos and malathion residue analysis in cucumber, including matrix effects. Bull Environ Contam Toxicol, 80, 38-43.
- Tiryaki O. 2011. Pestisit kalıntı analizlerinde kalite kontrol (QC) ve kalite güvencesi (QA). Nobel yayın dağıtım, Ankara, 91-107.
- Topuz S., Özhan G. and Alpertunga B. 2005. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. Food Control, 16, 87-92.
- Vázquez P.P., Galera M.M., Frenich A.G. and Martínez Vidal J.L. 2000. Comparision of calibration methods with and without feature selection for the analysis of HPLC data. Analytical Sciences, 16, 49-55.
- Yavuz O. ve Aksoy A. 2006. Örnek hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyon metodu. F.Ü. Sağlık Bil. Der, 20, 259-269.