

ZEYTİN ve ZEYTİNYAĞI ÖRNEKLERİNDE PESTİSİT KALINTILARININ BELİRLENMESİ İÇİN BİR METOT ÇALIŞMASI

Sevilay Kırış¹, Y. Sedat Velioğlu^{2*}

¹Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü, Pestisit Analizleri Birimi, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 08.03.2013

Düzeltilerek Geliş Tarihi/ Received in revised form: 15.04.2013

Kabul tarihi / Accepted: 17.04.2013

Özet

Zeytin yetiştiriciliğinde özellikle böcek zararından kaynaklanan hasat ve üretim kayıplarını önlemek için birçok pestisit kullanılmaktadır. Kullanılan bu pestisitlerin kalıntıları ise zeytinde dolayısıyla da zeytinyağında bulunabilmektedir. Bu çalışmada ülkemizde zeytin yetiştiriciliğinde ruhsatlı olan bazı pestisitlerin, zeytin ve zeytinyağı örneklerinde farklı metotlar kullanılarak kalıntı analizleri yapıp uygulanan metotların bazı metot performans kriterleri (doğrusallık, tespit limiti, doğruluk, tekrarlanabilirlik, seçicilik) belirlenmiştir. Bazı metot performans kriterlerinin belirlenmesi için zeytin ve zeytinyağı örneklerinde biri raporlama limiti diğeri de daha yüksek düzeyde olmak üzere iki farklı konsantrasyonda (20 ve 50 ng/g) 5 tekrarlı geri alma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçların SANCO/12495/2011 no'lu dokümanının kriterlerini sağladıkları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Zeytin, zeytinyağı, pestisit, metot validasyonu, LC-MS/MS, GC-ECD

A METHOD STUDY FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES FROM OLIVE AND OLIVE OIL

Abstract

A large number of pesticides are used in olive production to prevent harvest and production losses especially due to insect damages. The residues of these pesticides can be found in olives and therefore in olive oil. In this study, residue analysis of some registered pesticides in olive production were performed in olive and olive oil samples by applying different methods. Also, some method performance criterias (linearity, limit of quantification, trueness, repeatability, selectivity) of these methods were determined. For the determination of some method performance criterias, olive and olive oil samples were spiked at two concentrations (20 ve 50 ng/g), at the reporting limit and a higher level, and 5 replicates recovery studies were made. The results demonstrated that the methods applied achieved the criteria of SANCO/12495/2011document.

Keywords: Olive, olive oil, pesticide, method validation, LC-MS/MS, GC-ECD

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ velioglu@ankara.edu.tr,

☎ (+90) 312 596 1166,

(+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Bitki ve hayvanlara zarar veren canlı organizmalara karşı kullanılan kimyasal ilaçların tümüne pestisit adı verilmektedir (1). Tarımsal üretimdeki sorunlarla mücadelede yüksek etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir ve dünya genelinde 1000'in üzerinde aktif madde bu zararlılara karşı kullanılmaktadır (2). Pestisitlerin tarımsal uygulamalarda kullanılması dünya genelinde gıda üretim miktarını artırmış (3, 4) ve elde edilen ürünün kalitesini geliştirmiştir (5). Pestisitler tarımsal üretimdeki bu yararlarına karşın yüksek toksisite gösterirler ve çevresel koşullara karşı da oldukça dirençlidirler (6, 7). Söz konusu bu kimyasal maddelerin ürünler üzerindeki kalıntılarına ise pestisit kalıntısı ismi verilmektedir (8). 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/kg) olarak ifade edilmektedir (9). Ülkemizde pestisit kalıntı limitleri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenmektedir. Bu konudaki uygulamalar 91/414/EEC sayılı Avrupa Birliği Direktifi ve 396/2005/EC sayılı Avrupa Birliği Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü'nün ilgili hükümleri dikkate alınarak çıkarılan Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre yapılmaktadır ve AB uyum çalışmaları gereğince sürekli güncellenmektedir (10).

Yüksek oranda pestisit kalıntısı içeren gıdalar ile beslenen insanlar ve çevredeki diğer canlılarda akut ve kronik zehirlenmeler görülebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, gıdalardaki pestisit kalıntılarının vücuda alımı ile ortaya çıkan kronik etkinin uzun vadede çeşitli akciğer hastalıkları, kanser, beyinde hasar, karaciğer ve böbreklerde nefrozlara sebep olduğu belirtilmiştir. Teratojen, mutajen ve alerjen etkisi olan pestisitler de mevcuttur (11-13). Pestisit kaynaklı akut zehirlenme etkilerinin temel belirtileri arasında mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, zihin karışıklığı, diyare, zayıflık ve iştahsızlık en belirgin belirtilerdir (8).

Zeytinyağı dünya üzerinde ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağına özgü zeytin ağacının (*Olea europaea*) meyvesinden çoğunlukla daha sonra herhangi bir işlem yapılmadan, yağın kalitesini değiştirmeyen ısıtma işlem koşullarında mekanik

ve/veya fiziksel yöntemlerle üretilen doğal bir yağdır (14, 15). Akdeniz havzasında yer alan yedi ana üretici ülke; İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus, Türkiye, Suriye ve Fas dünya zeytinyağı üretiminin %90'dan fazlasını sağlamaktadır. Bu ülkelerden İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus ve Türkiye uluslararası zeytinyağı ticaretinde etkili rollere sahiptirler (15). Zeytin meyvesinden elde edilen sızma zeytinyağı diğer yağlarla karşılaştırıldığı zaman üreticilerine daha fazla gelir getirmektedir. Son yıllarda sağlık üzerine olan yararlı etkilerinin bilinirliğinin artmasından dolayı da dünya genelinde zeytinyağına olan talep artmıştır (16, 17). Sağlık üzerine olan olumlu etkisi de diğer yemeklik bitkisel yağlara göre taşıdığı yüksek düzeyde tekli doymamış yağ asitlerini ve antioksidan özelliklere sahip vitamin ve fenolik bileşenleri içermesinden kaynaklanmaktadır (18). Bu yararlı etkilere örnek hiperkolesterolemik ve damar sertliğinin önlenmesi (18), kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, göğüs ve kolon kanserlerinin görülme sıklığının azalması (19) verilebilir.

Zeytinyağının kalitesi hammaddenin kalitesi ile ilgilidir. Hammaddede yüzey lekeleri, yara izleri, delikler veya haşerelerin neden olduğu diğer zararlar olmamalıdır (19). Bu nedenle pestisit uygulaması ile parazitlerin ve hastalıkların kontrolü zeytin veriminin ve büyüklüğünün artmasında, dolayısıyla da randımanın artmasında önemlidir. Özellikle böcek zararından kaynaklanan hasat ve üretim kayıplarını önlemek için birçok tarımsal kimyasallar zeytine uygulanmaktadır. Zeytin yetiştiriciliğinde en yaygın uygulanan kimyasallar insektisitler, herbisitler ve fungusitlerdir (14). Kullanılan bu pestisitlerin kalıntıları zeytinlerde ve dolayısıyla da zeytinyağlarında bulunabilmektedir. Bundan dolayı zeytin ve zeytinyağlarında bulunabilecek MRL değerleri her bir ülkenin kendi mevzuatında ve Codex Alimentarius tarafından da uluslararası düzeyde oluşturulmuştur. Avrupa Birliğinde ise ayrı ayrı oluşturulmuş olan ulusal MRL'ler Avrupa Birliği içinde kullanılabilmesi için harmonize edilmektedir. Şu ana kadar 94 pestisit kalıntısının zeytinyağına işlenecek zeytinde ve 15 pestisitinin sofralık zeytinde MRL değerleri belirlenmiştir (19). Çizelge 1'de ülkemizde zeytin yetiştiriciliğinde kullanılan bazı pestisitlerin (20) Türk Gıda Kodeksindeki MRL (Maksimum Kalıntı Limiti) değerleri verilmiştir.

Çizelge 1. Zeytin yetiştiriciliğinde ruhsatlı bazı pestisitlerin MRL değerleri
Table 1. MRL values of some registered pesticides in olive

Pestisit Adı Pesticide Name	Pestisit Sınıfı Pesticide Class	Zararlı Sınıfı Mode of Action	MRL (mg/kg) MRL (mg/kg)
Diflubenzuron	Benzoylurea	İnsektisit	0.05
Triflumuron	Benzoylurea	İnsektisit	0.05
Dimethoate	Organofosforlu	Akarasit, insektisit	2.0
İmidacloprid	Neonikotinoid	İnsektisit	0.05
Lambda-cyhalothrin	Piretroid	İnsektisit	1.0
Beta-cyfluthrin	Piretroid	İnsektisit	0.02
Alpha-cypermethrin	Piretroid	İnsektisit	0.05
Chlorpyrifos	Organofosforlu	İnsektisit	0.05
Deltamethrin	Piretroid	İnsektisit	1.0

Bu çalışmanın amacı Çizelge 1'de MRL değerleri verilmiş olan pestisitlerin çoklu kalıntı metotları ile zeytin ve zeytinyağı örneklerinden ekstrakte edilerek analiz edilmesi ve uygulanan metotların bazı metot performans kriterlerinin belirlenmesidir. Bu amaçla çalışmada Likit Kromatografi Sıralı Triple Quadrupole Kütle Spektrometre (LC-MS/MS), Gaz Kromatografisi Elektron Yakalama Dedektörü (GC-ECD) ve Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometre (GC-MS) cihazları kullanılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kimyasallar: Çalışmada kullanılan standard maddeler, saflık düzeyleri ve üretici firmalar sırasıyla şu şekildedir: Diflubenzuron (%98.0) ChemService (ABD), Triflumuron (%99.0) Sigma-Aldrich (Almanya), İmidacloprid (%99.0), Lambda-cyhalothrin (%98.0), Alpha-cypermethrin (%97.5), Beta-cyfluthrin (%99.0), Deltamethrin (%99.5), Dimethoate (%98.5) ve Chlorpyrifos (%98.5) Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Almanya). Çalışmada ayrıca en yüksek saflıktaki asetonitril, susuz magnezyum sülfat ($MgSO_4$), sodyum klorür (NaCl), primer sekonder amin (PSA), C18, grafitize edilmiş karbon siyahı (GCB) kullanılmıştır. Her bir pestisit stok standart çözeltileri 1000 $\mu g/mL$ konsantrasyonda, karışım çözeltileri ise 20 $\mu g/mL$ konsantrasyonda olacak şekilde asetonitrilde hazırlanmıştır.

Örnekler: Çalışmada kullanılan siyah zeytin ve naturel sızma zeytinyağı örnekleri marketten satın alınmış olup söz konusu etken maddeleri içermedikleri belirlendikten sonra çalışmada kullanılmışlardır.

Zeytin örneklerinden pestisitlerin ekstraksiyon metodu: Pestisit ekstraksiyonunda Cunha et al. (16) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Zeytin örnekleri blendorda çekirdekleri ile beraber iyice parçalanıp homojenize edildikten sonra 15 g örnek 50 ml'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır (geri alma çalışmalarında hesaplanan miktardaki pestisit karışımı bu aşamada örneğe eklenmiştir). Karışıma 15 mL asetonitril eklenip tüpün ağzı kapatılıp iyice karıştırıldıktan sonra 6 g susuz $MgSO_4$ ve 1,5 g NaCl eklenip tüp tekrar 1 dakika el ile kuvvetlice karıştırılmış ve 3000 d/dak hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 2 mL alınıp içinde 300 mg susuz magnezyum sülfat, 100 mg PSA, 100 mg C18, 15 mg GCB olan 15 mL'lik santrifüj tüpüne eklendikten sonra ekstrakt 20 saniye karıştırılıp 3000 d/dak hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz 0,45 μm 'lik şırınga ucu filtrelerden süzüldükten sonra GC analizlerinde doğrudan, LC analizlerinde ise mobil faz ile 1/5 oranında seyreltildikten sonra analiz edilmiştir.

Zeytinyağı örneklerinden pestisitlerin ekstraksiyon metodu: Tekli Kalıntı Metotları için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı olan CVUA-Stuttgart'ın internet sitesinde yayımlanmış olduğu "Bitkisel yağlar için QuEChERS metodun değiştirilmesi (su içermeyen yağlı matrisler)" başlıklı metot (21) ile zeytinyağı örneklerinin ekstraksiyonları yapılmıştır. Zeytinyağı örneğinden 3 g 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır (geri alma çalışmalarında hesaplanan miktardaki pestisit karışımı bu aşamada örneğe eklenmiştir). Üzerine 10 mL asetonitril eklendikten sonra tüpün ağzı kapatılıp 1 dakika el ile kuvvetlice çalkalanmıştır. 3000 d/dak hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazdan alınan 4 mL ekstrakt, içinde 100 mg PSA ve 100 mg C18 olan 15 mL'lik santrifüj

tüpüne eklenip 20 saniye karıştırılıp 3000 d/dak hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 1 mL ekstrakt alınıp üzerine 10 µL %5 formik asit içeren asetonitril çözeltisi eklenmiştir. Asitlendirilmiş ekstrakt GC analizlerinde doğrudan, LC analizlerinde ise mobil faz ile 1/5 oranında seyreltildikten sonra analiz edilmiştir.

GC-ECD koşulları: Analizde Agilent marka (7890A serisi) GC-ECD cihazı kullanılmıştır. Analizlerde HP-5MS (30 m uzunluğunda, 0,25 mm çapında, film kalınlığı 0,25µm) kapiler kolonu kullanılmıştır. Analiz parametreleri şu şekildedir: Enjeksiyon modu: Splitless [tutma süresi (hold time)]: 0.5 dak; Enjeksiyon hacmi: 1 µL; Enjeksiyon sıcaklığı: 250°C; Dedektör sıcaklığı: 300°C; Taşıyıcı gaz: sabit akışta (1 mL/dak) helyum. Fırın sıcaklık programı: 60°C (0 dak), 15°C/dak ile 100°C (0 dak), 5°C/dak ile 200°C (0 dak), 3°C/dak ile 270°C (10 dak), Toplam analiz süresi: 56 dakika.

GC-MS koşulları: Agilent GC (7890A serisi) ve Agilent MSD (5975C serisi) cihazı elektron iyonizasyon (EI) modunda kullanılmıştır. Analizlerde HP-5MS (30 m uzunluğunda, 0,25 mm çapında, film kalınlığı 0.25 µm) kapiler kolonu kullanılmıştır. Analiz parametreleri şu şekildedir: İyon kaynağı sıcaklığı: 230°C; Enjeksiyon modu: Splitless [tutma süresi (hold time)]: 0.5 dak; Enjeksiyon hacmi: 1 µl; Enjeksiyon sıcaklığı: 250°C; Taşıyıcı gaz: Sabit basınçta (17,78 psi) Helyum. Fırın sıcaklık programı: 70°C (2 dak), 25°C/dak ile 150°C (0 dak), 3°C/dak ile 200°C (0 dak), 8°C/dak ile 280°C (10 dak), Toplam analiz süresi: 41,867 dakikadır. Her bir pestisit için SIM iyonları, m/z olarak şu şekildedir: Alpha-cypermethrin 163, 181, 165, 77; beta-cyfluthrin 163, 206, 77, 165; chlorpyrifos 97, 199, 197, 314; deltamethrin 253, 251, 77, 181 ve lamda-cyhalothrin 181, 197, 208, 141.

LC-MS/MS koşulları: Analizde kullanılan cihaz (Waters TQD ACQUITY UPLC Core sistem) elektro sprey iyonizasyon (ESI) modunda kullanılmıştır. Analizlerde Acquity UPLC BEH C18 (100 mm uzunluğunda, 2.1 mm çapında, partikül büyüklüğü 1.7 µm) kolonu kullanılmış olup analiz parametreleri şu şekildedir: Kolon sıcaklığı: 50°C; Oto-örnekleyici sıcaklığı: 10°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL, Akış hızı: 0.45 mL/dak, Mobil faz A: 2 mM amonyum formatlı %10 MeOH-%90 Su, Mobil faz B: 2 mM amonyum formatlı %95 MeOH-%5 Su. Dereceli elüsyon programı şu şekildedir: %100 A-%0 B (0-0.5 dak), %100 A-%0 B (0.5-10 dak), %0 A-%100 B (10-12.5 dak), %0 A-%100 B (12.5-12.6 dak), %100 A-%0 B (12.6-15 dak).

Diğer parametreler şunlardır:

Source Sıcaklığı: 130°C; Kurutma sıcaklığı: 400°C; Kurutma gazı (900 L/h) ve Cone gazı (50L/h), azot; Parçalama (collision) gazı: Argon (0.28 mL/dak). Tanımlamalar MRM (multiple reacting monitoring) modunda yapılmıştır. Çalışmada analiz edilen her bir pestisit için optimize edilen cone ve collision (parçalama) enerjileri Çizelge 2'de verilmiştir.

Bazı Metot Performans Kriterlerinin Belirlenmesi Çalışmaları

Performans kriterlerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen pestisitlerden 2 ayrı karışım hazırlanmıştır. 1. karışım sıvı kromatografisi kullanılarak iyi analiz edilebilen pestisitleri (chlorpyrifos, dimethoate, diflubenzuron, triflumuron, imidacloprid ve deltamethrin), 2. karışım ise gaz kromatografisi kullanılarak iyi analiz edilebilen pestisitleri (alpha-cypermethrin, beta-cyfluthrin, lamda-cyhalothrin, chlorpyrifos ve deltamethrin) içermektedir.

Çizelge 2. LC-MS/MS'de analiz edilen pestisitlerin MRM parametreleri

Table 2. MRM parameters of pesticides analysed by LC-MS/MS

Pestisit Adı	Ana iyon (m/z)	İlk parçalanma iyonu (m/z)	İkinci parçalanma iyonu (m/z)	Cone (V)	1.Collision (V)	2.Collision (V)
Pesticide Name	Main ion (m/z)	First product ion (m/z)	Second product ion (m/z)	Cone (V)	1. Collision (V)	2. Collision (V)
Diflubenzuron (ESI-)	309.10	156.10	289.18	26	11	8
Triflumuron (ESI-)	357.05	85.05	154.05	30	41	12
Dimethoate	230.05	125.05	199.05	22	22	10
İmidacloprid	256.10	175.10	209.10	25	18	16
Chlorpyrifos	352.00	97.00	200.00	27	31	20
Deltamethrin	523.10	280.80	505.90	24	16	11

Deltamethrin ve chlorpyrifos her iki kromatografi tekniği kullanılarak analiz edilmiştir.

Bazı metot performans kriterlerinin belirlenmesi için zeytin ve zeytinyağı örneklerinde biri raporlama limiti diğeri de daha yüksek düzeyde olmak üzere iki farklı konsantrasyonda (20 ve 50 ng/g) 5 tekrarlı geri alma çalışmaları yapılmıştır.

1.Kalibrasyon kurvesi: Kalibrasyon kurvelerinin değerlendirilmesinde doğrusallık (r) göz önünde bulundurulmuştur. GC-ECD cihazında 5 noktalı (10, 25, 50, 100 ve 200 ng/g), LC-MS/MS cihazında ise 7 noktalı (2, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 ng/g) kalibrasyon eğrileri cihazların yazılımı kullanılarak çizdirilmiştir. Kalibrasyon serileri matriks etkisini elimine etmek için matriks uyumlu hazırlanmıştır.

2.Tespit Limiti (LOQ): Tespit limitinin belirlenmesinde geri alma çalışmalarındaki metot performans kabul edilebilirlik kriterlerini karşılayan (%RSD ≤ %20 ve % geri alma %70-120) en

düşük konsantrasyon olan 20 ng/g'lık çalışmalar değerlendirilmiştir (22).

3.Doğruluk ve Tekrarlanabilirlik: Doğruluk (% geri alma) ve tekrarlanabilirlik (%RSD) verileri kör (şahit) zeytin ve zeytinyağı örneklerinin iki farklı konsantrasyonda (20 ve 50 ng/g) ve her bir konsantrasyon için ayrı ayrı 5 tekrarlı (n=5) kuvvetlendirilmiş (spiked) geri alma çalışmalarından elde edilmiştir. % geri alma ve %RSD değerleri hesaplanırken 1. ve 2. denklemde verilen eşitlikler kullanılmıştır.

$$1. \text{Denklem \% Geri alma} = [(C1-C2)/C3]*100 \quad (23)$$

C₁: kuvvetlendirilmiş örnekte ölçülen konsantrasyon

C₂:kuvvetlendirilmemiş örnekte ölçülen konsantrasyon

C₃: kuvvetlendirme konsantrasyonu

$$2. \text{Denklem \% RSD} = (s/x)*100 \quad (24)$$

RSD: Relatif standart sapma

s: Standart sapma

x̄: ortalama

Çizelge 3. Zeytin örneklerinde analiz edilen pestisitlerin kalibrasyon kurvesi bilgileri

Table 3. Calibration curve data of pesticides determined in olive samples

Pestisit <i>Pesticide</i>	Cihaz <i>Instrument</i>	Kalibrasyon Aralığı (ng/g) <i>Calibration Range (ng/g)</i>	Korelasyon Katsayısı (r) <i>Correlation Coefficient (r)</i>
Diflubenzuron	LC-MS/MS	2-200	0.979
Triflumuron		2-200	0.985
Dimethoate		2-200	0.998
İmidacloprid		2-200	0.998
Chlorpyrifos		2-200	0.997
Deltamethrin		2-200	0.999
Lambda-cyhalothrin		GC-ECD	10-200
Beta-cyfluthrin	10-200		0.999
Alpha-cypermethrin	10-200		0.999
Chlorpyrifos	10-200		0.999
Deltamethrin	10-200		0.999

Çizelge 4. Zeytinyağı örneklerinde analiz edilen pestisitlerin kalibrasyon kurvesi bilgileri

Table 4. Calibration curve data of pesticides determined in olive oil samples

Pestisit <i>Pesticide</i>	Cihaz <i>Instrument</i>	Kalibrasyon Aralığı (ng/g) <i>Linear Range (ng/g)</i>	Korelasyon Katsayısı (r) <i>Correlation Coefficient (r)</i>
Diflubenzuron	LC-MS/MS	2-200	0.991
Triflumuron		2-200	0.987
Dimethoate		2-200	0.999
İmidacloprid		2-200	0.997
Chlorpyrifos		2-200	0.998
Deltamethrin		2-200	0.998
Lambda-cyhalothrin		GC-ECD	10-200
Beta-cyfluthrin	10-200		0.999
Alpha-cypermethrin	10-200		0.999
Chlorpyrifos	10-200		0.999
Deltamethrin	10-200		0.999

4.Seçicilik: Çalışmada, içinde analiz edilecek pestisitlerin olmadığı kör numuneler kullanılmış ve tüm sonuçlar kütle spektrometresi kullanılarak doğrulanmıştır.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan pestisitlerin kalibrasyon kurvesi bilgileri zeytin örnekleri için Çizelge 3’de, zeytinyağı örnekleri için ise Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 3 ve Çizelge 4’deki verilerden de görüleceği gibi tüm zeytin ve zeytinyağı çalışmalarının kalibrasyon eğrileri en düşüğü 0.979 olan iyi bir doğrusalılık göstermiştir.

Çalışmada kullanılan pestisitlerin gün içinde elde edilen geri alma ve tekrarlanabilirlik değerleri zeytin örnekleri için Çizelge 5’de, zeytinyağı örnekleri için ise Çizelge 6’da verilmiştir.

SANCO/12495/2011 (22) sayılı dokümanında tespit limiti (LOQ); metot performans kabul edilebilirlik kriterlerini ($RSD \leq \%20$ olmak üzere $\%70-120$ aralığında her temsili ürün için ortalama geri kazanımlar) karşılayan en düşük doğrulanmış kuvvetlendirme düzeyi olarak tanımlanmaktadır. Zeytin çalışmalarında Lamda-cyhalothrin’in ve

zeytinyağı çalışmalarında ise dimethoate’in geri alma oranları $\%70$ ’in altında bulunmuştur. Ancak, Pizzutti et al. (25), soya tohumlarında 169 pestisit LC-MS/MS cihazı ile metot validasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, çoklu kalıntı metotlarında $\%70$ değerinin altındaki geri alma değerlerinin iyi bir kesinlik değeri sağladıkları sürece ($RSD \leq \%20$) kabul edilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarımızdaki en düşük kuvvetlendirme düzeyi olan 20 ng/g bu kriterleri sağladığı için zeytin ve zeytinyağında kullandığımız metotların tespit limiti olarak bu değer belirlenmiştir.

SANCO/12495/2011 no’lu dokümanında (22) metot performans kabul edilebilir değerlerinin geri alma değeri için $\%70-120$ arasında, RSD tekrarlanabilirlik değeri için ise $\leq \%20$ olması gerektiği, bununla birlikte $\%60-140$ genişletilmiş aralığın rutin çoklu kalıntı analizleri için kullanılabilceği belirtilmektedir. Buna göre belirlenen pestisitlerin zeytin ve zeytinyağı örneklerinde 20 ve 50 ng/g konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlarının SANCO/12495/2011 no’lu dokümanının kriterlerini sağladıkları Çizelge 5 ve Çizelge 6’daki verilerden görülmektedir.

Çizelge 5. Zeytin çalışmalarının gün içi geri alma ve kesinlik değerleri
Table 5. Inter-day recovery and precision values of olive experiments

Pestisit <i>Pesticide</i>	Cihaz <i>Instrument</i>	Konsantrasyon (ng/g) <i>Concentration (ng/g)</i>	Geri alma (%) <i>Recovery(%)</i>	Tekrarlanabilirlik (% RSD) <i>Repeatability (RSD %)</i>
Diflubenzuron		20	97.51	2.87
		50	89.21	7.07
Triflumuron		20	99.64	8.09
		50	99.46	5.13
Dimethoate	LC-MS/MS	20	87.85	12.77
		50	81.33	5.50
İmidacloprid		20	80.29	12.84
		50	75.08	7.89
Chlorpyrifos		20	89.72	10.87
		50	66.78	6.20
Deltamethrin		20	78.71	5.28
		50	74.43	10.72
Lambda-cyhalothrin		20	61.15	2.54
		50	71.01	6.76
Beta-cyfluthrin		20	109.04	5.24
		50	112.69	2.72
Alpha-cypermethrin	GC-ECD	20	106.17	4.11
		50	97.11	1.92
Chlorpyrifos		20	98.20	5.00
		50	106.74	6.58
Deltamethrin		20	102.21	4.39
		50	109.45	4.44

Çizelge 6. Zeytinyağı çalışmalarının gün içi geri alma ve kesinlik değerleri
Table 6. Inter- day recovery and precision values of olive oil experiments

Pestisit Pesticide	Cihaz Instrument	Konsantrasyon (ng/g) Concentration (ng/g)	Geri alma (%) Recovery (%)	Tekrarlanabilirlik (% RSD) Repeatability (RDS %)
Diflubenzuron	LC-MS/MS	20	88,39	4,32
		50	106,40	1,90
Triflumuron		20	78,00	4,87
		50	91,72	6,51
Dimethoate		20	61,27	2,72
		50	65,60	2,37
İmidacloprid		20	77,79	4,44
		50	69,82	2,68
Chlorpyrifos		20	77,19	6,11
		50	61,99	2,34
Deltamethrin	20	96,79	2,30	
	50	88,44	4,82	
Lambda-cyhalothrin	GC-ECD	20	79,80	5,31
		50	77,45	4,67
Beta-cyfluthrin		20	110,89	2,79
		50	146,32	2,04
Alpha-cypermethrin		20	89,53	12,04
		50	94,42	5,10
Chlorpyrifos		20	108,25	18,33
		50	103,91	6,74
Deltamethrin		20	95,17	15,15
		50	90,83	7,73

SONUÇ

Ülkemizde zeytin üretiminde ruhsatlı ve MRL değerleri belirlenmiş olan bazı pestisit kalıntıları, farklı metotlarla hızlı ve etkili bir şekilde zeytin ve zeytinyağı örneklerinden ekstrakte edilerek analiz edilmiştir. Ayrıca, uygulanan metotların bazı metot performans kriterleri (doğrusallık, tespit limiti, doğruluk, tekrarlanabilirlik, seçicilik) belirlenmiştir. Belirlenen metot performans kriterleri SANCO/12495/2011 no'lu dokümanı kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Her iki metodun da belirlenen metot performans kriterleri çalışılan pestisitler için kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur. Her iki metot da zeytin ve zeytinyağında pestisit kalıntısı analizi yapan laboratuvarlarca uygulanabilecek, çok sayıda kalıntının aynı anda analizine olanak veren, fazla sarf malzemesi gerektirmeyen, kolay, hızlı ve güvenilir metotlardır.

KAYNAKLAR

1. Karakaya, M. ve Boyraz, N. 1992. Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları. *Ekoloji Dergisi*, 4, 11-15.

2. Fernandez-Alba, A.R. and Garcia-Reyes, J.F. 2008. Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 973-990.

3. Wilson, C. and Tisdell, C. 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics*, 39, 449-462.

4. Gonzalez-Rodriguez, R.M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B. and Simal-Gandara, J. 2008. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetable using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *J Chromatogr A*, 1196-1197, 100-109.

5. Fenol, J., Hellin, P., Martinez, C.M., Miguel, M. and Flores, P. 2007. Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Food Chemistry*, 105, 711-719.

6. Beyer, A. and Biziuk, M. 2008. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry* 108: 669-680.

7. Krueve, A., Künnapas, A., Herodes, K. and Leito, I. 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography- mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1187, 58-66.
8. Soyel, N. Pestisitler-1. *Cypro Gurme Dergisi* 2004, (22); 3.
9. Dömötörova, M. and Matisova, E. 2008. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis. *J Chromatogr A*, 1207, 1-16.
10. Anon 2011. Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. (http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/kodeks_yonetmelik/pestisit_maksimum_kalinti_limitleri_yonetmelik.html) (Eriřim tarihi 09.12.2012).
11. Çömelekođlu, Ü., Mazmancı, B. ve Arpacı, A. 2000. Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan tarım işçilerinde karaciğer fonksiyonlarının incelenmesi. *Turk J Biol*, 24, 461-466.
12. Soyöz, M. and Özçelik, N. 2003. Zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 10, 6-9.
13. Hercegova, A., Dömötörova, M., Kruzlicova, D. and Matisova, E. 2006. Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography- mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *J Sep Science*, 29, 1102-1109.
14. Garcia-Reyes, J.F., Ferrer, C., Gomez-Ramos, M.J., Molina-Diaz, A. and Fernandez-Alba, A.R. 2007. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 239-251.
15. Dıraman, H., Çam, M. ve Özder, Y. 2009. Yabancı ülke kökenli natürel zeytinyağlarının yağ asitleri ve triaçilgliserol bileşenlerine göre kemometrik sınıflandırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4 (2): 22-34.
16. Cunha, S.C., Lehotay, S.J., Mastovska, K., Fernandes, J.O., Beatriz, M., Oliveira, P.P. 2007. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives, *J Sep Sci*, 30, 620-632
17. Hernando, M.D., Ferrer, C., Ulaszewska, M., Garcia-Reyes, J.F., Molina-Diaz, A., Fernandez-Alba, A.R. 2007. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil, *Anal Bioanal Chem*, 389, 1815-1831.
18. Barrek, S., Paise, O., Loustalot, M.F.G. 2003. Determination of residual pesticides in olive oil by GC-MS and HPLC-MS after extraction by size-exclusion chromatography, *Anal Bioanal Chem* 376: 355-359.
19. Cunha, S.C., Lehotay, S.J., Mastovska, K., Fernandes, J.O., Beatriz, M., Oliveira, P.P. 2010. *Sample preparation approaches for the analysis of pesticide residues in olives and olive oils, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Chapter 70, Elsevier Inc., Pp: 653-666.
20. Yücer, M. M. 2010. *Rubsathı Tarım İlaçları* 2010. Hasad Yayıncılık, 248 s. İstanbul.
21. Anon 2011. Variation of QeEChERS-Method for Vegetable Oil Samples (fatty matrix without water) (<http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/q-oil.pdf>) (Eriřim tarihi Aralık, 2011).
22. Anon 2012. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Sanco, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate, Document No. SANCO/12495/2011. Son revizyon tarihi 01.01.2012.
23. EURACHEM Guide 1998. The Fitness for purpose of analytical methods, A laboratory guide to method validation and related topics. ISBN:0-948926-12-0.
24. NMKL Procedure No.4. 2005. Estimayion and expression of measurement uncertainty in chemical analysis (<http://www.nmkl.org/>) (Eriřim tarihi 09.12.2012).
25. Pizzutti, I.R., Kok, A., Hiemstra, M., Wickert, C. and Prestes, O.D. 2009. Method validation and comparison of acetonitril and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216, 4539-4552.