

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATESLERDE PESTİSİT TAYİNİ İÇİN GC-MS/MS İLE ÇOKLU KALINTI
ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Taner ERKAYMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATESLERDE PESTİSİT TAYİNİ İÇİN GC-MS/MS İLE ÇOKLU KALINTI
ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

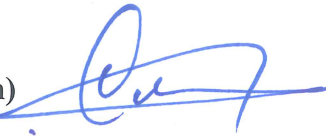
Taner ERKAYMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 03/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Danışman)



Prof. Dr. Mehmet İNAN



Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY



ÖZET

DOMATESLERDE PESTİSİT TAYİNİ İÇİN GC-MS/MS İLE ÇOKLU KALINTI ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Taner ERKAYMAZ

Yüksek lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

03/07/2017, 70 Sayfa

Pestisit kalıntıları; gıda güvenliği, çevre kirliliği, toksikoloji ve iş sağlığı gibi çeşitli uygulama alanları için analiz edilmektedir. Modern tarımın gelişmesiyle birlikte özellikle meyve ve sebzelerin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılan pestisitlerin kalıntı analizleri oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Pestisit kalıntılarının ayrıntılı ve hassas şekilde analiz edilerek izlenmesi, insanların gıda tüketimleriyle pestisitlere hangi seviyede maruz kaldıklarının değerlendirilebilmesi için gereklidir.

Gıda güvenliğini sağlamak amacıyla pestisit kalıntılarının belirlenmesinde doğru ve güvenilir metotların kullanılması çok önemlidir. Bu nedenle, nicel ve nitel analizler için uygun, verimli, hızlı ve aynı zamanda doğru çalışan metotların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Gaz Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi cihazı (GC-MS/MS) kullanarak tek bir analitik çalışma ile olabildiği kadar çok sayıda pestisit etken maddesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece analiz maliyetlerini azaltmak, analiz süresini kısaltmak ve pestisit kalıntılarının belirlenmesine yönelik çalışmalara katkı sağlamak mümkün olacaktır.

Bu araştırma, standart etken maddesi temin edilebilen ve gaz kromatografisi ile tespit edilebilen tüm pestisitleri analiz etmeye yöneliktir. Çalışma sonucunda gıdalarda 266 adet pestisit tespit için doğru ve güvenilir sonuçlar veren bir analiz metodu geliştirilmiştir. Konu ile ilgili literatür incelendiğinde, gaz kromatografisi ile tespit edilebilen pestisitlerin bir kısmını analiz etmeye yönelik bazı çalışmalar yapıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda analiz edilebilen pestisit sayısı 212 adettir. Gıdalarda pestisit tespitine yönelik bu çalışmada geliştirilen analiz metodunun, etken madde sayısının 266 adet ve analiz süresinin önceki çalışmalardan çok daha kısa oluşu bakımından mevcut analiz metotları arasında en iyilerden biri olarak kabul edilebilecek niteliklere sahip olduğu değerlendirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Pestisit, Gıda Güvenliği, GC-MS/MS Cihazı, Analitik Metot Geliştirme.

JÜRİ:

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MULTI-RESIDUE METHOD FOR PESTICIDE DETERMINATION IN TOMATOES BY GC-MS/MS

Taner ERKAYMAZ

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

03/07/2017, 70 Pages

Pesticide residues are analyzed for various application areas such as food safety, environmental pollution, toxicology and occupational health. With the development of modern agriculture, residue analyses of pesticides, which are used extensively in the production of fruits and vegetables, have become a very important issue. Detailed and sensitive analysis and monitoring of pesticide residues are necessary for people to assess their level of exposure to pesticides by food consumption.

It is very important to use accurate and reliable methods to determine pesticide residues to ensure food safety. For this reason, it is important to develop appropriate, efficient, fast and accurate methods for quantitative and qualitative analysis.

In this thesis study, it is aimed to determine as many pesticide agents as possible by a single analytical study using Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometer (GC-MS/MS). Thus, it will be possible to reduce the analysis costs, shorten the analysis period and contribute to the studies to determine the pesticide residues.

This research is intended to analyze all the pesticides that can be detected by gas chromatography, which their standards of are available. With the method obtained in the study, an analytical method has been developed which gives accurate and reliable results for the determination residues of 266 pesticides in foods. When the relevant literature is examined, it has been determined that some studies have been carried out to analyze some of the pesticides that can be detected by gas chromatography. The numbers of pesticides which can be analyzed in these studies were 212. The method developed in this study was assessed to have qualities that could be regarded as one of the best methods among the previous studies in terms of the number of active substances, has the number of active substances are 266 and has the short duration of the analysis.

KEYWORDS: Pesticides, Food Safety, GC-MS/MS Instrument, Analytical Method Development

COMMITTEE:

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Supervisor)

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Assoc. Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

ÖNSÖZ

Dünya geneli değerlendirildiğinde tarımsal üretim, ihtiyaç duyulan tüketimi tam olarak karşılayamamaktadır. Gelişen zirai üretim teknikleri ile birlikte zararlılarla mücadele amacıyla kullanılan ve ciddi sağlık riski oluşturan çeşitli pestisitlerin eser miktardaki kalıntıları; gıda güvenliği, çevre kirliliği, içme ve kullanma suyu güvenliği, toksikoloji ve iş sağlığı gibi çeşitli uygulama alanları ile ilgili olarak analiz edilmektedir.

Gıdaların üretimi ve depolanması süreçlerinde raf ömrünü uzatmak, mikroorganizmaların zararlarından korumak ve oksidasyonu engellemek gibi çeşitli sebeplerden dolayı katkı maddeleri kullanılırken, tarımsal ürünlerin üretimi sırasında yabancı ot, böcek ve hastalık zararlarından korumak amacıyla da pestisitler kullanılmaktadır.

Gıda güvenliği gereksiniminin ortaya çıkması sonucunda, bilinçli tüketici sayısı artmış ve insanlarda satın aldıkları ve tükettikleri gıdaların içeriğini öğrenme isteği doğmuştur. Artan nüfus ile üreticiler; doğal yollardan daha sağlıklı ancak daha az ürün elde etmek yerine, katkı maddeleri ve pestisitler gibi çeşitli kimyasal maddeler kullanıp daha fazla ürün elde ederek daha çok kazanç sağlamak gayesine düşmüşlerdir.

Modern tarımda kullanılan pestisitler; bilinçsiz arazi sulamaları, toz ve yağmur bulutlarının hareketlilikleri ve kontrolsüz ilaçlama gibi nedenlerle içme ve kullanma sularına bulaşmaktadır. Kullanılan sentetik pestisitlerin çeşitliliğinin ve sayılarının çokluğu nedeniyle, tek bir analitik çalışma ile tarımda etkili şekilde kullanıldığı bilinen pestisitlere ait kalıntıların maksimum sayıda belirlenmesi çok önem taşımaktadır.

Yapılan bilimsel çalışmalarda insan ve çevre sağlığına zararları bilinen pestisit kalıntıları; gıda güvenliği, çevre kirliliği, toksikoloji ve iş sağlığı gibi çeşitli uygulama alanlarında analiz edilmektedir. Modern tarımın gelişmesiyle birlikte yoğun kullanımları nedeniyle özellikle meyve ve sebzelerde pestisit kalıntısı analizleri, gıda güvenliği açısından oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Pestisit kalıntılarının ayrıntılı ve hassas şekilde analiz edilerek izlenmesi, insanların gıda tüketimleriyle pestisitlere hangi seviyede maruz kaldıklarının değerlendirilmesinde çok önemlidir. Pestisit kalıntılarının yol açabileceği sorunların önceden tespiti ve gerekli önlemlerin alınabilmesi sürekli ve hızlı sonuç verebilecek kalıntı izleme çalışmalarıyla mümkündür.

Bu çalışmada GC-MS/MS cihazı kullanarak çok sayıda pestisit etken maddesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece analiz maliyetlerini azaltmak, analiz süresini kısaltmak ve pestisit kalıntılarının belirlenmesine yönelik çalışmalara katkı sağlamak mümkün olacaktır. Bitkisel ve hayvansal çeşitli gıdalarda bulunan iz miktardaki pestisit kalıntılarının tespiti oldukça zor ve zahmetli bir işlemdir. Gıdalarda pestisit kalıntı analizlerinde genellikle birden fazla pestisit aktif maddesi ile karşılaşılabilir. Bu nedenle tek bir analitik çalışma ile birden fazla pestisit etken maddesinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bu araştırma ile standart etken maddesi temin edilebilen ve gaz kromatografisi ile tespit edilebilen tüm pestisitlerin analiz edilebileceği gösterilmiştir. Çalışma

sonucunda gıdalarda 266 adet pestisitın tespiti için doğru ve güvenilir sonuçlar veren bir analiz metodu geliştirilmiştir. Literatür araştırması yapıldığında konu ile ilgili önceki çalışmaların, gaz kromatografisi ile tespit edilebilen pestisitlerin bir kısmını analiz etmeye yönelik çalışmalar olduğu ve bu çalışma sonucunda geliştirilen metodun, etken madde sayısının çokluğu açısından en etkili metotlardan biri olduğu belirlenmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek, engin bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan, anlayış ve yardımlarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı tez konum olarak öneren, hoşgörüyü, engin bilgi ve tecrübeleriyle destek olan, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim hocam Yrd. Doç. Dr. Sayın Bülent ŞIK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan, çabası ve gayretiyle birlikte çalışmaktan mutluluk ve gurur duyduğum değerli ekip arkadaşım Sayın Gizem YILDIZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan, verdiği tüm emek ve destekleriyle her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Sayın Timur TONGUR'a,

Yaşamım boyunca maddi-manevi her konuda beni destekleyen ve bu günlere gelmeme vesile olan Anneme ve Babama,

Tez çalışmam süresince gösterdikleri sabır ve anlayışları için kızım Rumeysa, oğlum Nurettin ve sevgili eşim Sultan ERKAYMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca laboratuvarlarını kullanma imkânı veren Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi kurucusu Sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e ve Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. Pestisitler Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2. Pestisitlerin Sınıflandırması.....	4
2.2.1. Pestisitlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler	5
2.2.2. Literatürdeki önceki çalışmalar.....	7
2.3. Validasyon	11
2.3.1. Metot validasyonu.....	12
2.3.2. Metot ölçüm belirsizliği.....	13
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Gerekli Kimyasallar ve Alet Ekipmanlar	15
3.2.1. Numune ön hazırlık ekipmanları	15
3.2.2. QuEChERS numune hazırlık malzemeleri	15
3.2.3. Kimyasal malzemeler ve çözeltiler	15
3.3. Metot.....	16
3.3.1. QuEChERS yöntemi ile numune hazırlama	16
3.3.2. GC-MS/MS cihazı analiz bilgileri	19
3.3.3. GC-MS/MS cihaz özellikleri	20
3.3.4. Matriks uyumlu kalibrasyon standartları hazırlanması.....	20
3.3.5. Geri kazanım (recovery)	20
3.3.6. Enjeksiyon sırası	21
3.3.7. İstatistiksel değerlendirme	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Analizi Yapılması Planlanan Pestisitlerin Belirlenmesi ve Multi-Standart Karışımın Hazırlanması	23
4.2. GC Fırın ve İnlet Programının Oluşturulması ve Pestisitlere Ait Alıkonulma Sürelerinin Belirlenmesi	24
4.2.1. Gaz kromatografisi fırın ve inlet parametreleri	28
4.3. Pestisit Fragmentasyon İyonlarının Tespit Edilmesi ve Tespit Edilen GC-MS/MS İyon Geçişleri ve Çarpışma Enerjileri.....	31
4.4. Metot Validasyonu	41
4.4.1. Doğrusallık.....	41
4.4.2. Tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) değerlerinin hesaplanması	43
4.4.3. Doğruluk ve kesinlik.....	44
4.5. Metodun Ölçüm Belirsizliği	53
4.5.1. Belirsizlik tanımları	53
4.5.2. Belirsizlik kaynaklarını oluşturan analiz metodu akış şeması	53
4.5.3. Belirsizlik hesaplama yöntemi	54
4.5.4. Belirsizlik bileşenlerinin kılçık diyagramında gösterilmesi	55

4.5.5. Ölçüm belirsizliği hesaplama uygulaması	55
4.5.5.1. Tartımdan gelen ölçüm belirsizliğinin hesaplanması	55
4.5.5.2. Hacimden gelen ölçüm belirsizliğinin hesaplanması	56
4.5.5.3. Örnek olarak alachlor için hesaplanan ölçüm belirsizliği	62
4.5.5.3.1. Alachlor referans standarttan gelen ölçüm belirsizliği	62
4.5.5.3.2 Alachlor için kesinlik çalışmalarından gelen ölçüm belirsizlikleri.....	62
4.5.5.3.3. Geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik	63
4.5.5.3.4. Alachlor için birleşik ve genişletilmiş belirsizlik	63
5. SONUÇ	65
6. KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
dk.	Dakika
g	Gram
G	Yerçekimi kuvveti
kg	Kilogram
L	Litre
m	Kütlece ağırlık
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
°C	Santigrat derece
eV	Volt
V	Hacim

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
AOAC	Analitik Kimyacılar Birliği
CE	Çarpışma enerjisi
CEN	Avrupa Standardizasyon Komitesi
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
GC	Gaz kromatografisi cihazı
GC-MSD	Gaz kromatografi kütle dedektörü cihazı
GC-MS/MS	Gaz kromatografi kütle/kütle spektrometre cihazı
GCB	Aktif karbon
GSMH	Gayri Safi Milli Hâsıla
HCH	Hekzaklorosikloheksan
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	Sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi
LOD	Tespit limiti
LOQ	Ölçüm limiti
MAE	Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MRL	Maksimum kalıntı limiti
MSPD	Matriks katı faz ayrımı
NaCl	Sodyum klorür
PLE	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
PSA	Primer sekonder amin
QqQ	Üçlü kuadrupol
QqTOF	Uçuş zamanlı kuadrupol

r^2	Korelasyon katsayısı
RSD	Bağıl standart sapma
%RSD	Yüzde bağıl standart sapma
RT	Alıkonma zamanı
S/N	Sinyal / gürültü
SANCO	Avrupa Birliği Sağlık ve Tüketici Genel Müdürlüğü
SD	Standart sapma
SFE	Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
SPME	Katı faz mikroekstraksiyonu
SRM	Seçili reaksiyon izleme
TOF-MS	Uçuş zamanlı kütle spektrometresi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. QuEChERS yöntemi ile numune hazırlama basamakları (Lehotay 2007)	17
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan GC-MS/MS cihazı.....	22
Şekil 4.2. Pyrimethanil pestisiti ile ilgili genel bilgiler.....	23
Şekil 4.3. Solvent bekleme süresi belirlenmesinde kromatogram görüntüsü	25
Şekil 4.4. 17 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram	26
Şekil 4.5. 23 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram	26
Şekil 4.6. 27 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram	26
Şekil 4.7. 33 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram	27
Şekil 4.8. Permethrin'e ait kütle spektrumu analiz bilgileri.....	27
Şekil 4.9. Değişik fırın programlarında cis-trans permethrin iyon spektrumları	28
Şekil 4.10. 23, 27 ve 33 dakika fırın programlarında cis-trans permethrin iyon spektrumları.....	28
Şekil 4.11. İnlet parametreleri görüntüsü	30
Şekil 4.12. Fırın sıcaklık programı görüntüsü.....	30
Şekil 4.13. İnlet ve fırın sıcaklık programı - mobil faz akış diyagramları	30
Şekil 4.14. Mobil faz akış diyagramı	31
Şekil 4.15. MS/MS kütle detektörü çalışma penceresi görüntüsü	32
Şekil 4.16. Alachlor kalibrasyon grafiği	41
Şekil 4.17. Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği.....	42
Şekil 4.18. Endosulfan-alpha kalibrasyon grafiği.....	43
Şekil 4.19. Pestisit analiz metodu akış şeması	54
Şekil 4.20. Ölçüm belirsizliği balık kılçığı diyagramı	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sık olarak kullanılan pestisitlerin kimyasal sınıflandırılması (Weiss vd 2004)	5
Çizelge 2.2. AOAC rehberinde önerilen metot validasyonu parametreleri (Weitzel vd 2007)	13
Çizelge 3.1. Bazı numune türleri için numune miktarı ve su ilavesi (Lehotay 2007)	19
Çizelge 4.1. GC-MS/MS sistemi cihaz çalışma parametreleri.....	29
Çizelge 4.2. Tespit edilen GC-MS/MS iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri.....	33
Çizelge 4.3. Alachlor kalibrasyon grafiği değerleri.....	42
Çizelge 4.4. Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği değerleri	42
Çizelge 4.5. Endosulfan-alpha kalibrasyon grafiği değerleri.....	43
Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri	45
Çizelge 4.7. 100 µl Enjektör şırınganın belirsizlik değerleri	57
Çizelge 4.8. Pestisitlere ait hesaplanan ölçüm belirsizlikleri.....	58
Çizelge 4.9. Kalibrasyon grafiği koefficient katsayısı hesaplamaları.....	62
Çizelge 4.10. Kalibrasyon grafiği regrasyon istatistik hesaplamaları.....	62
Çizelge 4.11. Alachlor geri kazanım değerleri ve relatif standart sapma değerleri	63

1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki hızlı artış, doğal kaynakların azalması ve kirlenmesi nedeniyle, sağlıklı ve güvenilir özelliklere sahip gıdalara olan gereksinim gün geçtikçe artmaktadır. Sağlıklı bir yaşam ancak gıda güvencesi ve güvenliğinin sağlanması ile sürdürülebilmektedir.

Gıda güvenliği; gıda kaynaklı hastalıklara neden olan biyolojik, fiziksel ve kimyasal etkenleri önleyecek şekilde gıdaların işlenmesi, hazırlanması, taşınması, depolanması ve son tüketiciye sunulması sürecini ele alan bilimsel bir yaklaşımdır. Gıda güvenliğinde temel amaç, gıdaların tarladan çatala olarak özetlenebilecek bir süreçte sağlığa uygun olmalarını ve besleyici özelliklerini muhafaza etmelerini sağlamaktır. Güvenli gıda ise her türlü bozulma ve bulaşma etkeninden arındırılarak tüketime uygun hale getirilmiş gıdadır (Delen vd 2005).

Geçmişte, bir gıdanın sağlıklı olup olmadığı değerlendirirken mikrobiyolojik kalitesi en önemli kıstas olarak ele alınmaktaydı. Gıdanın kimyasal özellikleri kurumadde, yağ veya tuz miktarı gibi makro bileşenler açısından değerlendirilmekte ve tüketiciyi aldatmaya yönelik bir durum olup olmadığı belirlenmeye çalışılmaktaydı. Ancak, günümüzde bir gıdanın kalite özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmaların daha kapsamlı olduğu görülmektedir. Gıdanın mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerini belirlemek elbette önemini yitirmemiştir; ancak gıdaların katkı ve kalıntı maddeleri açısından daha ayrıntılı incelenmesi, özellikle 1980'li yıllardan bu yana giderek önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Artan sanayileşme, kentleşme ve tarımda kimyasal kullanımı gıdalarda bulunan toksik organik ve inorganik bileşen sayısının artmasına neden olmuştur. Başka bir deyişle, tükettiğimiz gıdalara üretim-tüketim sürecinde çeşitli kimyasal maddeler bulaşmakta ve kalıntı bırakmaktadır. Bu bileşenlerin gıdalara geçişine veya bulaşmasına engel olmak ne yazık ki artık çok da olanaklı görünmemektedir. Bu nedenle, gıdaların kalıntı madde içerikleri yönünden incelenmesi analitik sürecin en önemli parçası haline gelmiştir. Pestisitler veya tarımsal gübrelerin tarımsal üretim esnasında yanlış veya gereğinden çok kullanılması tükettiğimiz gıdalara, endüstriyel kirlilik ürünleri olan poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller, ağır metaller, dioksin ve furanlara kadar çok sayıda kimyasal maddenin bulaşmasına neden olabilmektedir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Günümüzün tarımsal üretiminde, ürünleri zararlı böcekler, patojen mikroorganizmalar ve yabancı otlardan korumak, kalitesini ve verimi arttırmak için çeşitli modern tarım yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden biri, tarım ilaçlarının büyük bir kısmını oluşturan pestisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadeledir. Kimyasal mücadele, zararlılarla mücadelede yüksek etkinliğe sahip olup çok hızlı sonuç vermektedir (Delen vd 2005). Kimyasal mücadele yöntemlerinin bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomik getirisi olduğu iddia edilse de, bilinçsiz veya kontrolsüz kullanımı ile gıda güvenliğini tehdit edebileceği bildirilmektedir (Yüce 2006, Sannino vd 2004). Yapılan çalışmalarda kullanımının kontrol altında olduğu durumlarda bile bu tür mücadelelerin insanlık için ciddi riskler oluşturduğu ortaya konulmuştur (Kaushik vd 2009).

Pestisit kalıntıları; gıda güvenliği, çevre kirliliği, toksikoloji ve iş sağlığı gibi farklı uygulama alanları için çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmektedir. Gıda güvenliği açısından modern tarımın gelişmesiyle birlikte yoğun kullanımları nedeniyle özellikle meyve ve sebzelerde pestisit kalıntısı analizleri oldukça önemli bir konu haline gelmiştir (Niessen 2010). Pestisit kalıntılarının ayrıntılı ve hassas şekilde analiz edilerek izlenmesi, insanların gıda tüketimleriyle pestisitlere hangi seviyede maruz kaldıklarının değerlendirilmesi açısından çok önemlidir (Sannino vd 2004).

Pestisit kalıntılarının yol açabileceği problemlerin hızla çözülebilmesi, yol açtığı sorunların önceden tespiti ve gerekli önlemlerin alınabilmesi sürekli ve hızlı sonuç alınabilecek kalıntı izleme çalışmalarıyla mümkündür. Bunu gerçekleştirebilmek için bu tür analizleri yapabilecek donanımına sahip tam teşekküllü laboratuvarlara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle gerek cihaz ve gerekse teknik eleman açısından yeterli, modern ve aynı zamanda uygun ve rutin çalışılabilen analiz metotları ile destekli laboratuvarların faaliyetlerinin desteklenmesi gerekmektedir. Bitkisel ve hayvansal çeşitli gıdalarda iz miktardaki pestisit kalıntılarının tespiti oldukça zor ve zahmetli bir işlemdir. Gıdalarda pestisit kalıntı analizlerinde genellikle birden fazla pestisit aktif maddesi ile karşılaşılabilir. Bu nedenle tek bir analitik çalışma ile birden fazla pestisit etken maddesinin belirlenebilmesi önem taşımaktadır (Lehotay vd 2010).

Kimyasal mücadelede pestisit olarak kullanılan 800'den fazla aktif madde bulunmakta ve gelişen ihtiyaçlara göre bu aktif maddelerin sayısı artış gösterebilmektedir. Pestisitlerin birçoğu sentetik olarak elde edilmekte ve kullanım amaçlarına göre insektisitler, fungusitler, herbisitler ve akarisitler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte pestisitler; kimyasal yapılarına göre de organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı, pretritoit, azol ve üre grubu içeren pestisit grupları ve benzeri gruplar şeklinde sınıflandırılabilir (Padovani 2004). Pestisit analizlerinde iki temel enstrümantal analiz yöntemi kullanılmaktadır. Kimyasal özellikleri açısından moleküler olarak polaritesi daha yüksek, termal kararlılığı düşük ve bu nedenle uçucu özelliği olmayan pestisitler sıvı kromatografi temelli analiz yöntemi ile çalışan LC-MS (Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi), LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometresi), LC-TOF/MS (Sıvı Kromatografi Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) vb. analiz sistemleri ile analiz edilebilmektedir. Polaritesi düşük, termal kararlılığı yüksek olan ve bu nedenle de uçucu özelliğe sahip olan tüm diğer pestisitler ise gaz kromatografi temelli analiz yöntemi ile çalışan GC-MS/MS (Gaz Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometresi), GC-MSD (Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi), GC-FID (Gaz Kromatografi Alev İyonlaşma Dedektörü), GC-ECD (Gaz Kromatografi Elektron Yakalama Dedektörü) ve GC-NPD (Gaz Kromatografi Azot-Fosfor Dedektörü) vb. analiz sistemleri ile belirlenebilmektedir (Sharma vd 2010).

Pestisitler, kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle doğada farklı şekilde bulunabilmektedir. Buna bağlı olarak gıdalardaki bazı pestisit kalıntıları gerek analiz öncesi ve gerekse analiz esnasında ısı, nem, ışık, zaman ve pH gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle farklı ürünlere dönüşmekte veya parçalanmakta ve bu dönüşüm veya parçalanma ürünleri kullanılan pestisitlerden daha zehirli etkilere sahip olabilmektedir. Captan, folpet, amitraz, carbosulfan, captafol, iprodione, trichlorfon gibi birçok pestisit metabolitlerine dönüşebilmektedir (Soler vd 2006, Vidal vd 2009). Bu durum pestisit

kalıntı analizlerinde sorunlara neden olmakta ve pestisitlerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri de artırmaktadır. Daha toksik etkiye sahip çevrede kalıcı kimyasalların varlığı, yerel ve küresel çevresel etkiler ile insanlar için ciddi akut sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Kaushik vd 2009).

Gıda güvenliğini sağlamak amacıyla pestisit kalıntılarının belirlenmesinde doğru ve güvenilir metotlar kullanılması gerekmektedir. Analitik laboratuvarlarının temel hedefi; nitel ve nicel analizler için uygun, verimli, hızlı ve aynı zamanda doğru çalışan analiz metotları geliştirmektir. Pestisit kalıntı analizlerinde birbirinden farklı kütle analizörleri (kuadropol, uçuş zamanlı, kuadropol-iyon tuzağı vs.) kullanılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pestisit kalıntılarının tespiti için kullanılan en güçlü ve çok yönlü analiz cihazlarından biri sıralı kütle spektrometreleridir (MS/MS). Sıralı kütle spektrometreleri, farklı ürün gruplarında çoklu analitlerin aynı enjeksiyonda nicel olarak belirlenmesinde verimli ve hızlı çalışan metotlar geliştirmek için öncelikli olarak tercih edilen sistemler arasında yer almaktadır (Vidal vd 2002, Klein vd 2003, Mol vd 2003, Sharma vd 2010).

Bu çalışmada, analiz maliyetlerini azaltmak ve analiz süresini kısaltmak için GC-MS/MS cihazı kullanarak tek bir analitik çalışma ile olabildiği kadar çok sayıda pestisit etken maddesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Birçok pestisit termal olarak stabil ve uçucudur. Polaritesi düşük ve uçucu olan pestisitler gaz kromatografi temeli ile çalışan GC-MS/MS, GC-MSD, GC-FID, GC-ECD ve GC-NPD vb. farklı belirleme ilkelerine göre çalışan sistemler ile analiz edilmektedir. Hem sıvı hem de gaz kromatografisi cihazları ile uyumlu olan kütle seçici detektörler (MS/MS veya MSD detektörler) ile hassas ve doğruluğu yüksek güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Kütle spektrometresi cihazları ile tek bir analiz süresi içerisinde (yaklaşık 20-40 dakika aralığında), analizi yapılan tüm pestisitler belirlenebilmektedir. Farklı molekül ağırlıklarına sahip olmalarından dolayı pestisitler, bu cihazlar ile seçici bir şekilde tespit edilebilmektedir (Mol vd 2003, Sharma vd 2010). Kütle spektrometresi ile yapılan çalışmalarda öncelikle cihaza belirli konsantrasyonlarda hazırlanan pestisitlerin saf standartları verilerek her bir pestisit için belirleme yapılmasını sağlayacak parametreler tespit edilmektedir. Daha sonra numuneler üzerinde çalışmakta ve daha önce tespit edilen parametreler temel alınarak, standartlar ve numunede bulunan pestisitlere ait cihazdan elde edilen veriler karşılaştırılarak miktarsal tayinler yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan analitik metotlar çok düşük düzeylerde kalıntı ölçme yeteneğine sahip olmalı, yani hem pestisit tanınması hem de kalıntı miktarının tespit edilerek doğrulanmasında kesin kanıt sağlamalıdır (Di Muccio vd 2006).

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Pestisitler Hakkında Genel Bilgiler

Bitki veya diğer canlılara zarar veren küçük hayvan ve böcek gibi zararlıları öldürmek, ortamdaki uzaklaştırmak, etkisiz hale getirmek veya zararlı etkilerini azaltmak amacıyla kullanılan maddelere genel olarak pestisit adı verilmektedir. Geleneksel olarak sadece böcek ve sineklere karşı kullanılan maddeler pestisit olarak adlandırılmaktadır. Ancak pestisitler kullanıldıkları değişik etkenlere göre insektisitler, herbisitler ve fungusitler olarak gruplandırılmaktadır. Bunun yanı sıra yaprak dökücü, büyüme düzenleyici ve kurutucu maddeler de pestisit olarak adlandırılmaktadır. Zararlı ‘pest’ olarak nitelendirilen canlılar, genel olarak bulunması istenmeyen yerlerde yaşayan ve bitki, hayvan veya insanlara zarar veren tüm canlılar için kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak böcekler, sinekler, fare ve benzeri küçük hayvanlar, mantarlar, mikroorganizmalar ve prionlar sayılabilmektedir. Kullanım alanları dikkate alındığında pestisitler yalnızca tarım sektöründe değil, günlük hayatta da yaygın olarak kullanılmaktadır. Böcek öldürücüler/kovucular, evlerde kullanılan temizlik malzemeleri, fare ilaçları, evcil hayvanlar için kullanılan dezenfektanlar, çiçek ilaçları, bahçe ve garajlarda istenmeyen otlara karşı kullanılan ilaçlar ve yüzme havuzlarında yosun türü bitkilerin oluşumunu önlemek için kullanılan kimyasallar da birer pestisittir (Güler vd 1997).

Pestisitlerin kullanımında dikkat edilmesi gereken en temel konu, bu tür maddelerin kullanım amacının zararlıları öldürmek veya bir şekilde etkilerini önlemek olduğudur. Bu özelliklerinden dolayı insan ve çevre sağlığı açısından tüm pestisitlerin az veya çok sağlık riski taşıması olağan bir durumdur. Bununla birlikte bazı önemli hastalıkların yayılmasında rol oynayan zararlı canlıların kontrol altına alınmasında pestisitlerden yoğun olarak yararlanılabilmektedir (Delen vd 2005).

Pestisitlerin tanımı son derece geniş ve kapsamlı olmakla birlikte, uygulamada bu tanım içinde yer alabilecek bazı maddeler kapsam dışı bırakılmaktadır. Bu maddeler arasında insan ve çiftlik/kümes hayvanlarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bitkilerin büyümesini arttıran ve sağlık durumlarını iyileştiren/geliştiren gübre ve besin öğeleri, belirli böcekleri yiyerek yaşayan kuşlar gibi biyolojik kontrol sağlayan canlılar ve böceklere etkili olan ancak son derece düşük risk taşıyan veya hiç risk taşımayan sarımsak, nane gibi maddeler sayılabilmektedir (Güler vd 1997).

2.2. Pestisitlerin Sınıflandırması

Pestisitlerin büyük bir kısmı sinir sistemine etki etmektedir. En sık kullanılan pestisitler olan organofosfatlar ve tarım dışı alanlarda da yaygın olarak kullanılan karbamatlar sinir uçlarını etkilemektedir. Karbamatların etkisi geçici ve kısa sürelidir. DDT ve lindan gibi organoklorlu bileşikler ise sinir hücresi membranında deformasyonlara sebep olması nedeniyle kalıcı zararlar vermektedir (Colosio vd 2003). Pestisitlerin sınıflandırılmasında sıklıkla kimyasal özellikleri ve etki mekanizmaları dikkate alınmaktadır. Sık olarak kullanılan bazı pestisitlerin kimyasal olarak sınıflandırılmaları Çizelge 2.1.’de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Sık olarak kullanılan pestisitlerin kimyasal sınıflandırılması (Weiss vd 2004)

Kimyasal Sınıflandırma	Örnek Pestisitler
Karbamatlar	Karbaril, Aldikarb, Maneb
Organoklorlu Bileşikler	DDT, Lindan, Klordan, Klordekon
Organofosfatlar	Paration, Malation, Diazinon, Klorprifos
Piretroitler	Deltametrin, Permetrin, Fenvalerat

2.2.1. Pestisitlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler

Pestisitler, kimyasal yapılarına göre organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı, pyretroid, azol ve üre grubu içeren pestisit grupları ve daha birçok benzer gruplar şeklinde sınıflandırılabilir. Değişik yapı grupları taşımalarından dolayı pestisitlerin kimyasal özellikleri de farklılık göstermektedir. Pestisitlerin kaynama noktaları, polariteleri, çözündükleri solventler ve çözünürlükleri, ısıya karşı dayanırlıkları gibi birçok kimyasal özelliklerinin değişkenlik göstermelerinden dolayı analiz yöntemleri de birbirlerinden farklılıklar göstermektedir (Cabras 2003).

Analizleri esnasında iki temel enstrümantal analiz yöntemi kullanılmaktadır. Polaritesi daha yüksek, uçucu özelliği olmayan pestisitler sıvı kromatografi temeli ile çalışan HPLC, LC-MS, LC-MS/MS, LC-TOF/MS vb. cihazlar ile analiz edilmektedir. Polaritesi düşük ve termal açıdan kararlı yani uçucu olan tüm diğer pestisitler ise gaz kromatografi temeli ile çalışan GC-MS/MS, GC-MSD, GC-FID, GC-ECD ve GC-NPD vb. cihazlar ile analiz edilmektedir (Vidal vd 2002, Anonymous 2007a, Sharma vd 2010).

Kalıntı analizlerinde analitlerin toksik olmaları nedeniyle tespit limitlerinin düşük olması hedeflenmektedir. Bu durumda kullanılan dedektörler önem arz etmektedir. Kütle analizörleri sahip oldukları yüksek teknolojileri sayesinde hassas dedektörler arasında yer almaktadır. Düşük miktardaki kalıntıların tespit edilmesi gereken analizlerde çoğunlukla kütle doğrulama tekniği ile çalışan kütle analizörleri tercih edilmektedir (Sharma vd 2010).

Kütle analizörleri farklı çalışma prensipleri ile çeşitlilik göstermektedir. Kuadrupol, uçuş zamanlı, iyon tuzağı, manyetik sektör, elektrostatik sektör gibi farklı kütle analizörleri bulunmaktadır. Bu farklı kütle analizörlerinin bir araya getirilerek kullanıldığı kütle spektrometrisi sistemlerine genel olarak tandem kütle spektrometresi denir. Kütle spektrometresinde yenilik ve gelişme sağlamaya yönelik son eğilimler, tek bir cihaz üzerinde doğruluk ve kesinliği artırmak ve çeşitli amaçlara yönelik kullanımı sağlamak için farklı analizörlerin birleştirilmesine olanak sağlayan tasarımların gerçekleştirilmesini hedeflemektedir. Sıralı kütle spektrometresinin özelliklerini arttırmak için, iyon tuzaklayıcı kuadrupol, üçlü kuadrupol ve uçuş zamanlı kuadrupol gibi her biri farklı özelliklere sahip kütle analizörlerinin birleştirildiği tasarımlar mevcuttur. Son yıllarda teknolojik gelişmelere bağlı olarak daha hassas kütle

detektörleri üretilmektedir. Yeni geliştirilen bu detektörlerin analiz becerilerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, kalıntıların tespiti için kullanılan etkili kütle analizörlerinden biri de tandem kütle spektrometreleridir. Tandem kütle spektrometreleri, farklı ürün gruplarından kaynaklanan matriks etkisinin azalmasını ve analite ait sinyalin sinyal/gürültü oranının artmasını sağlamaktadır. Böylece, temsili matrikslerle çizilen kalibrasyon eğrileri ile birbirinden farklı ürün gruplarının nicel analizi yapılabilmektedir. Bu avantajı sayesinde yanlış pozitif sonuçların bulunmasının önüne geçilmekte ve aynı zamanda analiz süresi kısalmaktadır. (Vidal vd 2002, Klein vd 2003, Mol vd 2003, Sharma vd 2010).

Sıralı kütle spektrometreleri çeşitli kütle analizlerinin kombinasyonu ile oluşturulan enstrümantal analiz dedektörleridir. Belli başlı olanları; Kuadrupol-İyon Tuzaklı sistemler (QIT), Üçlü Kuadrupol sistemler (QqQ) ve Kuadrupol-Uçuş Zamanlı sistemler (QqTOF) olarak sıralanabilmektedir (Anonymous 2007b).

Sıralı kütle spektrometreleri çeşitlerine göre bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. İyon tuzaklı kütle analizörü içeren sistemler; daha düşük tespit limitlerine ulaşabilmekte olup, toksik özellikleri daha yüksek olan kimyasalların tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Fakat analiz esnasında tespit edebileceği bileşiklerin sayısı sınırlıdır. Çünkü her bir analit için ayrı bir tuzaklama süresi gerekmektedir ve bu teknik gereksinim nedeniyle çoklu kalıntı analizlerinde kullanımı efektif değildir. Uçuş zamanlı kütle analizörü kullanılan sistemler, analizi yapılan bileşiğin gerçek kütlelerinin kesin doğrulukla tespit edilebilmesini sağlayabilen sistemlerdir. Kesin doğrulukla kütle taraması yapabilen bu sistemler, yüzlerce analitin kısa sürede tespit edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Ancak üstün tanımlama yeteneği daha çok moleküler tespit ve nitel analizler için idealdir. Analitler için elde edilen cihaz sinyal şiddetlerinin tekrarlanabilir olmaması ve değişiklik göstermesi nedeniyle nicel analizlerde pek tercih edilmez. Üçlü kuadrupol sistemleri ise eşzamanlı hızlı kütle tarama özelliklerine sahiptir. Aynı zaman dilimi içerisinde onlarca kütlenin takip edilebilmesine olanak sağlamakta olup, rutin analiz işlemleri için ideal çözüm ortağıdır. Üçlü kuadrupol sistemleri genel olarak 'MS/MS' terimi ile ifade edilmektedir. MS/MS kütle analizör sistemlerinin başlıca avantajları arasında, çok iyi nicel ölçüm yapma yeteneğine sahip olması, seçili reaksiyon izleme (SRM) modunda büyük bir hassasiyete sahip olması, aynı anda birden fazla iyon geçişini seçme imkânı gibi özellikleri öne çıkmaktadır (Anonymous 2007a, Soler vd 2007).

Oluşturduğu ilk iyonu seçici parçalanmaya uğratarak ikincil parçalanma ürünleri üzerinden belirleme yapma olanağı sağlayan üçlü kuadrupol sistemleri, seçicilik ve duyarlılığı arttırarak bu tekniği düşük kalıntı düzeyleri analizi için uygun hale getirmektedir (Zamora vd 2004). İkincil parçalanma ürünlerinin izlenmesi, tek aşamalı kuadrupol sistemi çalışma biçimine kıyasla daha iyi bir belirleme sağlamaktadır (Frenich vd 2004). 2000'li yılların başına kadar pestisit analizlerinde kullanılan çoklu kalıntı analiz yöntemleri 50-70 hedef bileşik ile sınırlıyken günümüzdeki yöntemlerle tek seferde 150'nin üzerinde hedef bileşik için tanımlama ve belirleme yapılabilmektedir. Pestisitlerin tanımlanmasında biri doğrulamayı sağlamak diğeri de miktarlarını belirlemek üzere iki SRM geçişi kullanılmaktadır. İki SRM geçişi için seçilen parçalanma iyonları veya ürün iyonlar öncelikle yüksek sinyal üretme özelliğine sahip olmalıdır. Ancak mümkün olan en iyi seçicilik ve tanımlamayı elde etmek için MS/MS

analizlerinde pestisitlerin karakteristik parçalanma davranışları hakkında daha önceden bilgi sahibi olunması gerekliliği vurgulanmaktadır (Niessen 2010). MS/MS sistemlerinde hedef bileşiklere ait iyonların belirlenmesi esnasında girişim unsurlarını da ortadan kaldıran üç adet kuadrupol ünitesi (QqQ) bulunmaktadır. İlk kuadrupol, kütle filtresi görevi yaparak sadece küçük bir kütle aralığındaki iyonları geçirmektedir. İkinci kuadrupol, seçilen iyonların ayrıldığı ve bu iyonları üçüncü kuadropole ileten çarpışma bölümü veya odacığdır. Ayrıca ikinci kuadrupol ünitesinde birinci kuadrupol ünitesinde seçilen iyonlar parçalanarak iyon parçacıkları da oluşturulabilmektedir. Üçüncü kuadrupol ise ikinci kuadrupolde oluşan iyon parçacıklarını filtrelemekte ve böylece ürün iyon spektrumu elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerde ilk kuadrupol ünitesi kütle filtresi olarak kullanıldığı için numune hazırlama aşamalarında temizleme (clean-up) işlemi yapılmasına her zaman gerek yoktur. Ancak karmaşık yapılı numunelerden elde edilen ekstraktlar, numune hazırlama aşamasında temizleme uygulanmadan MS/MS'e verildiğinde iyon oluşumu sürecine olumsuz etkileri bulunabilmektedir. Bu nedenle MS/MS analizlerinde numune hazırlama aşamasında uygun bir numune temizleme yönteminin kullanılması numune ekstraktından gelen ve sonuçları olumsuz etkileyen unsurların ortadan kaldırılmasında gerekli olmaktadır (Goto vd 2006).

Karmaşık yapılı numunelerin analizinde en önemli sorun, analit ya da analitlerin iyonizasyonunu önleyerek veya engelleyerek kesin ve doğru belirleme yapmayı güçleştiren girişim unsurlarının varlığıdır. Matriks etkisi adı verilen bu olay analit-numune kombinasyonuna bağlıdır. Matriks etkisini en aza indirmede; daha etkili ekstraksiyon ve temizleme basamakları içerecek şekilde numune hazırlama aşamalarını gözden geçirmek, değiştirmek veya düzeltmek ve matriks uyumlu kalibrasyon yapmak gibi farklı yaklaşımlar mevcuttur (Zamora vd 2004). Ancak bu ilave tekniklerin kullanılması ile analiz zamanının uzayacağı ve maliyetlerin artacağı da açıktır.

2.2.2. Literatürdeki önceki çalışmalar

Modern tarımın her geçen gün gelişmesi nedeniyle pestisitlerin yaygın olarak kullanılması, ekolojik çevrede ve gıda maddelerinde bu bileşiklerin kalıntı bırakmalarına neden olmaktadır. Bu kalıntıların canlılar üzerinde olumsuz etkiler gösterdiği yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Bu bileşiklere ait kalıntıların sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin anlaşılmasıyla birlikte, gıdalarda pestisit kalıntı analizlerinin yapılması önem kazanmıştır. Ticareti yapılan tarımsal ürünlerdeki pestisit kalıntılarının izlenmesiyle gıda güvenliğinin sağlanması, sorunsuz uluslararası ticaretin gerçekleştirilebilmesi açısından da oldukça önemlidir. Bu amaçla gıdalarda eser miktardaki pestisit kalıntılarının belirlenmesinde çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Teknolojinin ilerlemesine bağlı olarak daha hassas ölçüm yapabilen cihazların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Ancak kullanılan enstrümantal cihazlar kadar uygulanan ekstraksiyon yöntemleri de pestisit kalıntıların doğru bir şekilde tespit edilmesi ve miktarlarının belirlenebilmesi açısından üzerinde önemle durulması gereken bir konudur (Sharma vd 2010).

1960'lı yıllardan bu yana pek çok resmi ve özel laboratuvar, gıda ve çevre numunelerin, pestisit kalıntı analizleri yapılmaktadır. Kalıntı analizleri birtakım basamakları içeren özel analizlerdir. Çalışılan konsantrasyonların küçük olması, kalıntı

analizlerinin diğerlerinden ayrılmasına sebep olmaktadır. Pestisit kalıntı analizlerinin temelini, doğru ve başarılı olarak numunelerin ekstraksiyonu ve enstrümantal dedeksiyonu oluşturmaktadır. Pestisitlerin ekstraksiyonları, solvent ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, süper kritik akışkan ekstraksiyonu gibi metotlar ile kolorometrik ölçümler, biyo-assay ve enzimatik teknikler, radyokimyasal ve kromatografik yöntemler kullanılarak analizleri gerçekleştirilmektedir. Gelişmiş ülkelerin çevreye olan duyarlılığı ve insan sağlığını ön plana çıkarması ile pestisit kalıntı limitleri günden güne düşürülmeye çalışılmakta, bu da kalıntı analizlerinin daha hassas yapılması zorunluluğunu ortaya koymakta, araştırmacıların daha hassas ve duyarlı metotlar geliştirme çalışmalarını hızlandırmasına neden olmaktadır.

Pestisit analizleri için çeşitli numune hazırlama yöntemleri bulunmaktadır. Ancak her yöntem için belirlenen ilk basamak heterojen yapıdaki gıda örneğini parçalayıcı veya karıştırıcı aletlerle homojen hale getirerek örneklemeden gelen hatanın bertaraf edilmesini sağlamaktır. İkinci basamakta ise, uygun bir çözücü kullanılarak pestisit kalıntılarını matriksten başarılı bir şekilde ayırmaktır (Ahmed 2001).

Analitik çalışmalarda, pestisit kalıntıları için kullanılacak ekstraksiyon işleminin en iyi şekilde yapılabilmesi için farklı pestisit gruplarının sudaki çözünürlükleri ve polaritelerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Analizi yapılacak olan gıda matriksinin yağ içeriği de oldukça önemli olup, % 2'den fazla yağ içeriğine sahip gıdalar yağlı ürünler olarak kabul edilmektedir. Yağsız ürünlerde ise gıdanın içerdiği su miktarı önem kazanmaktadır. Su içeriğine göre gıdalar; yüksek ve orta düzeyde su içeren ve kuru ürünler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Ahmed 2001).

Meyve ve sebzelerde pestisit kalıntı analizleri; çözgen ekstraksiyonu, numune temizleme basamağı (clean-up) ve enstrümantal analiz olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (Marinas vd 2010). Çözgen ekstraksiyonu rutin analizlerde çok faydalı olmasına rağmen bu aşamanın analiz sırasında çok miktarda çözgen kullanımına sebebiyet verme gibi dezavantajı bulunmaktadır. Fazla çözgen kullanımı, yüksek miktarda organik atık oluşmasına neden olmakta ve aynı zamanda analizlerin süresini de uzatmaktadır (De Pinho vd 2010).

Pestisit analizi uygulamalarındaki en etkili yaklaşım, çoklu-kalıntı analiz yöntemlerini kullanmaktır. Bu amaçla farklı çözgen ve tuzların kullanıldığı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde çeşitli ekstraksiyon basamakları uygulanmaktadır (Anonymous 2005). Kayda değer ilk Çoklu Kalıntı Analiz Metodu, Mills vd (1963) tarafından geliştirilmiştir. Ancak bu metodun organik fosforlar gibi aşırı polar pestisitler için uygun olmaması nedeniyle 1970'lerde yeni metotlar geliştirilmiş, Luke vd (1975) orta polar pestisitlerin yüksek geri kazanımını sağladıkları metodu yayımlamışlardır. Luke metodu olarak bilinen bu metot; birçok pestisit grubunun analiz edilmesine imkan sağlayarak başarılı olması nedeniyle, Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (Association of Official Analytical Chemist-AOAC) tarafından 985.22 metot numarası ile resmi metot haline getirilmiştir. Günümüzde yaygın olarak birçok pestisit izleme laboratuvarı Luke Metodunu kullanmaktadır.

Analizlerde kullanılan pek çok metodun en büyük problemleri; uzun zaman alması, pahalılığı, nicel tayinin zorluğu, düşük tekrarlanabilirliğe sahip olması,

etkinliğinin az ve atığın fazla olmasıdır. Bu nedenle yeni yaklaşımlara gereksinim duyulmuştur. Bu yeni yaklaşımlardan beklenen ise doğruluk, hassasiyet, geniş kullanılabilme alanı, ucuz, kesin, hızlı ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Her ne kadar bilimsel literatürde yayımlanmış ve geçerlilik kazanmış çoklu kalıntı analiz metotları varsa da; bu metotların ülkesel olarak, ürün ve kullanılan pestisitler açısından değerlendirilmesi ve işlerlik kazandırılması gerekmektedir.

Luke vd (1981), 1975 yılında yayımlamış oldukları 31 pestisiti içeren yöntemi daha da geliştirerek, 79 pestisit analize olanak veren çoklu kalıntı analiz yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, farklı dolgulu kolon ve farklı dedektör kullanılarak, organik fosforlar, nitro bileşikler, halojenli pestisitlerin kalitatif ve kantitatif olarak tayini yapılmıştır.

Sentetik pretroitlerden permethrin, cypermethrin, cyhalothrin, bifentrin ve deltamethrin aktif maddeleri için meyve ve sebze örneklerinde GC/ECD ile Çoklu Kalıntı Analiz Metodu geliştirilmiş, numunelerin ekstraksiyonunda deaktive edilmiş florisil kolon kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır (Lenicek vd 1989).

Lindane, methoxychlor, parathion ethyl ve parathion methyl kalıntılarının sulardaki miktarlarının analizi GC-ECD ile yapılan bir çalışmada, Karbon18 (C18) kartuş kullanılarak etil asetat ile ekstraksiyon yapılmıştır. Hekzan ve metanol gibi çözücülerle kıyaslandığında etil asetat daha avantajlı bulunmuş ve analizlerde kullanılmıştır. Klasik yöntemle karşılaştırıldığında kartuş kullanımı ile daha hızlı ve ucuz metot geliştirildiği belirtilmiştir (Moltó vd 1989).

Yapılan bir çalışmada C18 ile ekstrakte edilen yeraltı sularında triazine ve organik fosforlu pestisitler aranmıştır. C18 kartuşundan etil asetat ile elute edilen pestisitlerin GC'de analizi yapılmış, dimethoate ve trichlorfon dışındaki çalışılan aktif maddelerin analizi için uygun olduğu ortaya konulmuştur (Moltó vd 1991).

Sütlerde pestisit kalıntı analizleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, öncelikle sütün yağını uzaklaştırmak için bir ajan kullanılmış, sonra da homojenize süt üzerinde metot değişkenleri optimize edilmeye çalışılmıştır. 26 organoklorlu pestisit kalıntısının analizi C18 kartuşu ve iki klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile denenmiştir. Bu çalışmada kartuş kullanılarak geliştirilen metodun, diğerlerine nazaran daha hızlı, basit ve ucuz, ayrıca saflaştırma işlemine gereksinim duymadan sütte kalıntı analizi için uygun olduğu belirtilmiştir (Mañes vd 1993).

Fillion ve Thorp (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, meyve ve sebzelerde birçok pestisit GC/MSD ile teşhis edilip izlenmiştir. Bu çalışmada, numunelerde bulunan pestisit kalıntılarının saptanması ve tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, basit bir numune hazırlama yöntemi geliştirilerek ekstraksiyon işleminde C18 ve Envirocarb katı faz ekstraksiyon kartuşları kullanılmış ve GC/MSD koşulları da belirlenip pek çok pestisit tek bir analizle izlenmiştir.

Meyve ve sebzelerde 199 pestisit kalıntısının tespiti için analiz metodunun geliştirildiği bir çalışmada, GC-MS ve LC-FLD cihazları kullanılmıştır. Pestisit kalıntıları asetonitril ile ekstrakte edildikten sonra aktif karbon kömürden hazırlanmış

kolondan geçirilerek analiz edilmiştir. Analizler GC-MS’de SIM modda gerçekleştirilmiştir. Tüm bileşenlerin analizi numunelerin, 2 kez enjekte edilmesi ile yapılmıştır. Alıkonma zamanları ve iyon oranları ile doğrulama yapılmıştır. Karbamatlı pestisitler kolon sonrası reaksiyon ile LC-FLD kullanılarak belirlenmiştir. Şeftali, havuç ve muz numunelerinin 0,1 ve 0,5 mg/kg konsantrasyonlarında zenginleştirilmesi ile geri kazanımlar elde edilmiştir. Çalışmada, LOD değerlerinin 0,02 ile 0,20 mg/kg arasında değiştiği belirtilmiştir (Fillion vd 1995).

Cochran vd (2002) tarafından yapılan bir çalışmada bazı meyve ve sebze numuneleri, asetone ile ekstrakte edildikten sonra süzölmüş ve temizleme işlemi için C18 kartuştan geçirilmiştir. Elde edilen ekstraktın solventi, azot gazı altında buharlaştırılmış ve asetonda çözölmüştür. Araştırmacıların GC/MS’de geliştirdikleri ve tekrarlanabilirliği yüksek Çoklu Kalıntı Analiz Metodu ile 13 dakika gibi kısa bir sürede 77 pestisit analizi yapılmıştır.

Laboratuvarlar için daha kullanışlı ve daha az çözügen harcamaya yönelik, süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), matriks katı faz ayrımı (MSPD), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve ticari olarak hızlandırılmış çözügen ekstraksiyonu (ASE) olarak da bilinen basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) gibi ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Kullanılan bu tekniklerin avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu tekniklerde kullanılan cihazlar kritik noktalarda arıza vermekte veya uygulamada kısıtlı kullanılmaktadır. Enstrümantal temelli, ardışık ekstraksiyon yapabilen PLE ve SFE teknikleri, analizi yapan kişi için fazla zaman alan işlem basamaklarını içermektedir. Bu teknikler ile çalışılması durumunda her kullanımdan sonra cihazın temizlenmesi gerekmektedir. Ayrıca cihaz ve bakım maliyetleri de yüksektir. SFE, MSPD ve SPME teknikleri, tek bir metot ile yeterince çok sayıda pestisit için araştırma yapmayı, MAE ve PLE teknikleri ise yeterli düzeyde hassasiyeti sağlayamamaktadır. Bunlarla birlikte söz konusu tekniklerin hepsinde çok az miktardaki numunelerle çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca bütün bu tekniklerin, belirli uygulamalar için kullanışlı olmakla birlikte, ideal bir çoklu-kalıntı analizi için yeterli derecede basit ve etkili olmadıkları belirtilmektedir (Anastassiades vd 2003).

Anastassiades vd (2002, 2003) tarafından yapılan çalışmalarda, eski çoklu kalıntı analiz metotlarında kullanılmış olan birçok parametre bir araya getirilmiş ve etkin bir numune hazırlama yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu yöntemle elde edilen numune ekstraktlarının hem GC’de hem de HPLC’de analiz edilebilmelerinin yöntemin diğer bir avantajını oluşturduğu belirtilmektedir. Çalışmalar sonucunda meyve ve sebzelerin çoklu-kalıntı ve çoklu-sınıf analizleri için “hızlı (quick), kolay (easy), ucuz (cheap), etkili (effective), sağlam (rugged) ve güvenli (safe)” kelimelerinin baş harflerinden oluşan QuEChERS yöntemi geliştirilmiştir. Bu teknikte, önce asetone ile tek fazlı bir ekstraksiyon gerçekleşmekte ve bunu susuz magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ve sodyum klorür ($NaCl$) ilavesi ile sıvı-sıvı ayırma takip etmektedir. Bu işlemlerden sonra dispersif katı faz ekstraksiyonu (dispersive-SPE) kullanılarak numune temizlenmektedir (Anastassiades vd 2003, Wilkowska ve Biziuk 2011). Dispersif katı faz ekstraksiyonu için susuz $MgSO_4$ ve primer sekonder amin (PSA) toz karışımları ile C18 ve aktif karbon kullanılmaktadır. $MgSO_4$ ortamdaki fazla suyu; PSA çeşitli polar organik asitleri, polar pigmentleri, bazı şekerleri ve yağ asitlerini; C18 lipit ve steroller ve aktif

karbon ise pigment ve sterollerin ekstrakta geçmelerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Anonymous 2012b).

Gıda matriksindeki pestisitlerin belirlenmesinde çoğunlukla aseton, etil asetat ve asetonitril gibi çözücüler kullanılmaktadır. Bu kimyasalların hepsi de analitlerin geri kazanımlarında büyük bir başarı sağlamaktadır (Anonymous 2005). Yapılan denemelerde meyve ve sebzelerde ekstraksiyon aşamasında asetonitril kullanmanın, aseton ve etil asetatla karşılaştırıldığında girişim sorunlarını azalttığı ve bu nedenle, QuEChERS yönteminde ekstraksiyon çözgeni olarak kullanılmasının daha uygun olduğu belirlenmiştir (Wilkowska ve Biziuk 2011).

Anastassiades vd (2003) tarafından ekstraksiyon verimini arttırmak için sodyum klorürün kullanıldığı çoklu-kalıntı analizleri için geliştirmiş olan QuEChERS yöntemi, orijinal yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak bazı spesifik türdeki pestisitler veya gıda maddeleri için geri kazanım çalışmalarında daha iyi sonuçlar alabilmek amacıyla orijinal yöntemde bazı değişikliklerin yapılması gerekmiştir. Bu nedenle laboratuvarlarda sodyum klorür yerine sodyum asetatın kullanıldığı AOAC 2007.01 resmi yöntemi ve AOAC metoduna benzeyen ancak sodyum asetat yerine sodyum klorür, sodyum sitrat dehidrat ve disodyum sitrat seskiahidratın kullanıldığı Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) Standart Metot EN 15662 yöntemi geliştirilmiştir (Lehotay vd 2010, Anonymous 2012b).

Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) teknikleri kullanılarak meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarını belirlemeye yönelik olarak yapılan bir çalışmada; orijinal QuEChERS, AOAC 2007.01 ve Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) Standart Metot EN 15662 numune hazırlama yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 32 pestisit kalıntısının geri kazanım çalışmalarında her iki kromatografik yöntem için de 0,05, 0,25 ve 1,00 µg/mL konsantrasyonları ve analiz matriksi olarak elma, yaban mersini sosu, bezelye ve ıhlamur örnekleri kullanılmıştır. Her üç yöntem için geri kazanım çalışmalarından genel olarak çok iyi sonuçlara ulaşılmış olmakla birlikte, orijinal QuEChERS yönteminde pH'ya bağlı olarak bazı pestisitler için düşük geri kazanımlar elde edilmiştir. AOAC 2007.01 yöntemi, diğer iki yöntemle kıyaslandığında ıhlamurda thiabendazole için ve bütün matrikslerde pymetrozine için daha yüksek ve daha tutarlı geri kazanım sonuçları sağlanmıştır. Bezelye örneğinde chlorothalonil, folpet veya tolylfluanid için üç yöntemde de tutarlı sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte, bu üç aktif madde için asetat tamponlu yöntemde daha iyi sonuç elde edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda, asetonitril kullanılan AOAC 2007.01 yönteminin diğer iki yöntemle göre daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir (Lehotay vd 2010).

2.3. Validasyon

Enstrümental analiz teknikleri, çok hassas ve dikkatli bir çalışma prosedürüne uymayı gerekli kılan tekniklerdir. Kullandığımız cihazların analitik performansları çeşitli etkenlerin sonucunda zamanla değişmektedir. Dolayısıyla gerekli bakım ve onarım göstermek, yıpranan parçalarını zamanında onarmak veya değiştirmek önemlidir. Ayrıca, kullandığımız cihazın analiz esnasındaki performansının yeterli olduğundan, numune hazırlama tekniğinden gelebilecek hata kaynaklarının önlediğinden, hatalı

sonuçlara yol açabilecek girişim etkilerinin (İnterferans) ve çeşitli bozucu etkilerin elimine edildiğinden, elde edilen sonuçların doğru hesaplandığından ve güvenilir olduğundan emin olunması gerekmektedir. Bütün bu gereklilikleri sağlayabilmek için validasyon çalışması yapmak en uygun yoldur (Anonymous 2011). Bunlara ek olarak validasyon çalışmalarının önemini artıran veya bir anlamda yapılmasını zorunlu kılan iki unsur daha göze çarpmaktadır. Bunlardan birincisi, topluma sağlıklı gıda sunmak için gıdaların besleyici ve sağlık açısından risk oluşturuıcı özelliklerinin belirlenmesidir. Diğer unsur ise uluslararası gıda maddeleri ticareti ile ilgilidir. Gıda güvenliğini tehdit eden risk unsurları açısından gıdaların sağlığa uygun olup olmadığını belirlemek doğal olarak çok zaman alan bir işlem olup, bu esnada gıdaların bekletilmesi, taşıma ve depolama maliyetlerini artıracaktır. Bu maliyetten kaçınmak için birbiri ile ticari ilişkiler içinde olan ülkeler gıda analizleri yapan laboratuvarlarını karşılıklı tanıma yoluna gitmişlerdir. Amaç gıdaların kaynak ülkede analizlerinin yapılması ve böylece gümrüklerde bekletilmeden tüketime sunulmasının sağlanmasıdır. Özellikle Avrupa Birliği Ülkeleri'nde bu konuda iyi işleyen bir sistem oluşturulmuştur. Sistemin temel özellikleri ortak donanımına sahip ve aynı analitik yöntemleri uygulayan laboratuvarlar oluşturmaktır. Donanım, personel ve uygulama açısından bir analiz laboratuvarının belirli standart kriterlere sahip olduğunu belgeleme akreditasyon olarak bilinmekte olup, bir analiz metodunun belirli standart kriterlere sahip olduğunu belgeleme işi ise geçerlilik olarak tanımlanmaktadır. Akredite olmuş ve geçerli kılınmış analitik yöntemlerle çalışan laboratuvarlar, tekrarlanabilir analiz sonuçları üreteceği için verilen analiz raporu da uluslararası anlaşmalar gereği kabul edilebilir nitelikte olmaktadır. Bu durum ise ticareti kolaylaştırıcı, hızlandırıcı ve maliyetleri düşürücü bir etki yapmaktadır (Weitzel vd 2007).

Geçerli kılma işlemi yani validasyon, metodun ilgili kalite performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metod parametrelerinin belirlenmesi ve incelenmesi ile yapılan bir geçerlilik çalışmasıdır. Bu çalışmalar bir laboratuvar (iç validasyon) veya birden fazla laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilmektedir. Kapsamlı validasyon, rutin analizlerde kullanım öncesi metod performans kriterlerinden tümünün veya belirli bir kısmının incelenip, dökümanite edilmesi anlamına gelirken; tam iç validasyon, metodun tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir. Doğrulama yani verifikasyon, laboratuvarlararası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir metodun laboratuvar şartlarında teyididir (Anonymous 2013).

2.3.1. Metod validasyonu

Weitzel vd (2007), analitik kimya alanında yapılan kimyasal analizleri 6 kategoriye ayırmaktadırlar. Böylece kullanılan ya da elde edilen metodlar daha kolay bir şekilde tanımlanabilmektedir. Bu sayede analitik metodların daha güvenilir şekilde nasıl çalıştırılabileceği ve hangi kriterlere göre kontrol edilebileceği uygulanabilir hale gelmektedir. Söz konusu kategoriler;

Kategori 1: Tanımlamayı doğrulayan metod, materyalin ne olduğunu veya hedef analitin tespitini sağlamaktadır.

Kategori 2: Düşük konsantrasyonlarda analitin miktarını belirlemektedir.

Kategori 3: Analitin tespit edilebilen en düşük konsantrasyonun altında veya üstünde olup olmadığının belirlenmesini sağlamaktadır (genellikle limit test olarak adlandırılır). Tespit edilen konsantrasyon, tayin limiti (LOQ) değerine yakın bir değerdir.

Kategori 4: Yüksek konsantrasyona sahip analiti belirlemektedir.

Kategori 5: Analitin tespit edilebilen yüksek konsantrasyonun altında veya üstünde olup olmadığının belirlenmesini sağlamaktadır ve genellikle limit test olarak adlandırılmaktadır. Tespit edilen konsantrasyon, tayin limiti (LOQ) değerinin oldukça üstünde bir değerdir.

Kategori 6: Nitel analiz testi olarak açıklanmaktadır.

Bu analiz kategorilere göre önerilen ve yapılması istenen validasyon parametreleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir. Aynı şekilde Eurachem (Anonymous 2012a), NMKL (Anonymous 2011) vb. diğer birçok kaynakta metot validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri, doğruluk, kesinlik, spesifiklik, tespit limiti, tayin limiti, sağlamlık, doğrusalık ve ölçüm aralığı olmak üzere sekiz ana parametreden oluşmaktadır.

Çizelge 2.2. AOAC rehberinde önerilen metot validasyonu parametreleri (Weitzel vd 2007)

Performans karakteristiği	Kategori 1	Kategori 2	Kategori 3	Kategori 4	Kategori 5	Kategori 6
1- Doğruluk	H	E	H	E	E	H
2- Kesinlik	H	E	H	E	E	H
3- Spesifiklik	E	E	E	E	E	E
4- Tespit limiti - (LOD)	H	E	E	E/H	H	H
5- Tayin limiti - (LOQ)	H	E	H	E/H	H	H
6- Sağlamlık	H	E	H	E	H	H
7- Doğrusallık	H	E	H	E	H	H
8- Ölçüm Aralığı	H	E	H	E	H	H

H=Hayır (Yapılması gerekli değil) E=Evet (Yapılması gerekli)

2.3.2. Metot ölçüm belirsizliği

Analitik kimya çalışmalarında ve yapılan tüm analizlerde, analiz sonuçlarının güvenilirliği kalite güvence ve kalite kontrol çalışmaları ile ispatlanmalıdır. Yapılan bu çalışmaların en önemlilerinden biri, laboratuvaradaki uygulamalardan kaynaklanan ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasıdır.

“Uluslararası Standart Organizasyonu (ISO) 17025”, “ISO ölçüm Belirsizliği Açıklama Kılavuzu (GUM)” ve “EUREACHEM/CITAC Guide CG4” gibi uluslararası

dokümanlar rehber olarak kullanılmış ve elde edilen yeni metodun ölçüm belirsizliği her bir analit için tek tek hesaplanmıştır. Analitik çalışmalarda yapılan ölçümler her zaman doğru ve kesin değerler değildir. Bu nedenle ölçümlerdeki belirsizliklerin rakamsal olarak ifade edilmesi gereklidir. Ölçüm belirsizliği bir ölçümün gerçek değer ile ilgili olası dalgalanmaları tanımlayan istatistiksel yaklaşımdır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Kalıntı analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında matriks olarak kullanılacak olan meyve ve sebze örneklerinin pestisit kalıntısı içermemesi önemli olduğu için, organik ürün sertifikalı bu ürünler Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne ait uygulama seralarından ve organik üretim yapan çiftçilerden temin edilmiştir. Metot validasyonu çalışmaları ve cihaz parametrelerinin belirlenmesi esnasında domates matriksi kullanılmıştır.

3.2. Gerekli Kimyasallar ve Alet Ekipmanlar

3.2.1. Numune ön hazırlık ekipmanları

Numune parçalayıcı

Plastik (PoliPropilen) şahit numune kapları

Buzdolabı: 4 °C (SRR-23FD-MED, Sanyo, Osaka, Japonya)

Derin Dondurucu: -18 °C (MDF-U536D, Sanyo, Osaka, Japonya)

Bıçak: Paslanmaz çelik, çeşitli büyüklüklerde

3.2.2. QuEChERS numune hazırlık malzemeleri

Analitik Terazisi: 0,1 mg hassasiyetli

Balo joje: A Class, 10-100 mL hacimlerde

Mezür: A Class, 100-500-1000 mL hacimlerde

Çözelti Saklama Şişesi: Kapaklı, cam 30 mL, 100 mL ve farklı ebatlarda

Beher: 10-100-500-1000 mL hacimlerde

Santrifüj Tüpü: 15-50 mL'lik, kapaklı ölçeklendirilmiş Santrifüj Tüpü: 15-50 mL'lik Cam, teflon kapaklı

Cam Huni

Otomatik Pipet: 1-10 mL, 100-1000 µL, 20-200µL, 10-100 µL

Otomatik Pipet Ucu: 0,1-10 µL, 2-200 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL, 0,5 – 5 mL

Dispenser: 5-25 mL

Santrifüj Aleti: 4000 devir/dakikada çalışabilen (Eppendorf, 5810R, Hamburg, Almanya)

Vorteks (VWR, 20W, Radnor, USA)

Mikser (Waring, 8011 EB, Torrington, USA)

3.2.3. Kimyasal malzemeler ve çözeltiler

Asetonitril (MeCN); en az HPLC saflıkta

HPLC saflıkta susuz Asetik asit (HAc)

%1' lik HAc içeren MeCN (v/v) (örneğin 10 mL HAc / 1 L MeCN)

Toz halinde susuz MgSO₄ (>%98 saflıkta)

PSA sorbent (Pirimer Sekonder Aminler), 40 µm parçacık boyutunda

HPLC saflıkta Toluen

HPLC saflıkta Aseton

HPLC saflıkta susuz Asetik asit (HAc)

Pestisit referans standartları: Çizelge 1’de verilen bileşiklere ait

Pestisit referans standart stok çözeltileri (1000-2000 mg/mL): Kristal veya sıvı haldeki pestisit referans standarttan 10-20 mg’lık tartımlar 10 mL’lik balon jojelere ayrı ayrı alınmıştır. Her bir balon joje hacmi, metanol ile 10 mL’ye tamamlanmış ve -18 °C’de depolanmıştır. Tartım alınan standart malzeme saflığı dikkate alınarak stok çözeltinin analit içeriği düzeltilmiştir.

İç referans standart (ISTD) stok çözeltisi (1000 mg/mL): 10 mg Diethatyl-ethyl, 0,01 mg hassasiyetle 10 mL’lik balon jojeye tartılmıştır. Balon joje hacmi, metanol ile 10 mL’ye tamamlandıktan sonra -18 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

Pestisit karışım standart çalışma çözeltisi (5 mg/mL): İçerisinde 10 mL metanol bulunan 100 mL balon jojeye oda sıcaklığında her bir pestisit referans standarttan 5 mg/mL olacak şekilde tekli standart çözeltilerinden eklendikten sonra 100 mL’ye MeOH ile tamamlanmış olup -18 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

ISTD çalışma çözeltisi (5 mg/mL): 10 mL’lik balon joje içerisine oda sıcaklığında bulunan ISTD stok çözeltisinden 50 µL eklendikten sonra metanol ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra teflon kapaklı koyu renkli cam vial içerisine alınmış ve -18 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

Kalibrasyon standart çözeltileri: Kalibrasyon standart çözeltisi olarak pestisit karışım standart çalışma çözeltisi (5 mg/mL) kullanılmıştır. Bu çözeltiden ulaşılmak istenen geri kazanım konsantrasyonuna göre kör numune (blank) üzerine eklemeler (spike) yapılmıştır. Çözeltiler teflon kapaklı koyu renkli cam viallere alındıktan sonra -18 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

3.3. Metot

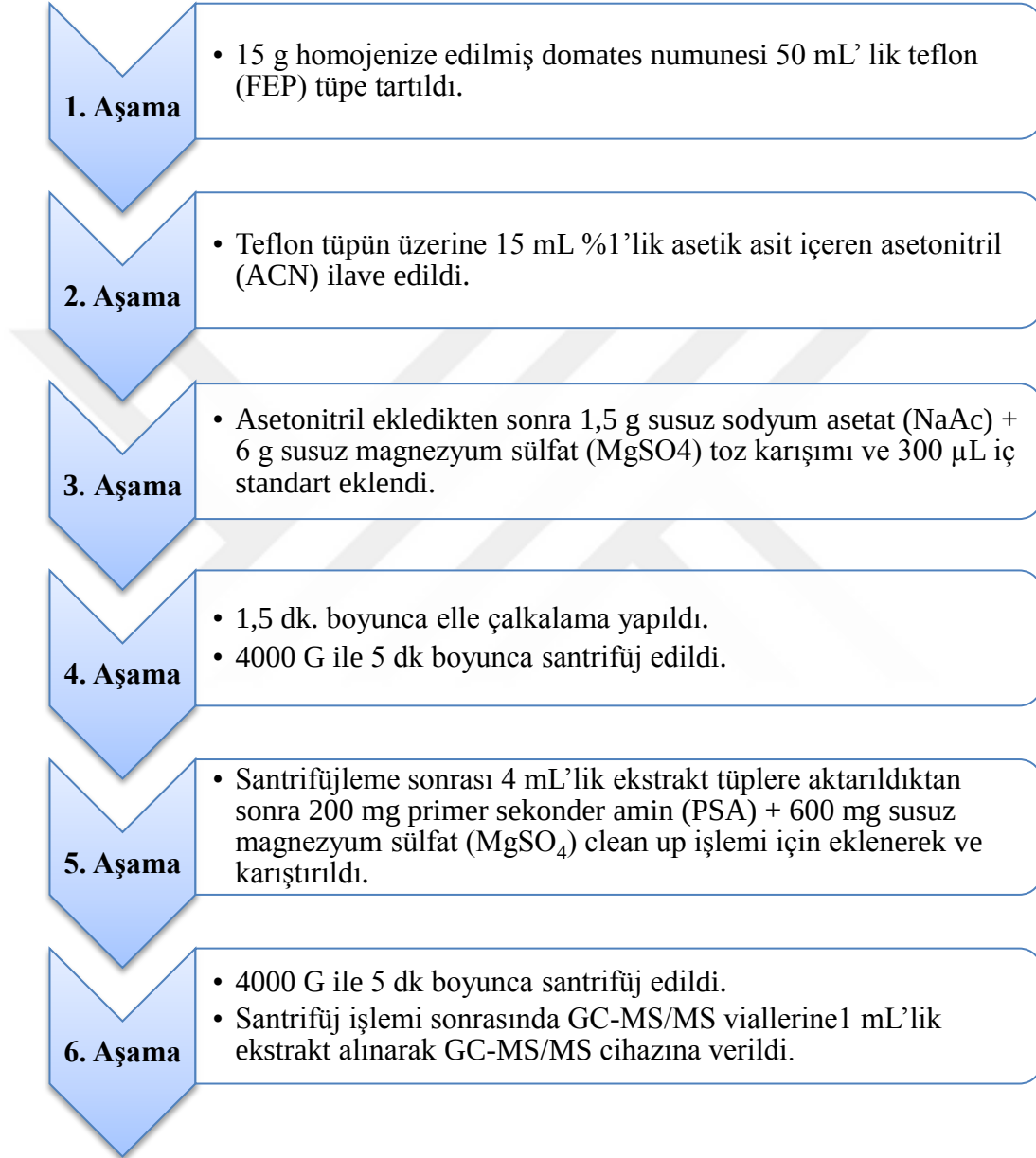
Domates örnekleri QuEChERS yöntemi takip edilerek analiz edilmiştir (Anastassiades vd 2003).

3.3.1. QuEChERS yöntemi ile numune hazırlama

Domates örneklerinin QuEChERS yöntemi ile numune ön hazırlık işlemleri yapılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekstrakte edilen numunelerde GC-MS/MS ile analizler gerçekleştirilmiştir (Frenich vd 2004, Lehotay 2007). Numuneler >1 kg olacak şekilde alınıp bir parçalayıcı yardımıyla parçalandıktan sonra yaklaşık 200 g numune karıştırıcı ile homojenize edilerek iyi bir örnekleme yapılması hedeflenmiştir. Ekstraksiyon çözgeni olarak asetonitril kullanılmış ve yapılmış olan ekstraksiyonun kalitesi iç standart olarak Diethathyl-ethyl (ISTD) kullanılarak kontrol altına alınmıştır. Şekil 3.1.’de QuEChERS yöntemine göre hazırlama işlemleri basamaklar halinde sırası ile gösterilmiştir.

Domates örnekleri aynı gün içerisinde analiz edilmediyse +4 °C’de depolanmıştır. Numuneye yapılan ilk işlem olan homojenize etme işleminde, analiz için gelen domates örnekleri öğütücü ile öğütülmüştür. Homojenizasyon aşamasından sonra

her numuneden bir miktar şahit numune alınarak -18 °C’de tekrarlanabilirlik, paralel çalışma ve tekrar üretilebilirlik gibi çalışmaların yapılabilmesi amacıyla depolanmıştır. Depolanacak numune yaklaşık 100 g olacak miktarda polipropilen veya polietilen malzemeden yapılmış kapaklı ambalajlara konulmuştur. Sonra kabın kapağı kapatılıp ve gerektiğinde tekrar analiz edilmek üzere depolanmıştır.



Şekil 3.1. QuEChERS yöntemi ile numune hazırlama basamakları (Lehotay 2007)

15 g homojenize edilen domates numunesi 0,5 mg hassasiyetle 50 mL’lik teflon kapaklı santrifüj tüpüne tartılmıştır. 5 farklı konsantrasyonda matris uyumlu kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere 15 g kör numune de 0,5 mg hassasiyetle 50 mL’lik teflon kapaklı santrifüj tüpüne tartılmıştır. Kalite Kontrol (QC)

amacıyla spike yapılmış numune olarak kullanmak üzere 15 g kör numune başka bir tüpe tekrar tartılarak üzerine 300 µL 5 mg/mL konsantrasyonda olan pestisit karışım standart çalışma çözeltisinden otomatik pipet yardımıyla ilave edilmiştir. Numune tartılmış olan santrifüj tüplerine 15 mL % 1 glacial HAc içeren MeCN çözgeni dispenser yardımıyla ilave edilmiştir. Analizi yapılacak numuneye ve kalite kontrol amaçlı pestisit standardı spike yapılmış olan numuneye 300 µL ISTD çalışma çözeltisi otomatik pipet yardımıyla eklenmiştir. Bu işlem sayesinde her numune teorik olarak 100 ng/g ISTD içermektedir. Burada matriks uyumlu kalibrasyon eğrilerinde kullanılmak üzere hazırlanan kör numunelere ISTD çözeltisi eklenmemiştir. ISTD kalibrasyon noktalarına viallerin hazırlanması esnasında eklenmiştir. Daha sonra her bir santrifüj tüpüne 6 g susuz MgSO₄ ve 1,5 g susuz NaAc tüpün çeperlerinde kalmamalarına dikkat edilerek bir cam huni yardımıyla eklenmiş ve santrifüj tüpünün kapağı sıkıca kapatılmıştır. Bir ele 3-5 santrifüj tüpü sıgacak şekilde alınarak ve elin dirsekten omuz hizasına doğru hareket ettirilmesi ile 90 saniye boyunca şiddetli bir şekilde çalkalanmıştır. Çalkalama esnasında ekstrakt sıcaklığı 40-45 °C'ye yükselmiştir. Çözgenin tüm numune ile etkileştiğinden emin olunmuş ve çalkalama sırasında kristal haldeki kümeleşmenin etkili bir şekilde parçalandığı kontrol edilmiştir. Tüpler santrifüj aletine yerleştirilerek 5 dakika süreyle 4000 G hızda santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmından 5 ml MeCN çözgeni dikkatlice otomatik pipet yardımıyla içerisinde 200 mg PSA ve 600 mg susuz MgSO₄ içeren bir başka 50 mL'lik teflon kapaklı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpünün kapağı sıkıca kapatılmış ve 90 saniye süreyle çalkalanmıştır. Sonra 4000 G hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen nihai ekstraksiyon çözeltisinden 1000 µL alınarak 2 mL hacimli viallere aktarılmıştır. Homojenizasyon için vialler kapatılıp vortekslenmiştir. GC-MS/MS için hazırlanan vialler otomatik örnekleyiciye yerleştirilerek analize hazır hale getirilmiştir.

QuEChERS yöntemi minimum %80 su içeren matrikslerin analizleri için geliştirilen bir metottur. MgSO₄ kimyasalı birçok kimya ve gıda sektöründe kurutma ajanı olarak kullanılmaktadır. 6 g susuz MgSO₄ yaklaşık 12 g suyu kurutma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle metodun iyi çalışabilmesi için analizi yapılan numunelerde bu su oranı gözetilmiştir. Çizelge 3.1. kullanılarak numunelerin su oranı ayarlanmıştır (Lehotay 2007).

Çizelge 3.1. Bazı numune türleri için numune miktarı ve su ilavesi (Lehotay 2007)

Numune türü	Ağırlığı	Eklenecek Su Miktarı	Açıklamalar
Meyve ve sebzeler >80% su içeren	15 g	-	-
Meyve ve sebzeler 25-80% su içeren	15 g	X g	X= 15 g – 15 g numunedeki su miktarı
Tahıllar	3 g	12 g	-
Kurutulmuş meyveler	3 g	12 g	Parçalama basamağı esnasında su eklenebilmektedir. 12,5 g homojen edilmiş numune analiz için kullanılmaktadır.
Bal	7,5 g	7,5 g	-
Baharatlar	3 g	12 g	-

3.3.2. GC-MS/MS cihazı analiz bilgileri

Gaz kromatografi uyumlu pestisitlerin tespiti ve analizleri Thermo Scientific Trace GC Ultra, Thermo Scientific TSQ Quantum XLS (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik değerlendirmeler Xcalibur yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kromatografik ayırım sağlamak amacıyla analitik kolon olarak Thermo Scientific TRACE™ TR-5MS (5% Phenyl polysilphenylene-siloxane) (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) kapiler gaz kromatografi kolonları kullanılmıştır. QuEChERS metodu ile ön hazırlıkları yapılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilen numuneler GC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

Farklı GC fırın sıcaklık programı denemeleri yapılarak en uygun kromatografik ayırım sağlanmış ve bu sayede her bir pestisit için farklı alıkönma süreleri tespit

edilmiştir. Bu ayırım, özellikle izomerleri olan, ancak maksimum kalıntı limitleri birbirinden farklı olan pestisitler (cypermethrin izomerleri, HCH izomerleri, cyhalothrin izomerleri vb.) için de sağlanmıştır. Kapiler kolon ve uygun fırın sıcaklık programı kombinasyonu sayesinde kromatografik olarak ayırımları sağlanan gaz kromatografi uyumlu pestisitlerin sıralı şekilde dedektöre gönderilmesi sağlanmıştır. Dedektörde ilk olarak iyon kaynağına giriş yapan pestisitler elektron bombardımanı (EI) sayesinde iyon parçacıklarına ayrılmaktadır. İyonlaşma anında negatif ve pozitif iyonlar aynı anda oluşmaktadır. Her bir pestisit için ilk iyonlaşmadan (EI) elde edilen responsu yüksek parçalanma iyonları tespit edilmiş ve elde edilen bu iyonlardan hangilerinin çarpıştırma bölgesi olan kuadropol2'ye yönlendirilerek hangi kütle filtrelerinin oluşturulacağına karar verilmiştir. İkinci fragmentasyonda oluşacak iyon parçacıklarını maksimize etmek için uygulanması gereken en uygun voltaj gerilimleri ve çarpıştırma gazı olarak argon gazı akış miktarı belirlenmiştir. Bu sayede her bir pestisit için spesifik ürün iyon spektrumu elde edilmesi sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra konsantrasyonları bilinen gaz kromatografi uyumlu pestisitlerin saf standartları analiz edilerek cihazdan elde edilen veriler ile numunelerin analizi sonucu cihazdan elde edilen pestisitlere ait veriler kıyaslanarak nicel sonuçlara ulaşılmaya çalışılmıştır.

3.3.3. GC-MS/MS cihaz özellikleri

GC-MS/MS Sistemi aşağıdaki parçaların kombinasyonu ile oluşturulmuştur,
-Thermo TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole MS/MS dedektör,
-PTV (Programmable Temperature and Vaporization) inlet, sıcaklık ve buharlaşma kontrollü GC inlet,
- Multi-baffled liner, çok bölmeli inlet girişi
-Triplus Autoinjector otomatik örnekleyici,
-Thermo Scientific HP-5MS (15 m × 0.25 mm × 0.25 µm) analitik kapiler kolon,
-Restek Capillary Grade Hydrocarbon Trap Helyum gazı saflaştırma tüpü,

3.3.4. Matriks uyumlu kalibrasyon standartları hazırlanması

Matriks uyumlu kalibrasyon eğrisinde konsantrasyonlar 0, 10, 20, 50, 100, 200 ng/g olarak kullanılmıştır. Matriks uyumlu kalibrasyon standartları hazırlanması prosedürü aşağıdaki gibidir:

Temiz bir kör numune (iç standart eklenmeden), numune gibi çalışılarak kör numune ekstrakt elde edilmiştir. Bu hazırlanan ekstrakttan vialde 900'er µL eklenmiştir. Daha sonra üzerine vialde 10, 20, 50, 100, 200 ng/g olacak şekilde 5 mg/L'lik kalibrasyon standart çözeltilerinden eklenip 1000 µL'ye tamamlanmıştır.

3.3.5. Geri kazanım (recovery)

Geri kazanım, kör numune üzerine miktar tayini için belirli bir konsantrasyonda analitlerin eklenmesiyle uygulanmıştır. Zenginleştirilmiş numune, kör numune ve analiz edilen numuneler ile aynı analiz serisinde aynı şekilde analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları ile LOD, LOQ ve tekrarlanabilirlik hesaplamaları yapılmıştır.

3.3.6. Enjeksiyon sırası

Enjeksiyona başlamadan önce cihazdan tune alınmıştır. Cihazdaki uygulama aşağıdaki enjeksiyon sırası takip edilerek yapılmıştır. Bu analiz sırası her 10 numuneden sonra tekrar edilmiştir.

- Kör numune
- Kör numuneye eklenmiş standart (tespit limiti seviyesinde, hassasiyet kontrolü için)
- Kör numuneye eklenmiş standart (kalibrasyon için kullanılacak)
- Geri kazanım (tespit limitinin 10 katı seviyesinde)
- Çözgen enjeksiyonu (Aseton veya toluen, kontaminasyonun önlenmesi amacıyla)
- Maximum 10 numune enjeksiyonu
- Matrikse eklenmiş standart (tespit limitinin 10 katı seviyesinde, tek nokta kalibrasyon için kullanılmıştır)
- Çözgen enjeksiyonu (Aseton veya toluen, kontaminasyonun önlenmesi amacıyla)
- Maximum 10 numune enjeksiyonu
- Sequence bitiminde geri kazanım enjeksiyonu (tespit limitinin 5 katı seviyesinde)

3.3.7. İstatistiksel değerlendirme

Analizlerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde % geri kazanım değerleri, standart sapma değerleri, bağıl standart sapma değerleri ve kullanılan kalibrasyon eğrilerine ait regrasyon hesaplamaları yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen metot, 5 ana çalışma konusu takip edilerek geliştirilmiştir;

1- Bu çalışmada analizi yapılması planlanan pestisitlerin belirlenmesi ve bu pestisitlerin tümünü içeren belirli bir konsantrasyonda pestisit karışımının (multi-standart miks) hazırlanması.

2- GC Fırın Programının Oluşturulması: GC fırın programı en optimum şekilde geliştirilerek istenen kromatografik ayırımın gerçekleştirilmesi ve tüm pestisitlere ve bazı pestisitlerin metabolitlerine ait alıkonulma sürelerinin (RT: Retention Time) belirlenmesi.

3- Her bir pestisit için ilk iyonlaşmadan (EI) elde edilen responsu yüksek fragmentasyon iyonları tespit edilmesi ve elde edilen bu iyonlardan hangilerinin çarpıştırma (collision) bölgesine (kuadropol2) gönderilerek hangi kütle filtrelerinin oluşturulacağına karar verilmesi. İkinci fragmentasyonda oluşacak iyon parçacıklarını maksimize etmek için uygulanması gereken en uygun voltaj gerilimleri ve çarpıştırma gazı olarak argon gazı akış miktarı belirlenmesi ve elde edilen SRM (Selected Reaction Monitoring) geçişleri ile tarama segmentlerinin oluşturulması.

4- Son olarak geliştirilen ve elde edilen nihai metodun validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi.

5- Analizi yapılan tüm pestisitler için ölçüm belirsizliği hesaplamalarının yapılması.

Bu çalışmada kullanılan Thermo Trace GC Ultra-Quantum XLS MS/MS tandem kütle spektrometresi cihaz kombinasyonu Şekil 4.1.'de görülmektedir.



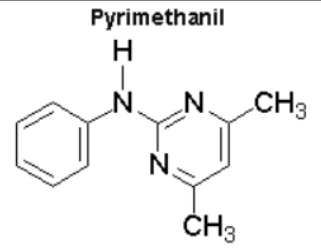
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan GC-MS/MS cihazı

4.1. Analizi Yapılması Planlanan Pestisitlerin Belirlenmesi ve Multi-Standart Karışımın Hazırlanması

T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından, küresel ortak pazarda olmamızdan dolayı Türk Gıda Kodeksi'nde belirlenen maksimum pestisit kalıntı limitlerinin Avrupa Birliği (AB) limitleri ile eşleştirilmesi kararı alınmış ve bu düzenlemeler ile ilgili gerekli çalışmalar yapılmıştır (Anonim 2014). Böylece geliştirmek istediğimiz metodun hem AB, hem de ülkemizde kabul gören bir metot olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle analizi yapılması planlanan pestisitlerin AB ve Türk Gıda Kodeksi'nden seçilmesi gerekliliği doğmuştur. Çalışılacak pestisitlerin belirlenebilmesi için kapsamlı bir literatür taraması yapılmıştır. Öncelikle hangi pestisitlerin gaz kromatografi tekniği ile analizinin mümkün olduğu belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi'nde yer alan pestisitlerden yaklaşık 360 tanesinin gaz kromatografi analiz tekniği ile tespit edilebileceği belirlenmiştir (Anonymous 2009a, Anonymous 2012c). Kaynak bilgi çalışması ile ilgili bir örnek Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Yapılan piyasa araştırmaları ve Antalya ilindeki resmi analiz laboratuvarları ile yüz yüze görüşmeler sonucunda 295 adet pestisite ait sertifikalı referans standart maddeler temin edilmiştir. 10 mL'lik A class balon jojelere hassas terazi yardımıyla 10-20 mg aralığında 0,01 mg hassasiyet ile tartımlar yapılmış ve metanol ile 10 mL hacme tamamlanmıştır. Sonuçta 1000-2000 mg/kg konsantrasyon aralığına sahip tekli stok standart çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan bu tekli stok standart çözeltiler ile 100 mL hacimli A class balon jojeye 5 mg/kg konsantrasyona sahip multi-standart miks hazırlanmıştır. Otomatik pipet yardımıyla her bir pestisit stok standart çözeltisinden konsantrasyonlarına bağlı olarak gerekli miktarlarda alınarak 100 mL'lik balon jojeye konulmuş ve nihai hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylece GC-MS/MS ile analizlerin gerçekleştirilebileceği multi standart pestisit miksi hazırlanmıştır.

http://www.crl-pesticides-datapool.eu/asp/en/stoffld.aspx	
Last updated: 4/12/2012	PYRIMETHANIL
Physicochemical Data	
Molecular Formula	C ₁₂ H ₁₃ N ₃
Molecular Weight / Monoisotopic Mass	199,3 / 199,1
Water Solubility [mg/L] / pKow	121 (25°C; pH 6,1) [20] / 3 (no pH-dependence) [20]
Vapour Pressure [Pa]	0,0011 (20°C) [20]
pKa1; pKa2; pKa3 / Acid-Base Property	3,52 [20]
General Analytical Information GC Behavior LC Behavior Regulatory EU PT Toxicological Data	
Translations Close	
GC Behavior	
GC-amenable	Yes Remark
GC-Decomposition	0 GC-Decomposition Products
Matrix Effects	No Data Tailing ++



Şekil 4.2. Pyrimethanil pestisiti ile ilgili genel bilgiler

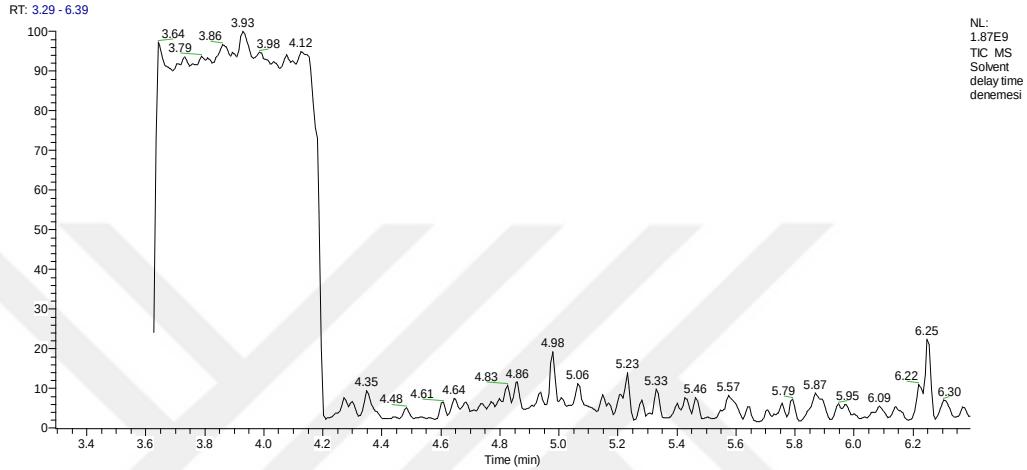
Şekil 4.2’de görüldüğü gibi bir pestisit bilgi havuzu olarak kullanılan ve interaktif olarak hizmet veren “crl-pesticides-datapool.eu” internet sitesinde pyrimethanil pestisitine ait gerekli tüm ön bilgiler mevcut olup, gaz kromatografi tekniği ile analizinin mümkün olduğu, kimyasal yapısı, molekül ağırlığı gibi birçok bilgiye ulaşılabilmektedir (Anonymous 2012c).

4.2. GC Fırın ve İnlet Programının Oluşturulması ve Pestisitlere Ait Alıkönülme Sürelerinin Belirlenmesi

Fırın ve inlet programlarının analitlere uygun olarak oluşturulması ve optimum değerlerin belirlenmesi önemlidir. Geliştirilen metodun fırın programı, 90 °C’den başlatılmış ve her bir analiz esnasında hem matriks bileşenlerinin ve hem de analizi yapılan pestisitlerin 300 °C’ye çıkarılan fırın sıcaklığı ile analitik kolondan yeterli elüsyonu başarılı şekilde sağlanmıştır. Asetonitrilin kaynama noktası 81,3 °C olması nedeniyle inlet başlangıç sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon sonrası inlete iletilen numune, sıvı halde liner içerisinde 50 °C sıcaklıkta 0,67 dakika bekletilmiştir. Bu süre içerisinde inlette bekleyen ve ekstraksiyon solventi olarak kullanılan asetone nitrile nazaran daha apolar olan pestisitler inaktive edilen multi-baffled liner çeperlerine sıkıca tutunmuştur. Bu esnada inlet içerisinden 20 mL/dk. hızla 30 saniye boyunca mobil faz helyum gazı split flow modu ile akıtılarak asetone nitril solventinin çoğunluğunun ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. 30 saniye sonra split akış vanası analitlerin kolona gönderilmesi amacıyla 2 dakika boyunca kapalı tutulmuş ve bir sonraki analize kadar temizlenebilmesi amacıyla tekrar açılmıştır. Bu sırada inlet sıcaklığı ise 0,67 dakika 50 °C sıcaklıkta bekletildikten sonra, 10 °C/saniye hızla 300 °C’ye artırıldığı için liner içerisinde sıvı halde bekleyen tüm analitler ve ekstraksiyon solventi olan asetone nitril geri kalanı buharlaşarak mobil faz helyum gazı akışı sayesinde kolona taşınmıştır. İnlet 5 dakika boyunca 300 °C’de sabit tutulmuştur. Analiz başlangıcında fırın sıcaklığı 90 °C sabit sıcaklıkta 2 dakika boyunca bekletildiği için buharlaşan tüm analitler tekrar yoğunlaşarak sıvı hale geçmeleri sağlanmıştır. Fırın sıcaklığı yükseldikçe kaynama noktası sıcaklığı gelen analitler birer birer tekrar buharlaştırılarak helyum gazı vasıtasıyla dedektöre doğru taşınmıştır. Doğal olarak kaynama noktası düşük olan asetone nitril analitlerden kolayca ayrışması sağlanmıştır. Analiz süresinin kısaltılması ve analitlerin bir an önce dedektöre ulaşması amacıyla oluşturulan ilk ısı rampası ile 60 °C/dk. artışla 150 °C’ye ulaştırılmış ve daha sonra da sıcaklık artışı yavaşlatılarak 15 °C/dk. artışla 180 °C’ye getirilmiştir. Bir sonraki basamakta fırın sıcaklığı 20 °C/dk. artışla 200 °C’ye ulaştırılmıştır. Fırın sıcaklık artışı azaltılarak önce 10 °C/dk artışla 220 °C’ye ve daha sonra da 5 °C/dk. artışla 240 °C’ye getirilmiştir. Böylece kaynama noktaları birbirlerine çok yakın olan pestisitlerin kontrollü bir şekilde birbirlerinden ayrışması sağlanmış ve fırın sıcaklığının bu bölgede yavaş yavaş artırılması sayesinde aynı anda bir çok pestisit in dedektöre ulaşmasının önüne geçilmiştir. Daha sonra kontrollü bir şekilde 10 °C/dk. artışla önce 270 °C’ye ve nihayet 10 °C/dk. artışla 300 °C sıcaklığa ulaşılmıştır. Böylece birçok pestisit in başarılı bir şekilde kromatografik ayırımı sağlanarak dedektöre ulaşmaları sağlanmış ve aynı zamanda alıkönme süresi (RT) olarak daha erken gelmeleri sayesinde analiz süresinde avantaj sağlamıştır.

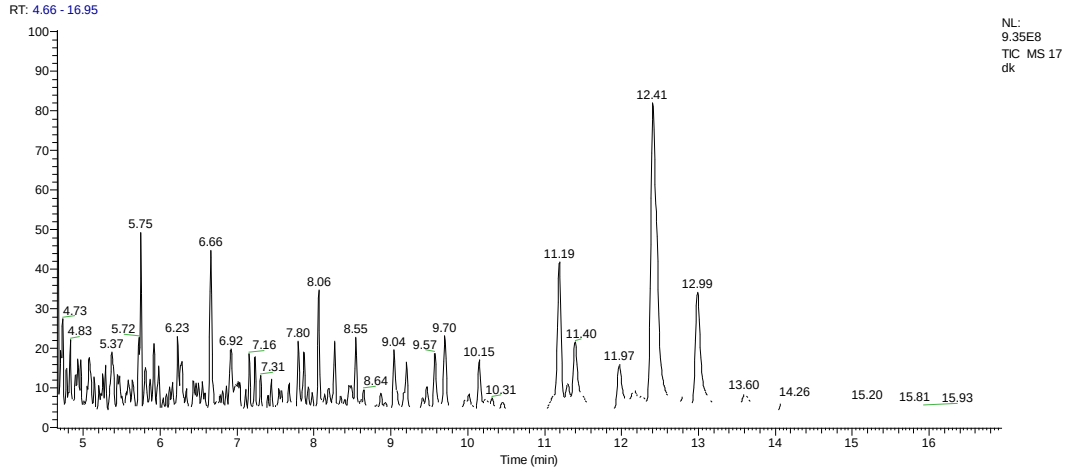
Öncelikle yukarıda belirlenen fırın ve inlet sıcaklık değerlerine göre solvent bekleme süresi (Solvent delay time) tespit edilmiştir. Analiz esnasında ayarlanan fırın

ve inlet parametrelerine bağlı olarak solventin dedektördeki iyon kaynağını terketme süresi belirlenmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi elde edilen kromatogramda, solvenin 3,6-4,2 dakika süresi aralığında iyon kaynağında olduğu görülmektedir. Solvent miktarının fazla olması nedeniyle bu zaman aralığında iyon kaynağı olarak kullanılan filamentin kapalı tutulması filamentin ömrünü uzatmaktadır. Bu nedenle genellikle rutin analizlerde solvent bekleme süresi belirlenmiş ve bu süre geçtikten sonra filament çalıştırılarak dedektörün tarama yapmaya başlaması sağlanmıştır. Kromatogramdan da anlaşıldığı üzere solvent bekleme süresi 4,2 dakika olarak belirlenmiştir.

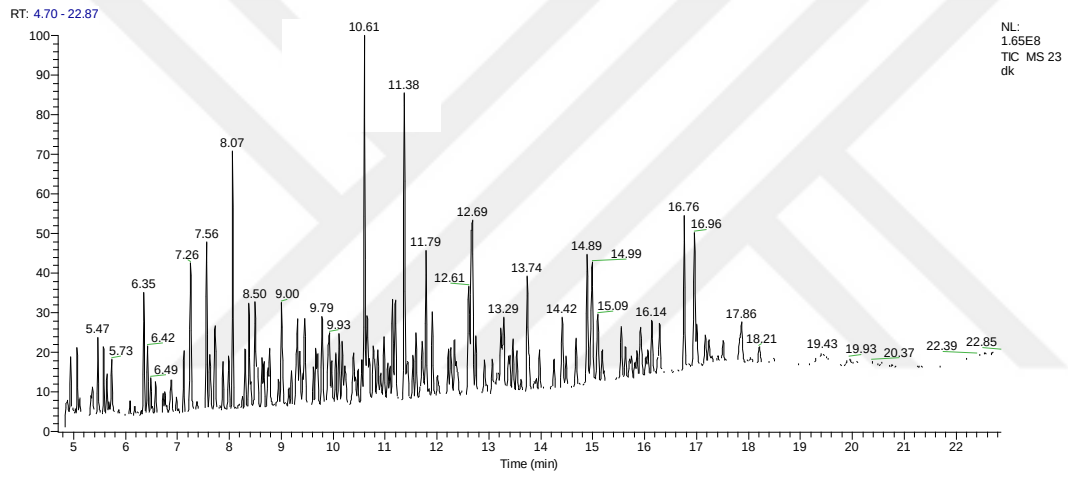


Şekil 4.3. Solvent bekleme süresi belirlenmesinde kromatogram görüntüsü

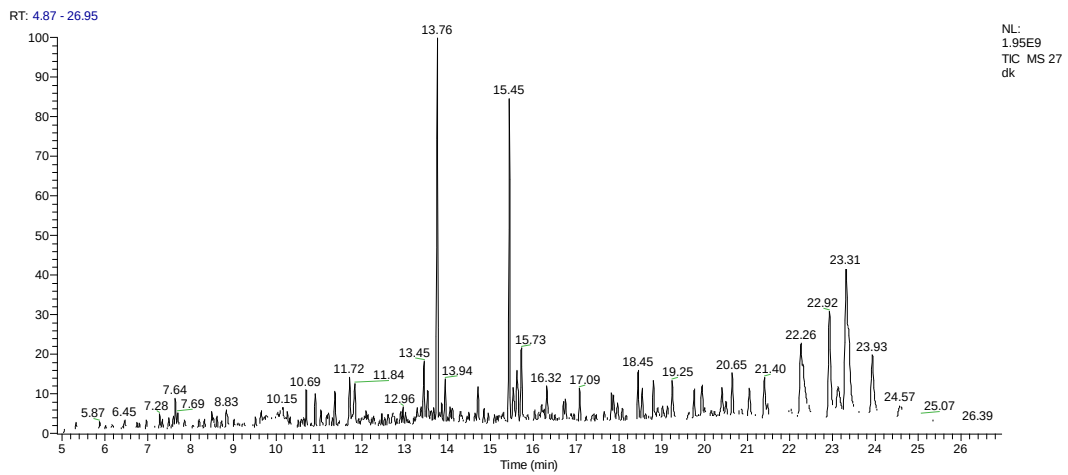
Uygun fırın programının tespit edilebilmesi amacıyla birkaç fırın programı denenmiştir. Hazırlanmış olan çoklu standart pestisit miksinden 500 ng/g derişimde vialler hazırlanarak 17 dakika, 23 dakika, 27 dakika ve 33 dakika analiz süreleri olan değişik fırın programlarına sahip metotlar ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görülmektedir. 17 dakika analiz süresine sahip olan fırın programı denemesinde neredeyse pestisitlerin hepsinin ilk 10 dakikada gelme eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Fakat birkaç pestisit ise bu gruptan ayrılmış durumda görünmüştür. Bu fırın programı da 50 °C sıcaklık ile başlatılmıştır. Isı rampaları hızlı seçilmiştir. Hızlı ısı rampaları kullanılmasına rağmen bazı pestisitlerin hem 250 °C veya daha yüksek kaynama sıcaklığına sahip olmaları, hem de analitik kolon ile olan etkileşimlerinin fazla olması nedeniyle alıkonma süreleri kısaltılamamıştır. Bu durum bize analiz süresinin daha kısa olamayacağını hakkında izlenim vermiştir. Analitik kolonun çok kısa süreler içerisinde 50 °C'den 290 °C'ye ısıtılarak tekrar 50 °C sıcaklığa soğutulması kolonun ısısal zarara uğramasına neden olmaktadır. Ayrıca kütle spektrometre uygulamalarında birden fazla analitin aynı zaman diliminde dedektöre ulaşması istenmeyen bir durumdur (Vidal vd 2002).



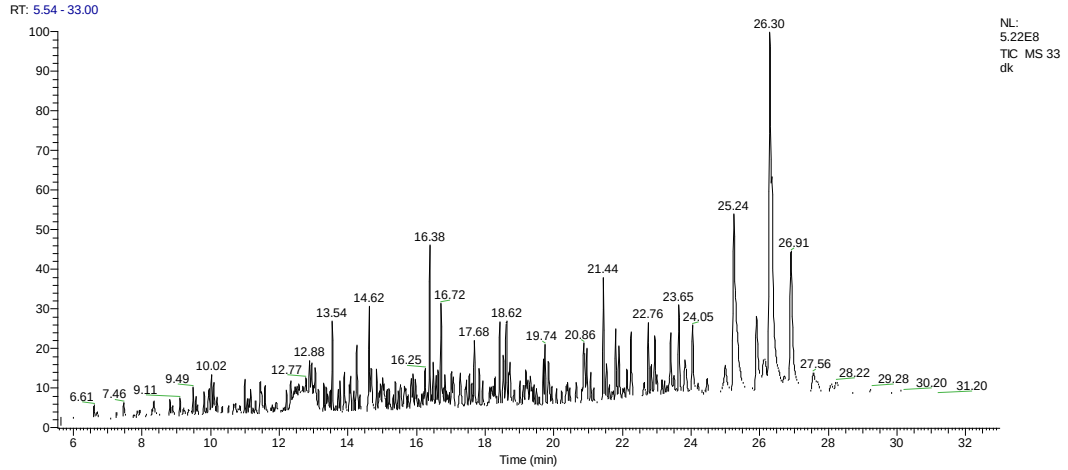
Şekil 4.4. 17 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.5. 23 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.6. 27 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.7. 33 dakika süreli fırın programı ile elde edilen kromatogram

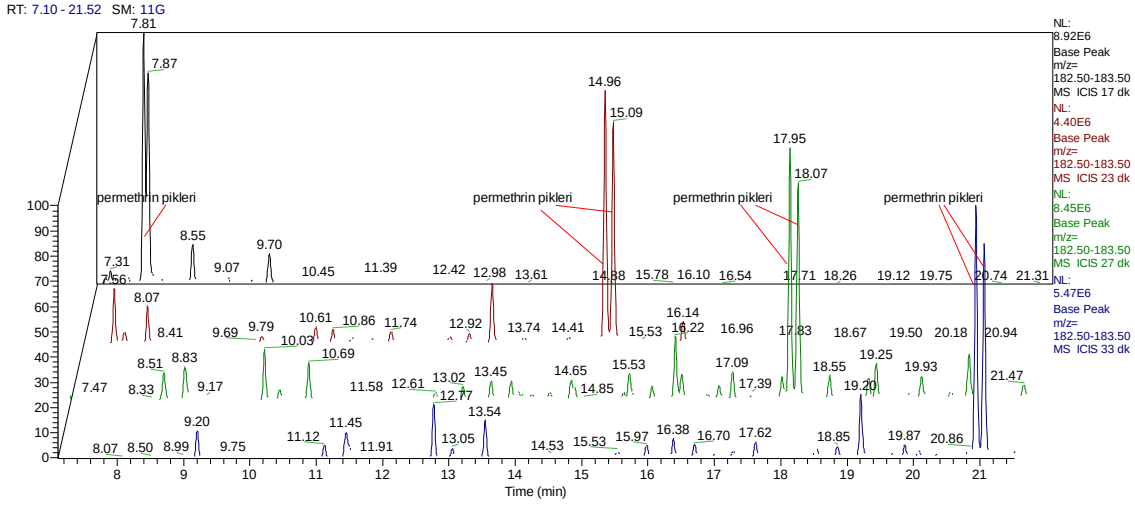
Kromatografik ayırım performansının değerlendirilmesi için izomerleri olan bazı pestisitler kontrol edilmiştir. Şekil 4.8’de permethrin’e ait kütle spektrumu analiz bilgileri yer almaktadır (Anonymous 2012c).

www.eurl-pesticides-test.eu/asp/en/stoffid.aspx

Last updated: 5/22/2014				PERMETHRIN (SUM)				
								
Physicochemical Data								
Molecular Formula		C21H20Cl2O3						
Molecular Weight / Monoisotopic Mass		391,3 / 390,07						
Water Solubility [mg/L] / pKow		0,006 (20°C, pH 7) [1] / 6,1 (20°C) [1]						
Vapour Pressure [Pa]								
pKa1; pKa2; pKa3 / Acid-Base Property		/ Non-ionised						
General Analytical Information GC Behavior LC Behavior Regulatory EU PT Toxicological Data Translations								
Close								
GC Behavior								
GC-amenable		Yes	Remark		2 isomers (cis and trans)			
GC-Decomposition		0	GC-Decomposition Products					
Matrix Effects		No Data Tailing	0					
Detector		Sensitivity	Spectrum		m/z		Remark	Reference
MSD EI (+)		+++	CLICK		183	165	163	[23][30]
MSD CI (+)		No Data						
MSD CI (-)		++	CLICK		354	209	207	[23]
TOF EI (+)		+			183	165	163	[23]
MS/MS EI (+)		No Data			183>168	183>153	183>155	[31]
NPD / ECD / FPD		0 / ++ / 0						[30]

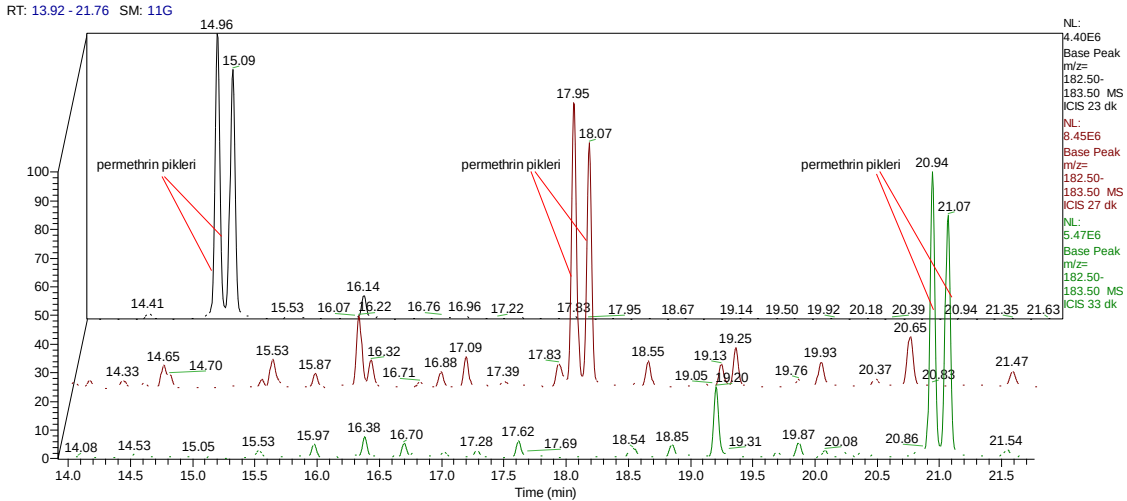
Şekil 4.8. Permethrin’e ait kütle spektrumu analiz bilgileri

Değişik fırın programları ile yapılan multi standart pestisit miksi kromatogramlarında permethrin pestisitinin 183 iyonu seçilerek cis ve trans izomerlerin kromatografik ayrımları Şekil 4.9’da karşılaştırılmıştır. Dört farklı fırın programından elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde 17 dakika süreli fırın programı ile gerekli kromatografik ayırımın sağlanmadığı Şekil 4.9’da görülmektedir. 17 dakikalık fırın program ile elde edilen cis ve trans Permethrin izomerlerine ait iki pik kromatogramının arasında kalan vadinin belirgin olarak ayrılmadığı görülmüştür.



Şekil 4.9. Değişik fırın programlarında cis-trans permethrin iyon spektrumları

23, 27 ve 33 dakika süren fırın programları ile cis ve trans Permethrin izomerlerine ait iki pik kromatogramının arasında kalan vadinin kromatogramının temel çizgisine kadar indiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Böylece her üç fırın programının da başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu üç fırın programı içerisinde en kısa süreli olması nedeniyle en uygun ve efektif kromatografik ayırım 23 dakikalık fırın programı ile elde edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında pik yığılmaları olmadığı gözlemlenmiştir. 23 dakika analiz süresine sahip olan fırın programının rutin analiz işlemlerinde daha etkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.10. 23, 27 ve 33 dakika fırın programlarında cis-trans permethrin iyon spektrumları

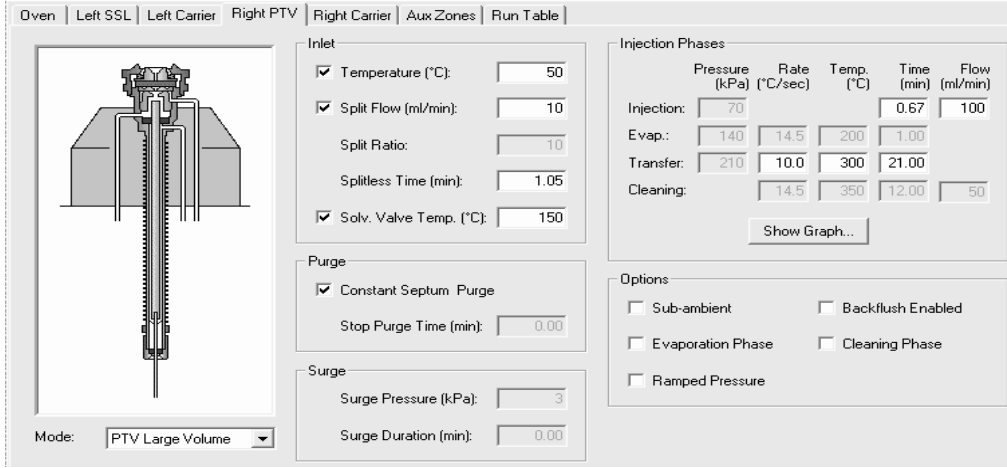
4.2.1. Gaz kromatografisi fırın ve inlet parametreleri

Farklı GC fırın sıcaklık programları ve inlet parametreleri denenerek en uygun kromatografik ayırımı sağlayan cihaz parametreleri belirlenmiştir. Çalışmalar sonucu

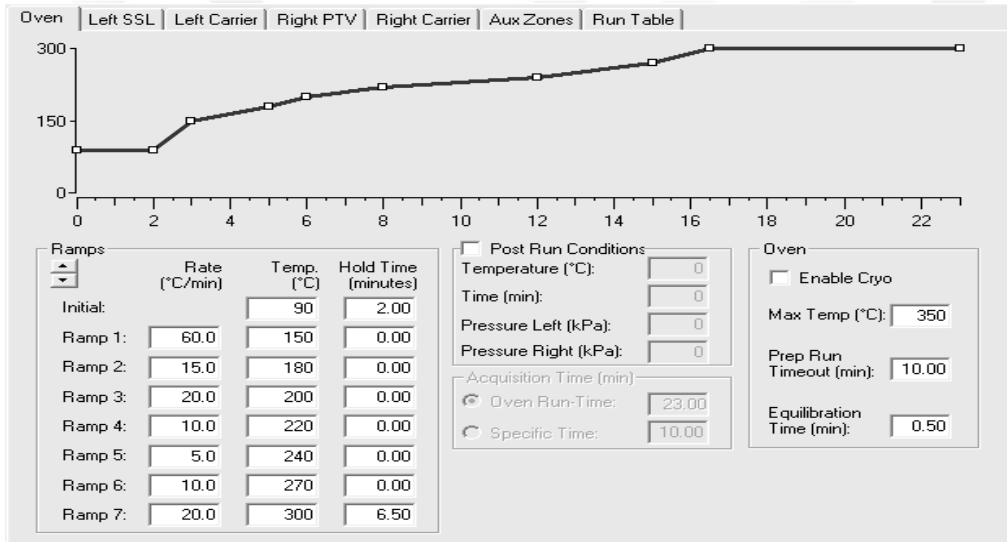
ulaşılan GC-MS/MS Sistemi Cihaz Çalışma Parametreleri Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.11-12-13 ve 14’de görsel olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1. GC-MS/MS sistemi cihaz çalışma parametreleri

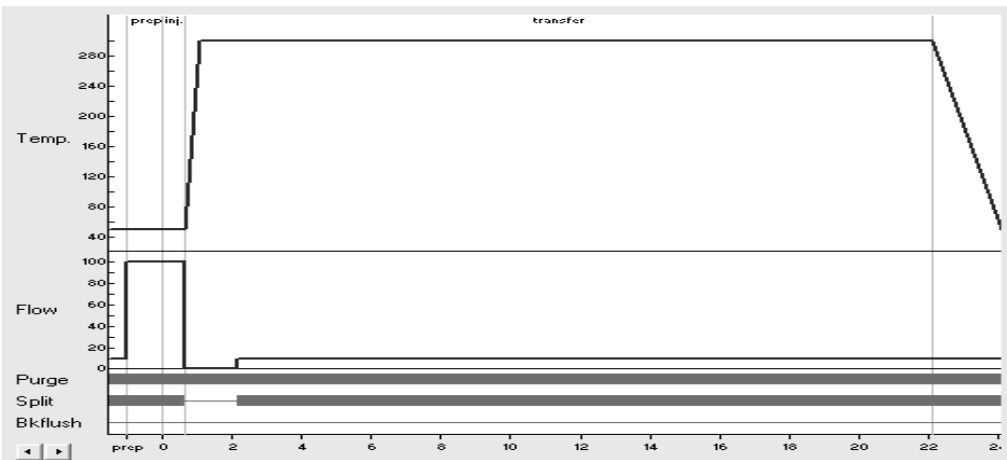
GC-MS/MS SİSTEMİ		CİHAZ PARAMETRELERİ
ENJEKSİYON PARAMETRELERİ	Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL (10-µL şırınga)
	Mod	: PTV inlet / Yüksek Hacim
	Inlet sıcaklığı	: Başlangıç 50 °C (0.67min), artış 10 °C/sn ‘den 300°C’ye (21 dk)
	Split	: Splitless süresi= 1,05 min Split akışı = 10 mL/min
	Purge	: Constant Septum Purge
	Liner	: Deactivated, Multi Baffled Liner
	Inlet soğutma	: Hava
KOLON PARAMETRELERİ	Kapiler Kolon	: HP-5MS (5% Phenyl Methyl Siloxane) 15m x 0,25mm x 0,25µm
	Mobil Faz Akışı	: Sabit basınçta
	He akış basıncı	: 75 kPa
	Taşıyıcı gaz	: Helyum (%99,999)
	Çarpışma gazı	: Argon (%99,999)
FIRIN SICAKLIK PROGRAMI	Başlangıç Sıcaklığı: 90 °C	Maksimum sıcaklık: 300 °C
	Başlangıç süresi : 2 dak	Denge süresi: 0.5 min
	Sıcaklık Rampaları:	
	Oran (°C/dak)	Son sıcaklık (°C) Bekletme süresi (dk)
	60,00	150 2,00
	15,00	180 0,00
	20,00	200 0,00
	10,00	220 0,00
	5,00	240 0,00
	10,00	270 0,00
	20,00	300 6,50
MS/MS METODU	Solvent bekleme süresi	: 4,2 dk.
	Çalışma süresi	: 23 dk.
	Tune dosyası	: Autotune
	Transfer hattı	: 260 °C
	MS kaynağı	: 230°C
	Emisyon akımı	: 100 mA
	Tarama aralığı	: 50 - 550 amu (tarama modunda)
	MS/MS modu	: 532 geçiş (SRM modunda)
	Multipplier gain gerilimi	: 400000 Volt
	Flament gerilimi	: - 70 eVolt



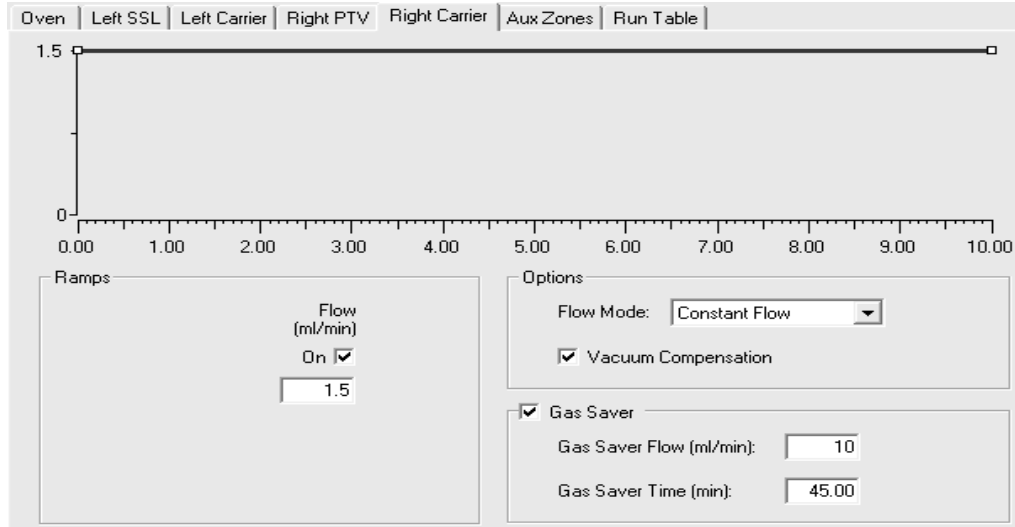
Şekil 4.11. İnlet parametreleri görüntüsü



Şekil 4.12. Fırın sıcaklık programı görüntüsü



Şekil 4.13. İnlet ve fırın sıcaklık programı - mobil faz akış diyagramları



Şekil 4.14. Mobil faz akış diyagramı

Yukarıda verilen cihaz parametreleri sayesinde her bir pestisit için farklı alıkonma süreleri tespit edilebilmiş ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Bu kromatografik ayırım özellikle izomerleri olan ancak maksimum kalıntı limitleri birbirinden farklı olan DDT ve bozunma ürünleri, HCH izomerleri gibi pestisitler için de sağlanmıştır. Kapiler kolon ve uygun fırın sıcaklık programı kombinasyonu sayesinde kromatografik olarak ayırımları sağlanan pestisitler sıralı şekilde eş zamanlı olarak kuadropol-1 ile tarama modunda çalışmakta olan MS/MS detektöre yönlendirilmiştir.

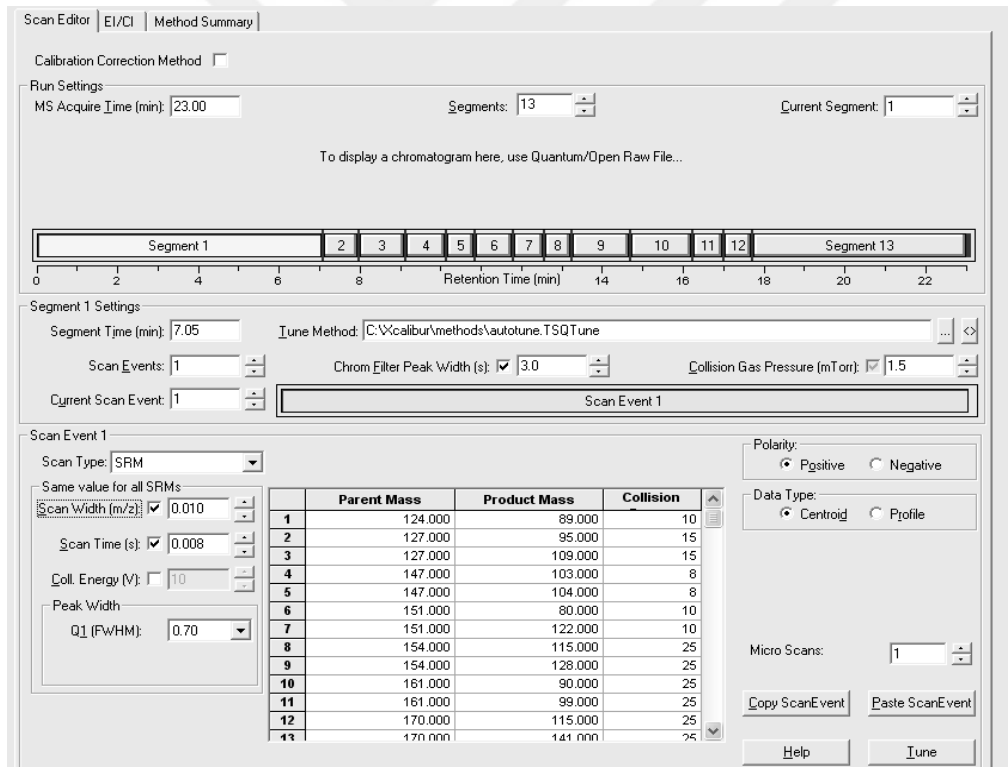
4.3. Pestisit Fragmentasyon İyonlarının Tespit Edilmesi ve Tespit Edilen GC-MS/MS İyon Geçişleri ve Çarpışma Enerjileri

Kütle spektrometresi ile yapılan pestisit analizi çalışmalarında, Avrupa Birliği Pestisit Kalıntıları Referans Laboratuvarı tarafından kalıntıların belirlenmesi ve doğrulanması için kalite kriteri olarak tanımlama veya teşhis noktaları (Identification Points: IPs) kavramı geliştirilmiştir. Analitik yöntem olarak GC-MS/MS cihazı kullanıldığında, her bir analit için bir ana iyon ve iki adet parçalanma iyonu olmak üzere üç adet tanımlama noktasına ihtiyaç bulunmaktadır. Tandem kütle spektrometrelerinde yeni bir analiz metodu geliştirilirken her bir analit için spesifik tanımlama noktalarının belirlenmesi metodun en önemli basamağıdır (Anonymous 2013).

Aşağıda Çizelge 4.2.’de kütle spektrometresinde her bir pestisite ait kütle geçişleri verilmiştir. Her pestisit için seçilen ana iyon ve ürün iyonlar tespit edilmiştir. Bu iyon geçişlerinin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan çarpışma enerji voltajları belirlenmiştir. Aynı zamanda, pestisitler için alıkonma zamanları (RT: Retention Time) belirlenmiştir. Alıkonma süreleri baz alınarak yapılan tarama tespit zaman aralığı bilgileri yine Çizelge 4.2.’de sunulmuştur. Bu çalışma her bir pestisit için tek tek yapılmıştır.

Analitik kolon ve uygun fırın sıcaklık programı sayesinde kromatografik olarak ayrımlar sağlanarak pestisitler sıralı şekilde detektöre yönlendirilmiştir. Dedektörde ilk olarak iyon kaynağına giriş yapan pestisitler filament lambadan yayılan elektron bombardımanı (EI) sayesinde iyon parçacıklarına ayrıştırılmıştır. Her bir pestisit için ilk iyonlaşmadan elde edilen responsu yüksek fragmentasyon iyonları tespit edilmiştir. Elde edilen bu iyonlardan hangileri kuadropol-2 çarpıştırma bölgesine gönderilerek hangi kütle filtrelerinin kullanılacağı kararlaştırılmıştır. Çarpıştırma sonrasında ikinci fragmentasyonda oluşacak iyon parçacıklarını maksimize etmek için uygulanması gereken en uygun voltaj gerilimleri ve çarpıştırma gazı olarak argon gazı akış miktarları belirlenmiştir. Bu sayede her bir pestisit için elde edilen spesifik ürün iyon geçişleri Çizelge 4.2.'de görülmektedir. Şekil 4.15'te ise MS/MS kütle detektörü çalışma penceresi görüntüsü verilmiştir. Tespit edilen tüm iyon geçişleri verilen örnekteki gibi SRM modunda metot parametrelerine yazılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemlerden sonra konsantrasyonları bilinen pestisitlerin saf standartları analiz edilerek cihazdan elde edilen veriler ile her bir pestisit için kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Numunelerin analizi sonucu cihazdan elde edilen pestisitlere ait veriler bu kalibrasyon doğruları ile kıyaslanarak nicel sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 4.15. MS/MS kütle detektörü çalışma penceresi görüntüsü

Çizelge 4.2. Tespit edilen GC-MS/MS iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
1	acetochlor	146	130 / 131	15	6,37	7,37
2	acibenzolar-S-methyl	182	153 / 135	15	6,45	7,45
3	aclonifen	264	211,7 / 194,1	15	11,09	12,09
4	acrinathrin	181	152 / 127	15	13,54	14,54
5	alachlor	188	160 / 132	15	8,74	9,74
6	aldrin	263	227 / 193	20	7,11	8,11
7	allethrin	123	79 / 91	15	11,15	12,15
8	amitraz	132	117 / 105	15	10,45	11,45
9	diethatyl Etyl	188	159,7 / 132	10	9,95	10,95
10	arcrinathrin	289	261 / 92,9	10	14,12	15,12
11	atrazine	200	122 / 94	15	11,15	12,15
12	azaconazole	217	172,7 / 144,7	20	10,48	11,48
13	azinphos-ethyl	160	131,8 / 103,8	10	14,52	15,52
14	azobenzene	105	77 / 51	10	6,52	7,52
15	azoxystrobin	344	328,6 / 300,4	15	9,65	10,65
16	benalaxyl	148	105 / 132,8	15	11,32	12,32
17	bendiocarb	151	126 / 57	15	12,23	13,23
18	benfluralin	292	264 / 206	15	8,96	9,96
19	benfuresate	256	163 / 164	15	8,42	9,42
20	benthiocarb	257	125 / 100	10	9,54	10,54
21	bifenthrin	181	165,8 / 153	10	12,87	13,87
22	bioallethrin	168	81 / 123	15	8,39	9,39
23	biphenyl	154	128 / 115	25	4,25	5,25
24	bitertanol-1	171	79 / 57	15	11,16	12,16
25	bitertanol-2	171	79 / 57	15	11,35	12,35
26	boscalid	342	307 / 139,7	10	16,1	17,1
27	bromacil	188	132 / 119	15	6,02	9,02
28	bromophos	331	316 / 286	25	8,74	9,74
29	bromopropylate	341	182,8 / 184,6	25	12,9	13,9
30	bromuconazole-1	295	172,7 / 174,5	15	12,53	13,53
31	bromuconazole-2	295	172,7 / 174,5	15	12,53	13,53
32	bupirimate	273	230 / 192,9	5	8,25	9,25
33	buprofezin	172	130,8 / 114,7	10	7,78	8,78
34	butachlor	188	160 / 146	15	9,55	10,55
35	butralin	266	220 / 190	15	7,75	8,75

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
36	butylate	156	146 / 57	15	5,66	6,66
37	cadusafos	159	131 / 97	10	4,91	5,91
38	captafol	79	77 / 79	15	3,08	4,08
39	captan	149	105 / 79	10	10,85	11,85
40	captan (met)	151	122 / 80	10	4,28	5,28
41	carbophenthion	157	120,7 / 110,8	20	7,47	8,47
42	carbosulfan	160	104 / 76	15	8,48	9,48
43	chlorbenzilate	251	138,8 / 110,8	20	11,15	12,15
44	chlordan,alfa	375	337 / 301	10	7,74	8,74
45	chlordan,gamma	375	337 / 301	10	7,74	8,74
46	chlorfenapyr	364	282,1 / 246,9	25	10,89	11,89
47	chlorfenvinphos	267	159 / 203	15	8,49	11,47
48	chlormephos	154	121 / 97	15	11,15	12,15
49	chlorothalonil	266	133 / 168	25	8,74	9,74
50	chlorprofam	127	92 / 65	20	9,95	10,95
51	chlorpyrifos	314	258 / 286	10	10,87	11,87
52	chlorpyrifos-methyl	286	271 / 241	25	7,11	8,11
53	chlorthal-dimethyl	301	223 / 273	20	11,15	12,15
54	chlorthiophos	325	269 / 97	15	8,50	9,50
55	chlozolate	259	187 / 188	10	7,47	8,47
56	clofentezine	304	137,5 / 131,8	10	11,15	12,15
57	coumaphos	362	226 / 109	20	10,85	11,85
58	cyanazine	212	68 / 57	10	8,74	9,74
59	cyanophos	243	125 / 109	15	8,48	9,47
60	cycloate	215	186 / 154	15	5,47	6,47
61	cyfluthrin-alpha	163	126,7 / 90,9	10	15,05	16,05
62	cyfluthrin-beta	163	126,7 / 90,9	10	15,05	16,05
63	cyfluthrin-teta	163	126,7 / 90,9	10	15,05	16,05
64	cyfluthrin-zeta	163	126,7 / 90,9	10	15,05	16,05
65	cyhalothrin,lamba	208	180,8 / 152,9	15	14,12	15,12
66	cypermethrin-alpha	163	126,7 / 90,9	10	15,55	16,55
67	cypermethrin-beta	163	126,7 / 90,9	10	15,55	16,55
68	cypermethrin-teta	163	126,7 / 90,9	10	15,55	16,55
69	cypermethrin-zeta	163	126,7 / 90,9	10	15,55	16,55
70	cyproconazole	222	124,8 / 152,9	15	8,50	9,50

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
71 cyprodinil	224	208 / 222	20	8,74	9,74
72 DDD,o,p	246	211 / 175,9	15	8,56	9,56
73 DDD,o,p	246	211 / 175,9	15	8,56	9,56
74 DDE,o,p	246	211 / 175,9	15	8,95	9,95
75 DDE,p,p	246	211 / 175,9	15	8,95	9,95
76 DDT,o,p	235	198,9 / 164,8	20	10,45	11,45
77 DDT,p,p	235	198,9 / 164,8	20	10,45	11,45
78 deltamethrin	181	151,9 / 126,8	25	7,11	8,11
79 diazinon	179	137 / 164	20	10,89	11,89
80 dichlooranilline-3,5	161	99 / 90	25	10,48	11,48
81 dichlorfenthion	279	223 / 251	10	8,56	9,56
82 dichlormid	124	56 / 41	10	14,12	15,12
83 dichlorophen	268	180 / 150	20	8,40	9,40
84 diclobutrazol	270	159 / 82	15	7,47	8,47
85 dicloran	206	176 / 160	10	9,39	10,39
86 dicofol	251	139 / 111	15	14,52	15,52
87 dicofol (met)	139	75 / 111	15	14,44	15,44
88 dieldrin	277	205,7 / 240,7	15	11,15	12,15
89 diethatyl ethyl (İSTD)	188	132 / 168	15	6,52	7,52
90 diethofencarb	267	225 / 197	10	12,53	13,53
91 difenconazole-1	323	264,9 / 202	15	8,74	9,74
92 difenconazole-2	323	264,9 / 202	15	8,74	9,74
93 dimethachlor	197	134 / 132	15	4,26	5,26
94 dimethipin	76	58 / 59	20	8,84	9,84
95 dimethomorph-1	301	164,9 / 272,8	10	14,52	15,52
96 dimethomorph-2	301	164,7 / 138,7	10	14,52	15,52
97 dimoxystrobin	116	89 / 63	18	8,75	9,75
98 dinitramine	305	261 / 216	15	8,39	9,39
99 dinobuton	211	163 / 147	5	8,76	9,76
100 diphenylamine	169	141 / 154	20	4,25	5,25
101 disulfoton	186	109 / 125	10	11,19	12,19
102 ditalimfos	243	147,7 / 129,8	15	11,16	12,16
103 dithiopyr	354	306 / 286	20	14,52	15,52
104 dodemorph-1	154	136 / 112	10	11,35	12,35
105 dodemorph-2	154	136 / 112	10	11,35	12,35

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
106	endosulfan-alpha	195	125 / 158	25	10,16	11,16
107	endosulfan-beta	195	158,6 / 124,9	15	10,25	11,25
108	endosulfan-sulfate	272	234,9 / 236,8	15	10,55	11,55
109	endrin	263	227,5 / 190,7	25	6,02	9,02
110	EPN	157	109,7 / 76,3	15	6,03	9,03
111	epoxiconazole	192	137,7 / 164,8	10	6,04	9,04
112	esfenvalerate (RR+SS)	167	124,9 / 138,7	10	8,74	9,74
113	etaconazole	245	173 / 55	15	11,16	12,16
114	ethion	231	174,8 / 128,6	15	12,9	13,9
115	ethofumesate	286	207 / 161	10	9,95	10,95
116	ethoprosfos	158	114 / 130	10	11,15	12,15
117	ethoxyquin	174	130 / 159	20	12,53	13,53
118	etofenprox	163	134,7 / 106,7	15	14,44	15,44
119	etoxazole	330	300 / 315	20	6,03	7,03
120	etridiazole	211	140 / 183	15	12,53	13,53
121	etrimfos	292	181 / 153	15	8,74	9,74
122	fenamindone	238	208,9 / 194	20	7,11	8,11
123	fenarimol	219	107 / 78,9	20	7,12	8,12
124	fenazaquin	145	116,7 / 114,8	15	7,77	8,77
125	fenbuconazole	198	127 / 128	10	8,75	9,75
126	fenchlorphos	289	285 / 125	15	12,9	13,9
127	fenithrothion	277	260 / 125	10	7,47	8,47
128	fenobucarb	150	122 / 122	15	11,15	12,15
129	fenoxycarb	186	109 / 156,5	20	7,11	8,11
130	fenoxypop-p-ethyl	361	288 / 261	10	10,45	11,45
131	fenpiclonil	238	202,6 / 175,7	15	6,03	7,03
132	fenpropathrin	265	209,9 / 236,7	10	7,47	8,47
133	fenpropimorph	128	110 / 70	15	10,45	11,45
134	fenson	268	77 / 51	15	11,15	12,15
135	fensulfothion	293	265 / 152,8	10	7,12	8,12
136	fenvalerate (RS+SR)	167	124,9 / 138,8	10	9,96	10,96
137	fipronil	367	213 / 255	20	14,52	15,52
138	fluazifop-butyl	282	237,9 / 253,9	15	10,56	11,56
139	flucythrinate-1	199	156,4 / 106,9	15	14,12	15,12
140	flucythrinate-2	199	156,8 / 106,9	15	14,12	15,12

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
141	fludioxonil	248	154 / 127	15	6,53	7,53
142	flumetralin	157	143 / 145	10	11,16	12,16
143	flumioxazin	354	326 / 312	10	12,53	13,53
144	fluorochloridone-1	311	187 / 174	15	9,98	10,98
145	fluorochloridone-2	311	187 / 174	15	11,15	12,15
146	fluquinconazole	340	297,7 / 285,8	20	12,96	13,96
147	flurprimidol	269	210 / 118,8	20	7,11	8,11
148	flusilazole	233	164,8 / 151,7	20	9,99	10,99
149	flutolanil	281	172,9 / 144,4	25	10,48	11,48
150	flutriafol	219	122,7 / 94,6	20	6,55	7,55
151	fluvalinate,tau-1	250	207,9 / 199,8	20	15,55	16,55
152	fluvalinate,tau-2	250	207,9 / 199,8	20	15,55	16,55
153	folpet	260	130 / 79	10	9,95	10,95
154	folpet (met)	147	103 / 104	8	4,25	5,25
155	formothion	125	79 / 95	10	14,52	15,52
156	fuberidazole	184	155 / 129	25	7,68	8,68
157	furalaxyl	242	95 / 214	10	9,97	10,97
158	halfenprox	263	168,7 / 234,8	15	7,52	8,52
159	HCH-alpha	183	147 / 145	15	6,54	7,54
160	HCH-beta	183	147 / 145	15	6,54	7,54
161	heptachlor	272	237 / 235	10	7,15	8,15
162	heptachloreperoxide-endo	355	265 / 284	15	8,53	9,53
163	heptachloreperoxide-exo	353	265 / 284	15	8,53	9,53
164	heptenophos	215	199 / 200	15	8,95	9,95
165	hexachlorbenzene	284	249 / 214	25	4,52	5,52
166	hexaconazole	214	158,8 / 171,8	20	6,56	7,56
167	iprodion	314	245 / 271	15	14,44	15,44
168	iprodion-met_1	187	159 / 124	18	9,26	10,26
169	iprodion-met_2	244	187 / 188	8	8,75	9,75
170	isofenphos	213	185 / 121	10	9,91	10,91
171	isofenphos-methyl	199	121 / 167	10	11,16	12,16
172	isoxathion	177	129,9 / 115,9	10	14,65	15,65
173	kresoxim-methyl	116	89 / 89,8	15	11,35	12,35
174	lenacil	153	136 / 135	20	14,52	15,52
175	lindane	183	147 / 145	15	8,53	9,53

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
176	lufenuron	191	147 / 161	20	16,12	17,12
177	malathion	173	127 / 145	5	14,44	15,44
178	mecarbam	131	86 / 74	15	6,02	7,02
179	mefenpyr-diethyl	253	189 / 190	20	11,17	12,17
180	mepanipirim	222	207,1 / 206,5	20	10,45	11,45
181	mepronil	269	210 / 118,8	10	8,74	9,74
182	metalaxyl	206	132 / 162	10	10,47	11,47
183	metazachlor	132	117 / 105	15	12,94	13,94
184	metconazole	125	89 / 99	20	10,45	11,45
185	methidation	145	85 / 58	10	8,53	9,53
186	methoxychlor	227	211,8 / 168,8	15	12,53	13,53
187	metolachlor	162	133 / 118	15	8,76	9,76
188	metrafenone	393	362,9 / 334,8	20	7,44	8,44
189	metribuzin	198	110 / 82	15	12,53	13,53
190	mevinphos	127	109 / 95	15	8,74	9,74
191	myclobutanil	179	151,5 / 124,9	10	10,48	11,48
192	nitrofen	283	252,9 / 201,9	10	6,02	7,02
193	nitrothal-isopropyl	236	194 / 148	20	7,11	8,11
194	nuarimol	203	106,6 / 79	15	8,66	9,66
195	oxadiazon	258	175 / 147	7	8,75	9,75
196	oxadixyl	163	131,7 / 116,7	15	7,47	8,47
197	oxyflorfen	252	146 / 170	25	11,15	12,15
198	paclobutrazole	236	166,8 / 124,9	10	8,75	9,75
199	parathion	291	263 / 109	5	12,94	13,94
200	parathion-methyl	263	127 / 109	10	10,46	11,46
201	penconazole	248	192 / 157	15	6,52	7,52
202	pendimethalin	252	162 / 191	10	10,48	11,48
203	pentachloraniline	265	192 / 158	30	12,53	13,53
204	pentachloroanisole	265	143 / 237	15	9,95	10,95
205	permetrin-cis	183	167,8 / 152,7	20	15,12	16,12
206	permetrin-trans	183	152,7 / 167,8	20	15,12	16,12
207	phenthoate	274	246 / 121	10	9,55	10,55
208	phenylphenol,2-	170	141 / 115	25	5,52	6,52
209	phosalone	182	110,8 / 137,8	10	14,12	15,12
210	phosmet	160	77 / 105	20	11,16	12,16

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
211	picolinafen	376	238,6 / 265,7	15	10,48	11,48
212	picoxystrobin	145	116,9 / 114,8	10	9,95	10,95
213	piperonyl-butoxide	176	160,8 / 130,8	10	12,95	13,95
214	pirimifos-ethyl	318	182 / 166	15	11,15	12,15
215	pirimifos-methyl	276	244 / 151	15	12,53	13,53
216	procymidone	283	255 / 96	15	7,11	8,11
217	profenofos	337	266,8 / 308,7	10	8,53	9,53
218	profluralin	318	199 / 284	15	10,48	11,48
219	prometryn	241	226 / 184	10	11,16	12,16
220	propachlor	176	120 / 92	10	14,12	15,12
221	propargite	173	134,8 / 157,8	15	12,96	13,96
222	propiconazole-1	259	190,7 / 172,9	10	11,51	12,51
223	propiconazole-2	259	190,7 / 172,9	10	11,51	12,51
224	propyzamide	173	145 / 163	15	14,52	15,52
225	prosulfocarb	251	128 / 218	5	11,63	12,63
226	prothiofos	309	281 / 238,6	10	10,48	11,48
227	pyraflufen-ethyl	349	307 / 279	20	6,52	7,52
228	pyrazophos	221	192,8 / 176,2	10	9,95	10,95
229	pyridaben	147	131,8 / 116,8	15	8,66	9,66
230	pyridaphenthion	340	198,8 / 203,8	15	10,48	11,48
231	pyrifenox	262	227 / 197	15	12,96	13,96
232	pyrimethanil	198	183 / 157	20	7,48	8,48
233	pyriproxyfen	136	95,8 / 77,5	20	8,75	9,75
234	quilazifop-p-ethyl	299	255 / 192	18	14,52	15,52
235	quinalphos	146	118 / 91	10	8,55	9,55
236	quinoxifen	272	208 / 237	25	8,39	9,39
237	quintozene	237	143 / 167	25	8,48	9,48
238	silaflluofen	286	275,9 / 257,8	10	4,25	5,25
239	simazine	201	138 / 186	10	9,55	10,55
240	spiridiclofen	312	258,8 / 276,9	10	11,16	12,16
241	spiromesifen	272	253,9 / 208,9	10	11,15	12,15
242	spiroxamine-1	100	58 / 72	10	11,35	12,35
243	spiroxamine-2	100	72 / 58	10	11,35	12,35
244	sulphur	258	162 / 160	10	8,66	9,66
245	TDE,p,p	235	164,8 / 198,9	20	16,10	17,10

Çizelge 4.2. Tespit edilen gc-ms/ms iyon geçişleri ve çarpışma enerjileri (devamı)

	Pestisitler	Ana İyon (Da)	Ürün İyonlar (Da)	Çarpışma Enerjisi (eV)	İyon Tarama Başlangıcı (dk)	İyon Tarama Bitişi (dk)
246	tebufenpyrad	333	276 / 170,8	10	8,53	9,53
247	tebupirimfos	234	110 / 126	10	9,02	10,02
248	tecnazene	203	143 / 83	20	6,03	9,03
249	tefluthrin	177	127 / 137	15	10,48	11,48
250	terbufos	231	203 / 175	10	8,74	9,74
251	terbutryn	185	111 / 102	20	9,55	10,55
252	terbutylazin	214	104 / 132	15	12,93	13,93
253	tetraconazole	336	217 / 204	20	11,51	12,51
254	tetradifon	356	228,6 / 158,7	10	9,55	10,55
255	tetrasul	324	252 / 254	15	12,53	13,53
256	thiometon	88	60 / 73	10	10,48	11,48
257	tolclofos-methyl	265	250 / 220	20	9,85	10,85
258	tri-allate	268	226 / 184	15	6,86	7,86
259	triazamate	227	170 / 192	10	8,86	9,86
260	triazophos	161	134 / 106	10	12,9	13,9
261	trifloxystrobin	131	116,2 / 88,9	25	8,53	9,53
262	triflumizole	206	186 / 179	13	12,53	13,53
263	trifluralin	306	264 / 206	10	8,25	9,25
264	triticonazole	235	217 / 181,9	10	7,78	8,78
265	vinclozolin	212	172 / 145	15	9,55	10,55
266	zoxamide	187	145 / 111,7	10	8,81	9,81

Çizelgede her bir analit için bir ana iyon ve iki ürün iyon olmak üzere toplam üç doğrulama iyonu seçildiği görülmektedir. Bu seçimin yeterli doğrulukta bir tespit için gerekli olduğu ve metot validasyonu çalışmalarında seçicilik ve spesifiklik kriterlerini sağladığı değerlendirilmiştir.

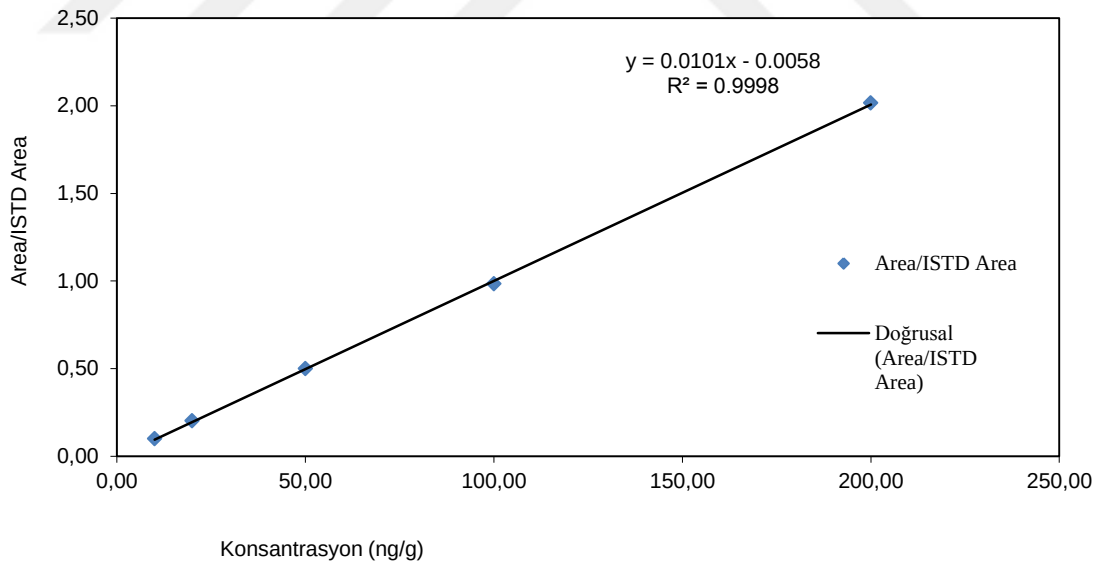
Çalışma 295 pestisit etken maddesi ile başlamıştı ancak bazı pestisitlere ait bir ana iyon ve iki ürün iyon olmak üzere toplam üç doğrulama iyonu tespit edilememiştir. Bu önemli metot doğruluk kriteri 266 adet pestisit için elde edilebilmiştir. Böylece bundan sonraki çalışmalar 266 adet pestisitinin tespiti ve validasyon çalışmaları ile devam edilmiştir.

4.4. Metot Validasyonu

4.4.1. Doğrusallık

Doğrusallık, konsantrasyon ve cihazdan elde edilen yanıt arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Doğrusallığın belirlenmesi için hedef bileşiklerin alıkonma zamanları ve kütle spektrumları belirlenmiştir. Her bir analit için matriks uyumlu kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonlar, numune körü içine artan konsantrasyonda standart maddenin eklenmesiyle elde edilmiştir. Her bir kalibrasyon eğrisi beş farklı konsantrasyonda hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için üç tekrarlı olarak okuma yapılmıştır. Elde edilen yanıtların doğrusallığı korelasyon katsayı (R^2) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda her bir analit için metodun doğrusal dinamik çalışma aralığı belirlenerek minimum ve maksimum konsantrasyon seviyeleri tespit edilmiştir. Doğrusallık 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturularak yapılmıştır (Rodríguez vd 2001). Doğrusallık için analizi yapılan ve kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanılan standartlar 10 ng/g, 20 ng/g, 50 ng/g, 100 ng/g ve 200 ng/g konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çalışma sonucunda bütün analitler için elde edilen korelasyon katsayısı 0.99'dan büyük bulunmuştur. Bu değer uluslararası literatürde önerilen değerlerle (Taverniers vd 2004) uyum göstermiştir. Örnek olarak verilen bazı pestisitler için elde edilen kalibrasyon grafikleri ve elde edilen korelasyon katsayıları (R^2) aşağıda Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de örnek olarak verilmiştir.

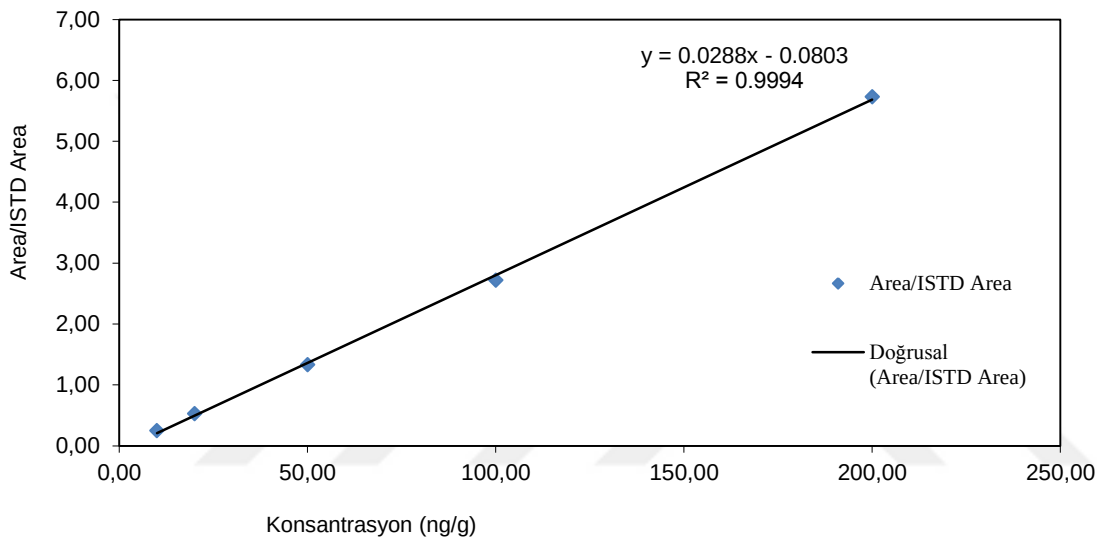


Şekil 4.16. Alachlor kalibrasyon grafiği

Alachlor kalibrasyon grafiği, Çizelge 4.3'deki Alachlor kalibrasyon grafiği değerleri kullanılarak çizdirilmiştir.

Çizelge 4.3. Alachlor kalibrasyon grafiği değerleri

Alachlor Analit Konsantrasyonu	Alachlor Alanı / İSTD Alanı Oranı	Alachlor Alanı	ISTD Alanı	Hesaplanan Konsantrasyon
10 ng/g	0,0983	432320	4400188	10,3 ng/g
20 ng/g	0,2007	729449	3634803	20,5 ng/g
50 ng/g	0,4986	1698517	3406656	50,1 ng/g
100 ng/g	0,9829	3496240	3557217	98,3 ng/g
200 ng/g	2,0146	7466039	3706046	200,8 ng/g

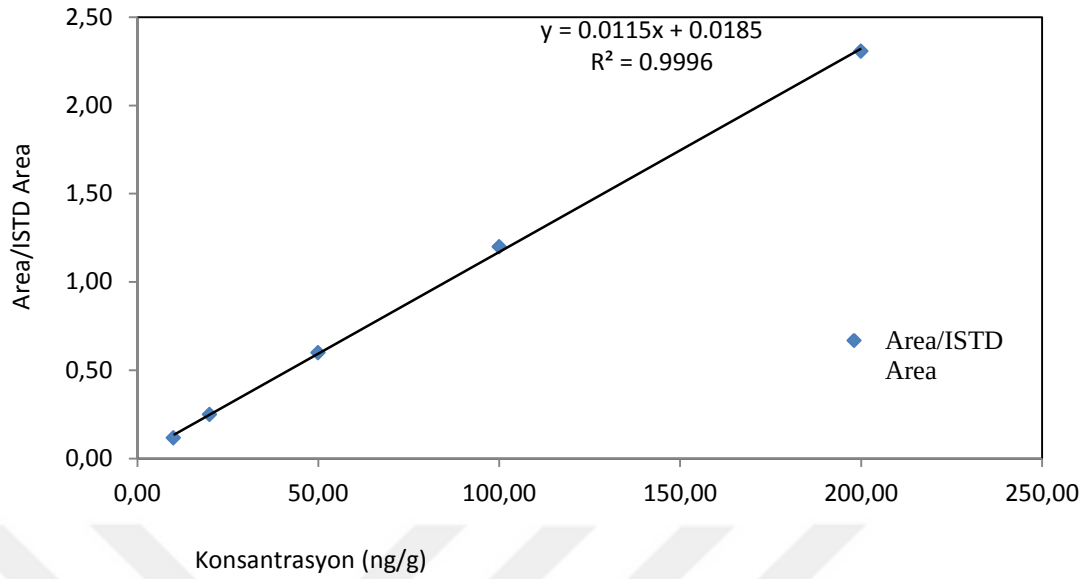


Şekil 4.17. Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği

Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği, Çizelge 4.4'deki Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği değerleri kullanılarak çizdirilmiştir.

Çizelge 4.4. Chlorpyrifos kalibrasyon grafiği değerleri

Chlorpyrifos Analit Konsantrasyonu	Chlorpyrifos Alanı / İSTD Alanı Oranı	Chlorpyrifos Alanı	ISTD Alanı	Hesaplanan Konsantrasyon
10 ng/g	0,2452	1078998	4400188	11,3 ng/g
20 ng/g	0,5280	1919311	3634803	21,1 ng/g
50 ng/g	1,3315	4535922	3406656	49,0 ng/g
100 ng/g	2,7150	9657956	3557217	97,0 ng/g
200 ng/g	5,7270	21224576	3706046	201,6 ng/g



Şekil 4.18. Endosulfan-alpha kalibrasyon grafiği

Endosulfan-Alpha kalibrasyon grafiği, Çizelge 4.5'deki Endosulfan-Alpha kalibrasyon grafiği değerleri kullanılarak çizdirilmiştir.

Çizelge 4.5. Endosulfan-alpha kalibrasyon grafiği değerleri

Endosulfan-Alpha Analit Konsantrasyonu	Endosulfan-Alpha Alanı / İSTD Alanı Oranı	Endosulfan-Alpha Alanı	ISTD Alanı	Hesaplanan Konsantrasyon
10 ng/g	0,1154	507580	4400188	8,4 ng/g
20 ng/g	0,2488	904285	3634803	20,0 ng/g
50 ng/g	0,5979	2036849	3406656	50,3 ng/g
100 ng/g	1,1994	4266488	3557217	102,6 ng/g
200 ng/g	2,3069	8549442	3706046	198,7 ng/g

4.4.2. Tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) değerlerinin hesaplanması

Enstrümantal analizlerde numuneden kaynaklanan girişim unsurlarının belirlenmesinde büyük bir öneme sahip olan numune körü, analiz edilen numunele aynı özellikleri taşıyan ancak çalışma konusu analit veya analitleri içermeyen örnek olarak tanımlanmaktadır. Tespit limiti (LOD), zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen, fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit derişimidir. LOD değeri, genellikle analit için cihazdan elde edilen sinyal büyüklüğünün gürültü sinyaline oranının üç katının elde edilebilebileceği konsantrasyonun belirlenmesi ile bulunmaktadır. LOD' nin belirlenmesi için numune körü üzerine pestisit standart karışımlarının cihazda görülebildiği ve tekrarlanabilirliğin sağlanabildiği en düşük konsantrasyon olan 10 ng/g konsantrasyonda analitler eklenerek aynı gün içinde en az 10 ayrı çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu pestisitler için elde edilen kantitatif değerlerin standart

sapması hesaplanmış ve standart sapmanın 3 katı LOD olarak kabul edilmiştir (Weitzel vd 2007, Anonymous 2013).

Raporlama limiti olarak da bilinen en düşük ölçüm limiti (LOQ), kabul edilebilir doğrulukta ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. LOQ değerin tespiti için yapılan 10 ng/g konsantrasyonda yapılan 10 tekrarlı çalışmadan elde edilen standart sapmanın 10 katı alınarak belirlenmiştir (Weitzel vd 2007, Anonymous 2013).

LOD ve LOQ hesaplanmadan önce numune köründen elde edilen sonuçlar için uygunluk testi yapılarak sapan değerler varsa değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

4.4.3. Doğruluk ve kesinlik

Doğruluk, bir ölçüm cihazının veya metodun ölçüm sonucunun gerçek değere yakınlığını ifade etmek için kullanılmaktadır (Weitzel vd 2007). Doğruluk referans maddeler ile geri kazanım çalışmaları yapılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada numune körü içine miktarı bilinen oranlarda standart maddenin eklenmesiyle geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik; bir metodun aynı materyalle, aynı laboratuvarı, aynı cihazla, aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir (Weitzel vd 2007). Tekrarlanabilirliğin kesinliği geri kazanım çalışmasından elde edilen ölçüm sonuçlarının bağıl standart sapması hesaplanarak belirlenmiştir.

Kesinlik, homojen bir örneğin çoklu analizinden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik, ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını göstermekte ve standart sapma (SD) veya bağıl standart sapma (%RSD) olarak ifade edilmektedir (Weitzel vd 2007). Kesinlik validasyon çalışmalarında tekrarlanabilirlik ve ara-tekrarlanabilirlik olarak adlandırılan deneysel çalışmalar yapılarak belirlenmiştir. Kesinliğin belirlenmesi için referans maddeler ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 4.6'da GC/MS-MS cihazı ile yapılan validasyon çalışmasında, domates matriksinde tespit ve ölçüm limiti ile geri kazanım çalışmalarından elde edilen doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait değerler sunulmuştur. Elde edilen değerler çalışma konusu analitlerin konsantrasyonları baz alındığında önerilen uluslararası değerler (Taverniers vd 2004) ile uyum göstermiştir.

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD ng/g (3xSD)	LOQ ng/g (10xSD)	Ort (%)	SD	%RSD
1	acetochlor	0,71	2,13	7,1	91,20	4,61	5,06
2	acibenzolar-S-methyl	0,72	2,16	7,2	84,29	2,88	3,42
3	aclonifen	0,43	1,29	4,3	77,75	2,29	2,95
4	acrinathrin	0,64	1,92	6,4	85,05	3,45	4,05
5	alachlor	0,99	2,97	9,9	85,77	4,00	4,66
6	aldrin	0,35	1,05	3,5	78,09	3,42	4,38
7	allethrin	0,68	2,44	6,8	88,35	4,13	4,68
8	amitraz	0,54	1,62	5,4	79,15	3,74	4,73
9	diethatyl Etyl	0,46	1,38	4,6	84,66	4,28	5,06
10	arcrinathrin	0,83	2,49	8,3	83,14	4,23	5,08
11	atrazine	0,91	2,73	9,1	82,18	5,32	6,47
12	azaconazole	0,94	2,82	9,4	82,59	8,85	10,72
13	azinphos-ethyl	1,85	5,55	18,5	88,45	5,81	6,57
14	azobenzene	1,12	3,36	11,2	89,74	3,44	3,84
15	azoxystrobin	0,85	2,55	8,5	89,51	2,08	2,33
16	benalaxyl	0,88	2,64	8,8	76,42	9,78	12,80
17	bendiocarb	1,07	3,21	10,7	86,30	5,37	6,22
18	benfluralin	0,7	2,1	7	82,80	3,19	3,85
19	benfuresate	0,49	1,47	4,9	84,72	4,10	4,84
20	benthiocarb	1,38	4,14	13,8	73,80	6,78	9,18
21	bifenthrin	0,63	1,89	6,3	86,92	2,15	2,47
22	bioallethrin	0,95	2,85	9,5	82,50	7,66	9,29
23	biphenyl	0,55	1,65	5,5	77,35	7,33	9,47
24	bitertanol-1	0,36	1,08	3,6	88,56	3,13	3,53
25	bitertanol-2	0,88	2,64	8,8	76,42	9,78	12,80
26	boscalid	1,07	3,21	10,7	86,30	5,37	6,22
27	bromacil	0,7	2,1	7	82,80	3,19	3,85
28	bromophos	0,49	1,47	4,9	84,72	4,10	4,84
29	bromopropylate	0,61	1,83	6,1	88,49	3,75	4,24
30	bromuconazole-1	0,59	1,77	5,9	92,07	5,03	5,47
31	bromuconazole-2	0,57	1,71	5,7	84,88	3,31	3,90
32	bupirimate	0,63	1,89	6,3	92,17	2,86	3,10
33	buprofezin	0,71	2,13	7,1	100,04	17,44	17,44
34	butachlor	0,47	1,41	4,7	86,83	3,25	3,74
35	butralin	0,95	2,85	9,5	82,50	7,66	9,29

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler	SD	LOD & LOQ Değerleri		Doğruluk Ort	Kesinlik	
		LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)		SD	%RSD
36 butylate	0,46	1,38	4,6	84,66	4,28	5,06
37 cadusafos	0,91	2,73	9,1	82,48	3,87	4,69
38 captafol	0,68	2,04	6,8	70,96	5,71	8,04
39 captan	0,89	2,67	8,9	91,43	6,46	7,07
40 captan (met)	0,88	2,64	8,8	86,63	2,22	2,56
41 carbophenthion	0,55	1,65	5,5	77,35	7,33	9,47
42 carbosulfan	0,6	1,8	6	72,84	5,94	8,15
43 chlorbenzilate	0,86	2,58	8,6	86,21	2,22	2,57
44 chlordane,alfa	0,8	2,4	8	85,91	3,41	3,97
45 chlordane,gamma	0,77	2,31	7,7	82,70	3,31	4,00
46 chlorfenapyr	0,61	1,83	6,1	89,30	3,14	3,52
47 chlorfenvinphos	0,54	1,62	5,4	89,21	4,10	4,60
48 chlormephos	0,72	2,16	7,2	81,13	4,62	5,69
49 chlorothalonil	0,45	1,35	4,5	86,07	4,05	4,70
50 chlorprofam	0,87	2,61	8,7	84,55	2,85	3,38
51 chlorpyrifos	0,67	2,01	6,7	87,21	2,92	3,35
52 chlorpyrifos-methyl	0,38	1,14	3,8	84,70	3,65	4,31
53 chlorthal-dimethyl	0,87	2,61	8,7	84,55	2,85	3,38
54 chlorthiophos	0,71	2,13	7,1	91,20	4,61	5,06
55 chlozolate	0,58	1,74	5,8	79,78	2,98	3,74
56 clofentezine	0,61	1,83	6,1	87,38	3,48	3,98
57 coumaphos	1,04	3,12	10,4	91,57	3,71	4,06
58 cyanazine	1,14	3,42	11,4	84,12	1,61	1,92
59 cyanophos	0,46	1,38	4,6	85,46	2,63	3,07
60 cycloate	0,59	1,77	5,9	83,70	2,68	3,21
61 cyfluthrin-alpha	0,43	1,29	4,3	85,48	7,45	8,71
62 cyfluthrin-beta	0,83	2,49	8,3	89,95	3,14	3,49
63 cyfluthrin-teta	0,81	2,43	8,1	79,04	20,53	25,98
64 cyfluthrin-zeta	0,72	2,16	7,2	84,29	2,88	3,42
65 cyhalothrin,lambda	0,85	2,55	8,5	83,04	3,36	4,04
66 cypermethrin-alpha	0,56	1,68	5,6	92,10	3,86	4,19
67 cypermethrin-beta	1,38	4,14	13,8	73,80	6,78	9,18
68 cypermethrin-teta	0,63	1,89	6,3	86,92	2,15	2,47
69 cypermethrin-zeta	1,12	3,36	11,2	89,74	3,44	3,84
70 cyproconazole	0,85	2,55	8,5	89,51	2,08	2,33

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
71	cyprodinil	0,57	1,71	5,7	86,06	2,72	3,16
72	DDD,o,p	1,02	3,06	10,2	86,23	4,92	5,71
73	DDD,o,p	0,89	2,67	8,9	90,50	3,35	3,70
74	DDE,o,p	0,84	2,52	8,4	84,70	2,02	2,38
75	DDE,p,p	1,06	3,18	10,6	88,39	3,14	3,55
76	DDT,o,p	0,81	2,43	8,1	82,67	3,28	3,97
77	DDT,p,p	0,43	1,29	4,3	89,65	12,06	13,45
78	deltamethrin	0,39	1,17	3,9	83,84	4,07	4,86
79	diazinon	0,55	1,65	5,5	88,10	3,30	3,75
80	dichlooranilline-3,5	0,69	2,07	6,9	85,95	4,33	5,04
81	dichlorfenthion	0,65	1,95	6,5	82,48	3,87	4,69
82	dichlormid	0,71	2,13	7,1	77,95	3,16	4,06
83	dichlorophen	0,59	1,77	5,9	78,11	3,91	5,01
84	diclobutrazol	0,82	2,46	8,2	92,88	2,65	2,85
85	dicloran	0,79	2,37	7,9	91,24	4,11	4,51
86	dicofol	0,88	2,64	8,8	84,22	2,45	2,91
87	dicofol (met)	0,49	1,47	4,9	108,04	11,22	10,39
88	dieldrin	0,56	1,68	5,6	89,26	3,52	3,95
89	diethatyl Etyl	0,64	1,92	6,4	78,01	4,77	6,11
90	diethofencarb	0,54	1,62	5,4	81,91	2,23	2,72
91	difenconazole-1	0,62	1,86	6,2	82,04	2,50	3,05
92	difenconazole-2	0,77	2,31	7,7	88,64	6,41	7,23
93	dimethachlor	0,35	1,05	3,5	80,45	3,32	4,12
94	dimethipin	0,53	1,59	5,3	88,79	5,25	5,91
95	dimethomorph-1	0,76	2,28	7,6	83,96	1,83	2,18
96	dimethomorph-2	0,89	2,67	8,9	81,64	2,88	3,53
97	dimoxystrobin	0,79	2,37	7,9	88,53	3,26	3,68
98	dinitramine	0,93	2,79	9,3	79,57	7,13	8,96
99	dinobuton	1,38	4,14	13,8	84,31	5,19	6,16
100	diphenylamine	0,69	2,07	6,9	86,04	3,30	3,83
101	disulfoton	0,48	1,44	4,8	88,51	2,90	3,28
102	ditalimfos	0,51	1,53	5,1	88,75	5,08	5,72
103	dithiopyr	0,59	1,77	5,9	92,80	6,96	7,50
104	dodemorph-1	0,88	2,64	8,8	87,86	7,22	8,22
105	dodemorph-2	0,81	2,43	8,1	94,81	2,51	2,65

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
106	endosulfan-alpha	0,48	1,44	4,8	90,79	5,92	6,52
107	endosulfan-beta	0,96	2,88	9,6	80,71	4,67	5,78
108	endosulfan-sulfate	0,62	1,86	6,2	85,68	4,96	5,79
109	endrin	0,57	1,71	5,7	88,08	2,24	2,54
110	EPN	1,09	3,27	10,9	83,91	7,63	9,09
111	epoxiconazole	0,85	2,55	8,5	83,78	4,10	4,89
112	esfenvalerate (RR+SS)	0,66	1,98	6,6	84,00	2,79	3,32
113	etaconazole	0,57	1,71	5,7	86,59	4,28	4,95
114	ethion	0,53	1,59	5,3	85,45	3,78	4,42
115	ethofumesate	0,73	2,19	7,3	70,31	4,76	6,77
116	ethoprosfos	0,94	2,82	9,4	87,31	3,50	4,01
117	ethoxyquin	0,99	2,97	9,9	91,17	20,62	22,62
118	etofenprox	1,11	3,33	11,1	89,24	7,32	8,20
119	etoxazole	0,88	2,64	8,8	79,19	3,43	4,33
120	etridiazole	0,79	2,37	7,9	92,94	2,95	3,18
121	etrimfos	1,95	5,85	19,5	82,76	13,46	16,26
122	fenamindone	0,63	1,89	6,3	84,75	4,04	4,77
123	fenarimol	0,54	1,62	5,4	93,42	5,28	5,65
124	fenazaquin	0,68	2,04	6,8	85,34	3,08	3,60
125	fenbuconazole	0,66	1,98	6,6	76,67	5,96	7,77
126	fenchlorphos	0,89	2,67	8,9	89,81	4,65	5,17
127	fenithrothion	0,75	2,25	7,5	85,62	5,36	6,26
128	fenobucarb	0,39	1,17	3,9	90,55	3,20	3,53
129	fenoxycarb	0,82	2,46	8,2	92,88	2,65	2,85
130	fenoxyp-prop-p-ethyl	0,92	2,76	9,2	93,07	5,19	5,57
131	fenpiclonil	0,41	1,23	4,1	89,17	5,32	5,96
132	fenpropathrin	0,62	1,86	6,2	75,93	3,20	4,22
133	fenpropimorph	0,55	1,65	5,5	79,84	3,67	4,59
134	fenson	0,47	1,41	4,7	87,63	2,32	2,65
135	fensulfothion	0,75	2,25	7,5	84,96	4,27	5,03
136	fenvalerate (RS+SR)	0,66	1,98	6,6	79,92	5,06	6,33
137	fipronil	0,83	2,49	8,3	77,89	6,53	8,39
138	fluazifop-butyl	0,58	1,74	5,8	75,52	12,49	16,54
139	flucythrinate-1	0,58	1,74	5,8	100,50	17,80	17,71
140	flucythrinate-2	0,49	1,47	4,9	101,71	13,39	13,16

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
141	fludioxonil	0,86	2,58	8,6	97,16	5,44	5,60
142	flumetralin	0,77	2,31	7,7	95,44	7,61	7,97
143	flumioxazin	0,67	2,01	6,7	90,37	9,05	10,01
144	fluorochloridone-1	0,66	1,98	6,6	76,67	5,96	7,77
145	fluorochloridone-2	0,56	1,68	5,6	98,51	12,49	12,67
146	fluquinconazole	0,64	1,92	6,4	94,05	14,22	15,11
147	flurprimidol	0,55	1,65	5,5	95,08	12,57	13,23
148	flusilazole	0,61	1,83	6,1	108,24	15,52	14,33
149	flutolanil	1,01	3,03	10,1	100,15	11,43	11,41
150	flutriafol	0,43	1,29	4,3	93,57	14,04	15,00
151	fluvalinate,tau-1	0,55	1,65	5,5	94,19	9,95	10,56
152	fluvalinate,tau-2	0,94	2,82	9,4	96,93	11,43	11,80
153	folpet	0,88	2,64	8,8	103,68	3,31	3,19
154	folpet (met)	0,46	1,38	4,6	92,09	6,29	6,83
155	formothion	0,96	2,88	9,6	91,80	6,98	7,60
156	fuberidazole	0,4	1,2	4	90,28	7,97	8,83
157	furalaxyl	0,31	0,93	3,1	90,56	8,50	9,39
158	halfenprox	0,55	1,65	5,5	101,22	16,00	15,81
159	HCH-alpha	0,36	1,08	3,6	96,22	14,33	14,89
160	HCH-beta	0,34	1,02	3,4	97,40	8,83	9,07
161	heptachlor	0,4	1,2	4	95,33	15,83	16,61
162	heptachloreperoxide-endo	1,25	3,75	12,5	84,01	11,09	13,21
163	heptachloreperoxide-exo	1,79	5,37	17,9	98,42	7,26	7,37
164	heptenophos	1,11	3,33	11,1	91,39	4,66	5,10
165	hexachlorbenzene	0,33	0,99	3,3	99,38	9,70	9,76
166	hexaconazole	0,84	2,52	8,4	90,64	11,94	13,17
167	iprodion	0,54	1,62	5,4	104,66	5,64	5,39
168	iprodion-met_1	0,69	2,07	6,9	109,45	11,07	10,11
169	iprodion-met_2	0,43	1,29	4,3	115,32	13,51	11,72
170	isofenphos	0,56	1,68	5,6	99,93	11,05	11,06
171	isofenphos-methyl	0,49	1,47	4,9	97,95	5,15	5,26
172	isoxathion	0,34	1,02	3,4	82,23	6,35	7,73
173	kresoxim-methyl	0,39	1,17	3,9	93,49	9,21	9,85
174	lenacil	0,95	2,85	9,5	99,12	13,39	13,51
175	lindane	0,88	2,64	8,8	102,74	14,04	13,67

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
176	lufenuron	0,66	1,98	6,6	93,92	18,75	19,97
177	malathion	0,5	1,5	5	101,82	16,69	16,40
178	mecarbam	0,79	2,37	7,9	99,54	12,40	12,45
179	mefenpyr-diethyl	0,77	2,31	7,7	103,50	8,47	8,19
180	mepanipirim	0,69	2,07	6,9	100,76	15,76	15,64
181	mepronil	0,55	1,65	5,5	102,35	14,95	14,61
182	metalaxyl	0,61	1,83	6,1	99,63	11,55	11,59
183	metazachlor	0,62	1,86	6,2	100,75	12,56	12,46
184	metconazole	0,73	2,19	7,3	99,89	9,85	9,86
185	methidation	0,43	1,29	4,3	103,43	12,21	11,80
186	methoxychlor	0,82	2,46	8,2	108,42	4,73	4,36
187	metolachlor	0,68	2,04	6,8	87,07	6,47	7,43
188	metrafenone	0,77	2,31	7,7	96,73	15,81	16,35
189	metribuzin	0,62	1,86	6,2	79,79	6,21	7,78
190	mevinphos	0,95	2,85	9,5	96,09	13,84	14,41
191	myclobutanil	0,54	1,62	5,4	106,30	10,30	9,69
192	nitrofen	0,49	1,47	4,9	94,94	9,73	10,25
193	nitrothal-isopropyl	0,84	2,52	8,4	96,95	4,43	4,57
194	nuarimol	0,72	2,16	7,2	105,84	15,35	14,50
195	oxadiazon	0,63	1,89	6,3	87,71	9,03	10,29
196	oxadixyl	0,55	1,65	5,5	97,75	9,65	9,87
197	oxyflorfen	0,91	2,73	9,1	94,24	11,85	12,57
198	paclobutrazole	0,77	2,31	7,7	93,22	6,88	7,38
199	parathion	0,54	1,62	5,4	99,84	11,15	11,16
200	parathion-methyl	0,42	1,26	4,2	94,89	11,47	12,09
201	penconazole	0,62	1,86	6,2	96,54	3,97	4,11
202	pendimethalin	0,55	1,65	5,5	97,00	11,22	11,57
203	pentachloraniline	0,96	2,88	9,6	78,50	7,25	9,24
204	pentachloroanisole	0,81	2,43	8,1	90,06	6,55	7,27
205	permetrin-cis	0,77	2,31	7,7	95,86	7,87	8,21
206	permetrin-trans	0,82	2,46	8,2	88,72	4,59	5,17
207	phenthoate	0,88	2,64	8,8	91,01	5,58	6,13
208	phenylphenol,2-	0,63	1,89	6,3	99,49	9,67	9,71
209	phosalone	0,95	2,85	9,5	95,98	18,19	18,95
210	phosmet	0,84	2,52	8,4	101,05	8,86	8,77

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
211	picolinafen	0,87	2,61	8,7	99,41	8,36	8,41
212	picoxystrobin	0,49	1,47	4,9	103,16	10,36	10,04
213	piperonyl-butoxide	0,88	2,64	8,8	91,49	3,46	3,78
214	pirimifos-ethyl	0,64	1,92	6,4	94,05	14,22	15,11
215	pirimifos-methyl	0,96	2,88	9,6	78,50	7,25	9,24
216	procymidone	0,81	2,43	8,1	90,06	6,55	7,27
217	profenofos	0,77	2,31	7,7	95,86	7,87	8,21
218	profluralin	0,82	2,46	8,2	88,72	4,59	5,17
219	prometryn	0,65	1,95	6,5	88,45	6,33	7,16
220	propachlor	0,92	2,76	9,2	82,88	5,24	6,32
221	propargite	0,77	2,31	7,7	93,22	6,88	7,38
222	propiconazole-1	0,75	2,25	7,5	94,97	15,26	16,07
223	propiconazole-2	0,42	1,26	4,2	94,89	11,47	12,09
224	propyzamide	0,62	1,86	6,2	96,54	3,97	4,11
225	prosulfocarb	0,55	1,65	5,5	97,00	11,22	11,57
226	prothiofos	0,54	1,62	5,4	99,84	11,15	11,16
227	pyraflufen-ethyl	0,88	2,64	8,8	91,49	3,46	3,78
228	pyrazophos	0,84	2,52	8,4	90,64	11,94	13,17
229	pyridaben	0,51	1,53	5,1	98,55	10,20	10,35
230	pyridaphenthion	0,66	1,98	6,6	90,64	12,83	14,16
231	pyrifenox	0,75	2,25	7,5	94,97	15,26	16,07
232	pyrimethanil	0,49	1,47	4,9	97,95	5,15	5,26
233	pyriproxyfen	0,34	1,02	3,4	82,23	6,35	7,73
234	quilazifop-p-ethyl	0,39	1,17	3,9	93,49	9,21	9,85
235	quinalphos	0,39	1,17	3,9	90,55	3,20	3,53
236	quinoxifen	0,42	1,26	4,2	89,19	13,77	15,44
237	quintozene	0,49	1,47	4,9	103,16	10,36	10,04
238	silaflluofen	0,55	1,65	5,5	101,22	16,00	15,81
239	simazine	0,75	2,25	7,5	85,62	5,36	6,26
240	spiridiclofen	0,59	1,77	5,9	92,80	6,96	7,50
241	spiromesifen	0,89	2,67	8,9	86,60	3,07	3,55
242	spiroxamine-1	0,84	2,52	8,4	90,64	11,94	13,17
243	spiroxamine-2	0,77	2,31	7,7	96,73	15,81	16,35
244	sulphur	1,43	4,29	14,3	71,45	6,58	9,21
245	TDE,p,p	1,79	5,37	17,9	98,42	7,26	7,37

Çizelge 4.6. GC-MS/MS LOD-LOQ ve doğruluk (Ort) ve kesinlik (%RSD) değerleri (devamı)

Pestisitler		LOD & LOQ Değerleri			Doğruluk	Kesinlik	
		SD	LOD (3xSD)	LOQ (10xSD)	Ort	SD	%RSD
246	tebufenpyrad	0,77	2,31	7,7	88,64	6,41	7,23
247	tebupirimfos	0,82	2,46	8,2	92,88	2,65	2,85
248	tecnazene	0,35	1,05	3,5	80,45	3,32	4,12
249	tefluthrin	0,53	1,59	5,3	88,79	5,25	5,91
250	terbufos	0,85	2,55	8,5	81,01	6,90	8,52
251	terbutryn	0,79	2,37	7,9	84,66	5,89	6,96
252	terbutylazin	0,39	1,17	3,9	90,55	3,20	3,53
253	tetraconazole	0,54	1,62	5,4	81,91	2,23	2,72
254	tetradifon	0,62	1,86	6,2	82,04	2,50	3,05
255	tetrasul	0,69	2,07	6,9	96,31	15,13	15,71
256	thiometon	0,82	2,46	8,2	92,88	2,65	2,85
257	tolclofos-methyl	0,64	1,92	6,4	78,01	4,77	6,11
258	tri-allate	0,85	2,55	8,5	83,78	4,10	4,89
259	triazamate	0,49	1,47	4,9	108,04	11,22	10,39
260	triazophos	0,53	1,59	5,3	85,45	3,78	4,42
261	trifloxystrobin	0,73	2,19	7,3	70,31	4,76	6,77
262	triflumizole	0,76	2,28	7,6	83,96	1,83	2,18
263	trifluralin	0,88	2,64	8,8	103,68	3,31	3,19
264	triticonazole	0,88	2,64	8,8	84,22	2,45	2,91
265	vinclozolin	0,72	2,16	7,2	105,84	15,35	14,50
266	zoxamide	0,79	2,37	7,9	91,24	4,11	4,51

4.5. Metodun Ölçüm Belirsizliği

Pestisitlerin kalıntı analizlerinde, analiz sonuçlarının güvenilirliği kalite güvence ve kalite kontrol çalışmaları ile ispatlanmıştır. Yapılan bu çalışmaların en önemlilerinden biri de laboratuvardaki tüm basamaklardan gelen ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasıdır. “Uluslararası Standart Organizasyonu (ISO) 17025”, “ISO ölçüm Belirsizliği Açıklama Kılavuzu (GUM)” ve “EUREACHEM/CITAC Guide CG4” gibi uluslararası dokümanlar rehber olarak kullanılmış ve metodun ölçüm belirsizliği her bir analit için tek tek hesaplanmıştır. Analitik çalışmalarda yapılan ölçümler her zaman doğru ve kesin değildir. Bu nedenle ölçümlerdeki belirsizliklerin rakamsal olarak ifade edilmesi gereklidir. Ölçüm belirsizliği bir ölçümün gerçek değer ile ilgili olası dalgalanmaları tanımlayan istatistiksel yaklaşımdır (Meyer 2007, Miller ve Miller 2008).

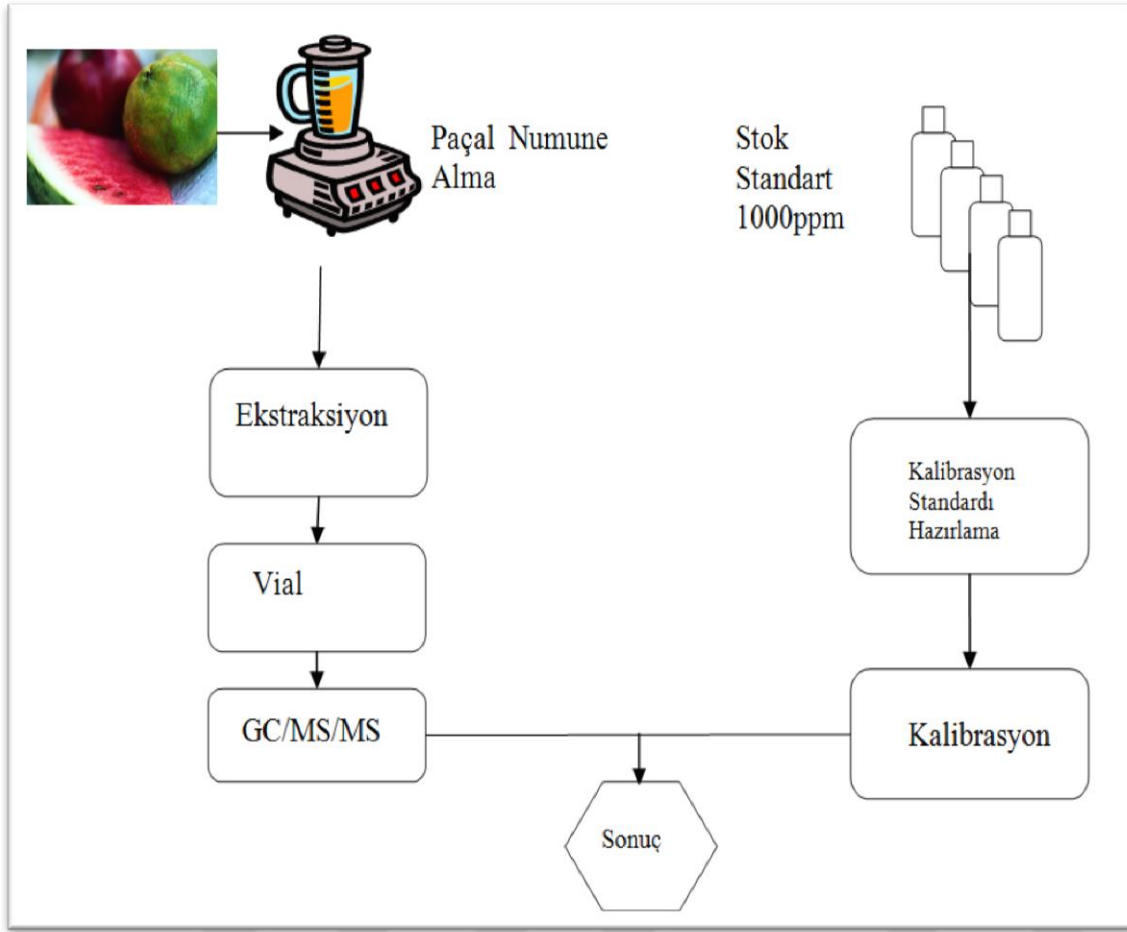
4.5.1. Belirsizlik tanımları

Belirsizlik: Bir ölçümde ölçülen kritere katkısı olan değerlerin dağılımını ifade eden istatistiksel bir yaklaşımdır. Birçok bileşeni bulunmakta olup bazıları bir seri ölçümün istatistiksel dağılımın standart sapmalarından belirlenebilmekte, bazıları ise önceki deneyim ve bilgilerin olasılık dağılımlarının değerlendirilmesinden yararlanılarak belirlenebilmektedir. (Anonymous 1995, Meyer 2007.)

Belirsizlik Kaynakları: Ölçüm belirsizliğinin birçok nedeni olabilmektedir. Bunlar; örnekleme, tartım ve hacimsel ekipmanların belirsizliği, matris etkisi, laboratuvar koşulları, cihazların belirsizliği, numune ön hazırlık, ekstraksiyon, kalibrasyon grafikleri ve kullanılan yazılım programının belirsizliği olarak sıralanabilmektedir (Maestroni 2005).

4.5.2. Belirsizlik kaynaklarını oluşturan analiz metodu akış şeması

Analiz esnasında numune hazırlama, cihazda kalibrasyon grafiğinin çizdirilmesi ve yapılan aşamalar şematik olarak Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Şekilde gösterilen her bir basamak ayrı ayrı belirsizlik kaynakları olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.19. Pestisit analiz metodu akış şeması

4.5.3. Belirsizlik hesaplama yöntemi

Temiz çözücünde standart karışım kalibrasyon çözeltileri kullanılarak pestisit miktarı belirlenmiştir. Matriks etkisi, matriksteki standardın, temiz çözücündeki kalibrasyon standartına göre relatif responsu olup aşağıdaki formüle (4.1) göre hesaplanmıştır (Anonymous 2009a):

$$Pestisit\ Miktarı = \frac{A_1}{A_2} \times \frac{A_3}{A_4} \times \frac{C}{G} \times V \quad (4.1)$$

A1 = Numune ekstratındaki pestisit pikinin alanı

A2 = Standart karışım kalibrasyon çözeltisindeki pestisit pikinin alanı

A3 = Standart karışım kalibrasyon çözeltisindeki internal standardın alanı

A4 = Numune ekstraktındaki internal standardın alanı

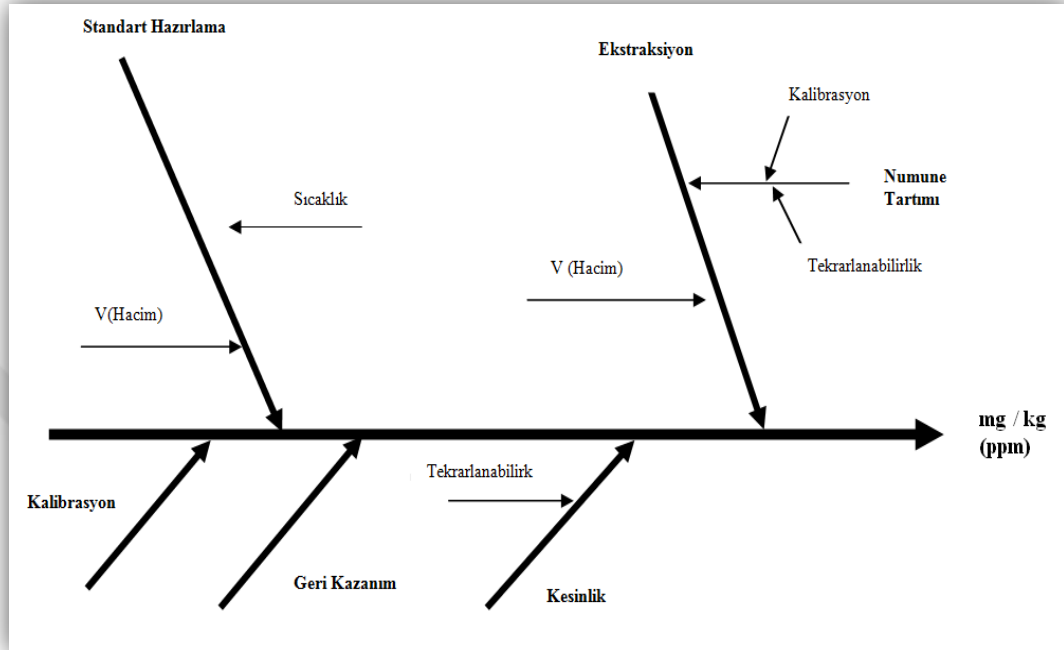
C = Standart karışım kalibrasyon çözeltisindeki pestisit miktarı µg/L (pg/µL)

G = Ekstrakttaki numune miktarı mg/mL

V = Son ekstrakta uygulanan seyreltme faktörü

4.5.4. Belirsizlik bileşenlerinin kılçık diyagramında gösterilmesi

Geliştirilen metot ile numune çalışılırken her bir işlem için ayrı ölçüm belirsizlikleri tespit edilmiştir. Hazırlanan ölçüm belirsizliği balık kılçığı diyagramını Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Ölçüm belirsizliği balık kılçığı diyagramı

4.5.5. Ölçüm belirsizliği hesaplama uygulaması

4.5.5.1. Tartımdan gelen ölçüm belirsizliğinin hesaplanması

Kalibrasyon sertifikasından yararlanılarak analitik teraziden kaynaklanan belirsizlik hesaplanmıştır. Kalibrasyon sertifikasındaki belirsizlik, terazi için anlamlı olan sapmayı ifade etmektedir. Teraziden gelen belirsizlik hesaplanırken tekrarlanabilirlikten gelen standart sapma tüm aşamaların tekrarlanabilirliği ile işleme katıldığından ve de ayrıca hesaplandığından dolayı tekrarlanabilirlik kriteri ihmal edilmiş ve aşağıdaki formüle (4.2) göre hesaplanmıştır (Miller ve Miller 2008).

15 g numune tartılıp bir sonraki aşamaya geçilmiştir;

$$U_{Terazi} = \sqrt{(U_{kalibrasyon})^2 + (U_{tekrarlanabilirlik})^2} \quad (4.2)$$

$$U_{Terazi} = 8,165E - 03 + 2,327 E - 04 \times W$$

$$U_{Terazi} = 8,165E - 03 + 2,327 E - 04 \times 15 = 0,014 \text{ g}$$

$$W = 15 \text{ g}$$

15 gram numune tartımından gelen hata 0,014 g olarak hesaplanmıştır.

4.5.5.2. Hacimden gelen ölçüm belirsizliğinin hesaplanması

100-1000 µl Transfer pipetin Belirsizlik Hesabı;

$$U_{Vkal} = 0,545002475 + 0,001817 \times h$$

$$h = 750 \mu l$$

$$U_{Vkal} = 0,545002475 + 0,001817 \times 750 = 0,742 \mu l$$

$$U_T = V \times \Delta T \times 2,1 \times 10^{-4} = 750 \times 2,1 \times 10^{-4} = 0,1575 \mu l$$

Otomatik pipetler için dikdörtgen dağılımı metodu kullanılmıştır (Miller ve Miller 2008);

$$U_T = \frac{0,1575}{\sqrt{3}} = 0,0909 \mu l$$

100-1000 µl Transfer pipet kullanılarak işlem gerçekleştirilmiştir. Etkili olan belirsizlik, aşağıdaki hesaplama göre yapılmıştır.

$$UV = \sqrt{(U_T)^2 + (U_{Kal})^2}$$

$$UV = \sqrt{(0,1575)^2 + (0,742)^2}$$

$$UV_{100-1000 \mu l \text{ _transferpipet}} = 0,758 \mu l$$

20-200 µl Transfer Pipetin Belirsizlik Hesabı;

$$U_{Vkal} = 0,054500248 + 0,0018167 \times h$$

$$h = 200 \mu l$$

$$U_{Vkal} = 0,054500248 + 0,0018167 \times h = 0,417 \mu l$$

$$U_T = V \times \Delta T \times 2,1 \times 10^{-4} = 200 \times 2,1 \times 10^{-4} = 0,042 \mu l$$

Otomatik pipetler için dikdörtgen dağılımı metodu kullanılmıştır (Miller ve Miller 2008);

$$U_T = \frac{0,042}{\sqrt{3}} = 0,0242 \mu l$$

20-200 µl transfer pipet kullanılarak işlem uygulanmıştır. Etkili olan belirsizlik aşağıdaki hesaplama göre yapılmıştır.

$$UV = \sqrt{(U_T)^2 + (U_{Kal})^2}$$

$$UV = \sqrt{(0,0242)^2 + (0,417)^2}$$

$$UV_{20-200\mu l_transferpipet} = 0,418\mu l$$

100 µl Enjektör Şırınganın Belirsizlik Hesabı;

GC-MS/MS cihazının numune enjeksiyonunu gerçekleştiren 100 µl hacimli enjektörün ölçüm belirsizliği Çizelge 4.7’de hesaplanmıştır (Miller ve Miller 2008).

Çizelge 4.7. 100 µl Enjektör şırınganın belirsizlik değerleri

100 µl şırınga Ölçümü		
	m (g)	V (µl)
1. Ölçüm	0,0999	100,2
2. Ölçüm	0,1002	100,5
3. Ölçüm	0,1001	100,4
4. Ölçüm	0,0998	100,1
5. Ölçüm	0,0994	99,7
6. Ölçüm	0,0998	100,1
	Xort	100,1
	Sd	0,281
	%Rsd	0,00281

Buraya kadar olan ön işlemlerden gelen belirsizlikler tüm pestisitlerde aynı olup tartım ve hacimden gelen hata hesaplamalarında ortak olarak kullanılmıştır. Elde edilen metotta analizi yapılan tüm pestisitlerin her birine ait ayrı ayrı ölçüm belirsizlikleri hesaplanmıştır. Hesaplamaların nasıl yapıldığının gösterilebilmesi için alachlor pestisiti için yapılan hesaplamalar aşağıda örnek olarak gösterilmiştir. Bu hesaplama metodu kullanılarak pestisitlere ait ölçüm belirsizlikleri hesaplanmış olup Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Pestisitlere ait hesaplanan ölçüm belirsizlikleri

Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)	Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)
1 acetochlor	7,9	$X \pm 0,08X$	36 butylate	11,0	$X \pm 0,11X$
2 acibenzolar-S-methyl	12,1	$X \pm 0,12X$	37 cadusafos	12,8	$X \pm 0,13X$
3 aclonifen	6,8	$X \pm 0,07X$	38 captafol	11,2	$X \pm 0,11X$
4 acrinathrin	11,2	$X \pm 0,11X$	39 captan	15,1	$X \pm 0,15X$
5 alachlor	8,6	$X \pm 0,09X$	40 captan (met)	18,2	$X \pm 0,18X$
6 aldrin	12,8	$X \pm 0,13X$	41 carbophenthion	7,9	$X \pm 0,08X$
7 allethrin	14,8	$X \pm 0,15X$	42 carbosulfan	12,1	$X \pm 0,12X$
8 amitraz	8,8	$X \pm 0,09X$	43 chlorbenzilate	6,8	$X \pm 0,07X$
9 diethatyl Etyl	7,9	$X \pm 0,08X$	44 chlordane,alfa	11,2	$X \pm 0,11X$
10 arcrinathrin	8,1	$X \pm 0,08X$	45 chlordane,gamma	15,9	$X \pm 0,16X$
11 atrazine	13,6	$X \pm 0,14X$	46 chlorfenapyr	11,1	$X \pm 0,11X$
12 azaconazole	14,1	$X \pm 0,14X$	47 chlorfenvinphos	8,1	$X \pm 0,08X$
13 azinphos-ethyl	19,8	$X \pm 0,20X$	48 chlormephos	13,6	$X \pm 0,14X$
14 azobenzene	18,0	$X \pm 0,18X$	49 chlorothalonil	14,1	$X \pm 0,14X$
15 azoxystrobin	12,8	$X \pm 0,13X$	50 chlorprofam	19,8	$X \pm 0,20X$
16 benalaxyl	14,5	$X \pm 0,15X$	51 chlorpyrifos	18,0	$X \pm 0,18X$
17 bendiocarb	6,6	$X \pm 0,07X$	52 chlorpyrifos-methyl	14,5	$X \pm 0,15X$
18 benfluralin	9,1	$X \pm 0,09X$	53 chlorthal-dimethyl	6,6	$X \pm 0,07X$
19 benfuresate	8,8	$X \pm 0,09X$	54 chlorthiophos	6,6	$X \pm 0,07X$
20 benthocarb	10,6	$X \pm 0,11X$	55 chlozolate	9,1	$X \pm 0,09X$
21 bifenthrin	11,5	$X \pm 0,12X$	56 clofentezine	8,8	$X \pm 0,09X$
22 bioallethrin	11,2	$X \pm 0,11X$	57 coumaphos	10,6	$X \pm 0,11X$
23 biphenyl	10,8	$X \pm 0,11X$	58 cyanazine	11,4	$X \pm 0,11X$
24 bitertanol-1	15,7	$X \pm 0,16X$	59 cyanophos	11,5	$X \pm 0,12X$
25 bitertanol-2	11,3	$X \pm 0,11X$	60 cycloate	11,2	$X \pm 0,11X$
26 boscalid	10,5	$X \pm 0,11X$	61 cyfluthrin-alpha	10,8	$X \pm 0,11X$
27 bromacil	8,1	$X \pm 0,08X$	62 cyfluthrin-beta	15,7	$X \pm 0,16X$
28 bromophos	9,7	$X \pm 0,10X$	63 cyfluthrin-teta	15,9	$X \pm 0,16X$
29 bromopropylate	10,0	$X \pm 0,10X$	64 cyfluthrin-zeta	9,9	$X \pm 0,10X$
30 bromuconazole-1	10,8	$X \pm 0,11X$	65 cyhalothrin,lambd	10,2	$X \pm 0,10X$
31 bromuconazole-2	10,6	$X \pm 0,11X$	66 cypermethrin-alpha	10,8	$X \pm 0,11X$
32 bupirimate	17,7	$X \pm 0,18X$	67 cypermethrin-beta	11,2	$X \pm 0,11X$
33 buprofezin	14,5	$X \pm 0,15X$	68 cypermethrin-teta	14,8	$X \pm 0,15X$
34 butachlor	10,6	$X \pm 0,11X$	69 cypermethrin-zeta	10,9	$X \pm 0,11X$
35 butralin	15,2	$X \pm 0,15X$	70 cyproconazole	15,2	$X \pm 0,15X$

Bu çizelgede X, analiz sonucu bulunan kalıntı miktarını temsil etmektedir.

Çizelge 4.8. Pestisitlere ait ölçüm belirsizlikleri (devamı)

Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)	Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)
71 cyprodinil	15,7	$X \pm 0,16X$	106 endosulfan-alpha	7,9	$X \pm 0,08X$
72 DDD,o,p	10,6	$X \pm 0,11X$	107 endosulfan-beta	8,1	$X \pm 0,08X$
73 DDD,o,p	11,2	$X \pm 0,11X$	108 endosulfan-sulfate	10,8	$X \pm 0,11X$
74 DDE,o,p	15,1	$X \pm 0,15X$	109 endrin	19,9	$X \pm 0,20X$
75 DDE,p,p	18,2	$X \pm 0,18X$	110 EPN	11,3	$X \pm 0,11X$
76 DDT,o,p	8,1	$X \pm 0,08X$	111 epoxiconazole	13,8	$X \pm 0,14X$
77 DDT,p,p	12,1	$X \pm 0,12X$	112 esfenvalerate (RR+SS)	8,1	$X \pm 0,08X$
78 deltamethrin	6,8	$X \pm 0,07X$	113 etaconazole	9,7	$X \pm 0,10X$
79 diazinon	11,2	$X \pm 0,11X$	114 ethion	6,8	$X \pm 0,07X$
80 dichlooranilline-3,5	15,9	$X \pm 0,16X$	115 ethofumesate	10,8	$X \pm 0,11X$
81 dichlorfenthion	11,1	$X \pm 0,11X$	116 ethoprosfos	11,2	$X \pm 0,11X$
82 dichlormid	9,7	$X \pm 0,10X$	117 ethoxyquin	17,7	$X \pm 0,18X$
83 dichlorophen	13,6	$X \pm 0,14X$	118 etofenprox	11,1	$X \pm 0,11X$
84 diclobutrazol	14,1	$X \pm 0,14X$	119 etoxazole	10,6	$X \pm 0,11X$
85 dicloran	19,8	$X \pm 0,20X$	120 etridiazole	10,8	$X \pm 0,11X$
86 dicofol	18,0	$X \pm 0,18X$	121 etrimfos	15,7	$X \pm 0,16X$
87 dicofol (met)	14,5	$X \pm 0,15X$	122 fenamindone	13,9	$X \pm 0,14X$
88 dieldrin	6,6	$X \pm 0,07X$	123 fenarimol	19,6	$X \pm 0,20X$
89 diethatyl Etyl	6,6	$X \pm 0,07X$	124 fenazaquin	10,2	$X \pm 0,10X$
90 diethofencarb	9,1	$X \pm 0,09X$	125 fenbuconazole	14,9	$X \pm 0,15X$
91 difenconazole-1	8,8	$X \pm 0,09X$	126 fenchlorphos	10,6	$X \pm 0,11X$
92 difenconazole-2	13,6	$X \pm 0,14X$	127 fenithrothion	14,0	$X \pm 0,14X$
93 dimethachlor	15,8	$X \pm 0,16X$	128 fenobucarb	14,5	$X \pm 0,15X$
94 dimethipin	12,8	$X \pm 0,13X$	129 fenoxycarb	8,3	$X \pm 0,08X$
95 dimethomorph-1	12,9	$X \pm 0,13X$	130 fenoxypop-p-ethyl	15,2	$X \pm 0,15X$
96 dimethomorph-2	13,9	$X \pm 0,14X$	131 fenciclonil	11,3	$X \pm 0,11X$
97 dimoxystrobin	8,1	$X \pm 0,08X$	132 fenpropathrin	10,5	$X \pm 0,11X$
98 dinitramine	10,9	$X \pm 0,11X$	133 fenpropimorph	10,0	$X \pm 0,10X$
99 dinobuton	14,1	$X \pm 0,14X$	134 fenson	9,7	$X \pm 0,10X$
100 diphenylamine	13,2	$X \pm 0,13X$	135 fensulfothion	11,1	$X \pm 0,11X$
101 disulfoton	18,0	$X \pm 0,18X$	136 fenvalerate (RS+SR)	12,9	$X \pm 0,13X$
102 ditalimfos	14,2	$X \pm 0,14X$	137 fipronil	13,6	$X \pm 0,14X$
103 dithiopyr	14,5	$X \pm 0,15X$	138 fluazifop-butyl	13,8	$X \pm 0,14X$
104 dodemorph-1	8,3	$X \pm 0,08X$	139 flucythrinate-1	18,0	$X \pm 0,18X$
105 dodemorph-2	9,1	$X \pm 0,09X$	140 flucythrinate-2	12,7	$X \pm 0,13X$

Bu çizelgede X, analiz sonucu bulunan kalıntı miktarını temsil etmektedir.

Çizelge 4.8. Pestisitlere ait ölçüm belirsizlikleri (devamı)

Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)	Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)
141 fludioxonil	12,1	$X \pm 0,12X$	176 lufenuron	14,8	$X \pm 0,15X$
142 flumetralin	11,2	$X \pm 0,11X$	177 malathion	8,8	$X \pm 0,09X$
143 flumioxazin	14,3	$X \pm 0,14X$	178 mecarbam	7,9	$X \pm 0,08X$
144 fluorochloridone-1	13,3	$X \pm 0,13X$	179 mefenpyr-diethyl	8,1	$X \pm 0,08X$
145 fluorochloridone-2	18,1	$X \pm 0,18X$	180 mepanipyrim	13,6	$X \pm 0,14X$
146 fluquinconazole	14,0	$X \pm 0,14X$	181 mepronil	14,1	$X \pm 0,14X$
147 flurprimidol	14,5	$X \pm 0,15X$	182 metalaxyl	19,8	$X \pm 0,20X$
148 flusilazole	11,3	$X \pm 0,11X$	183 metazachlor	18,0	$X \pm 0,18X$
149 flutolanil	8,8	$X \pm 0,09X$	184 metconazole	12,8	$X \pm 0,13X$
150 flutriafol	13,6	$X \pm 0,14X$	185 methidation	14,5	$X \pm 0,15X$
151 fluvalinate,tau-1	15,8	$X \pm 0,16X$	186 methoxychlor	6,6	$X \pm 0,07X$
152 fluvalinate,tau-2	12,8	$X \pm 0,13X$	187 metolachlor	9,1	$X \pm 0,09X$
153 folpet	12,9	$X \pm 0,13X$	188 metrafenone	8,8	$X \pm 0,09X$
154 folpet (met)	14,7	$X \pm 0,15X$	189 metribuzin	10,6	$X \pm 0,11X$
155 formothion	13,6	$X \pm 0,14X$	190 mevinphos	11,5	$X \pm 0,12X$
156 fuberidazole	14,1	$X \pm 0,14X$	191 myclobutanil	11,2	$X \pm 0,11X$
157 furalaxyl	19,8	$X \pm 0,20X$	192 nitrofen	18,2	$X \pm 0,18X$
158 halfenprox	18,0	$X \pm 0,18X$	193 nitrothal-isopropyl	7,9	$X \pm 0,08X$
159 HCH-alpha	14,5	$X \pm 0,15X$	194 nuarimol	12,1	$X \pm 0,12X$
160 HCH-beta	6,6	$X \pm 0,07X$	195 oxadiazon	6,8	$X \pm 0,07X$
161 heptachlor	6,6	$X \pm 0,07X$	196 oxadixyl	11,2	$X \pm 0,11X$
162 heptachloreperoxide-endo	14,3	$X \pm 0,14X$	197 oxyflorfen	15,9	$X \pm 0,16X$
163 heptachloreperoxide-exo	18,0	$X \pm 0,18X$	198 paclobutrazole	11,1	$X \pm 0,11X$
164 heptenophos	8,4	$X \pm 0,08X$	199 parathion	8,1	$X \pm 0,08X$
165 hexachlorbenzene	12,3	$X \pm 0,12X$	200 parathion-methyl	13,6	$X \pm 0,14X$
166 hexaconazole	6,9	$X \pm 0,07X$	201 penconazole	14,1	$X \pm 0,14X$
167 iprodion	11,1	$X \pm 0,11X$	202 pendimethalin	18,0	$X \pm 0,18X$
168 iprodion-met_1	15,7	$X \pm 0,16X$	203 pentachloraniline	14,5	$X \pm 0,15X$
169 iprodion-met_2	11,4	$X \pm 0,11X$	204 pentachloroanisole	6,6	$X \pm 0,07X$
170 isofenphos	9,9	$X \pm 0,10X$	205 permethrin-cis	6,6	$X \pm 0,07X$
171 isofenphos-methyl	9,3	$X \pm 0,09X$	206 permethrin-trans	9,1	$X \pm 0,09X$
172 isoxathion	10,9	$X \pm 0,11X$	207 phenthoate	8,8	$X \pm 0,09X$
173 kresoxim-methyl	11,3	$X \pm 0,11X$	208 phenylphenol,2-	13,6	$X \pm 0,14X$
174 lenacil	15,3	$X \pm 0,15X$	209 phosalone	15,8	$X \pm 0,16X$
175 lindane	15,1	$X \pm 0,15X$	210 phosmet	12,2	$X \pm 0,12X$

Bu çizelgede X, analiz sonucu bulunan kalıntı miktarını temsil etmektedir.

Çizelge 4.8. Pestisitlere ait ölçüm belirsizlikleri (devamı)

Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)	Pestisitler	% Ölçüm Belirsizliği	Raporlama Formülü (ng/g)
211 picolinafen	11,4	$X \pm 0,11X$	246 tebufenpyrad	8,1	$X \pm 0,08X$
212 picoxystrobin	11,2	$X \pm 0,11X$	247 tebupirimfos	13,6	$X \pm 0,14X$
213 piperonyl-butoxide	15,1	$X \pm 0,15X$	248 tecnazene	14,1	$X \pm 0,14X$
214 pirimifos-ethyl	18,2	$X \pm 0,18X$	249 tefluthrin	19,8	$X \pm 0,20X$
215 pirimifos-methyl	8,1	$X \pm 0,08X$	250 terbufos	18,0	$X \pm 0,18X$
216 procymidone	12,1	$X \pm 0,12X$	251 terbutryn	14,5	$X \pm 0,15X$
217 profenofos	6,8	$X \pm 0,07X$	252 terbutylazin	6,6	$X \pm 0,07X$
218 profluralin	11,2	$X \pm 0,11X$	253 tetraconazole	6,6	$X \pm 0,07X$
219 prometryn	15,9	$X \pm 0,16X$	254 tetradifon	9,1	$X \pm 0,09X$
220 propachlor	11,1	$X \pm 0,11X$	255 tetrasul	11,2	$X \pm 0,11X$
221 propargite	9,7	$X \pm 0,10X$	256 thiometon	17,7	$X \pm 0,18X$
222 propiconazole-1	13,6	$X \pm 0,14X$	257 tolclofos-methyl	11,1	$X \pm 0,11X$
223 propiconazole-2	14,1	$X \pm 0,14X$	258 tri-allate	10,6	$X \pm 0,11X$
224 propyzamide	19,8	$X \pm 0,20X$	259 triazamate	10,8	$X \pm 0,11X$
225 prosulfocarb	10,5	$X \pm 0,11X$	260 triazophos	15,7	$X \pm 0,16X$
226 prothiofos	8,1	$X \pm 0,08X$	261 trifloxystrobin	15,8	$X \pm 0,16X$
227 pyraflufen-ethyl	9,7	$X \pm 0,10X$	262 triflumizole	12,8	$X \pm 0,13X$
228 pyrazophos	10,0	$X \pm 0,10X$	263 trifluralin	12,9	$X \pm 0,13X$
229 pyridaben	10,8	$X \pm 0,11X$	264 triticonazole	13,9	$X \pm 0,14X$
230 pyridaphenthion	10,6	$X \pm 0,11X$	265 vinclozolin	11,3	$X \pm 0,11X$
231 pyrifenox	17,7	$X \pm 0,18X$	266 zoxamide	13,8	$X \pm 0,14X$
232 pyrimethanil	14,5	$X \pm 0,15X$			
233 pyriproxyfen	10,6	$X \pm 0,11X$			
234 quilazifop-p-ethyl	9,1	$X \pm 0,09X$			
235 quinalphos	8,8	$X \pm 0,09X$			
236 quinoxifen	10,6	$X \pm 0,11X$			
237 quintozene	11,4	$X \pm 0,11X$			
238 silafluofen	11,5	$X \pm 0,12X$			
239 simazine	11,2	$X \pm 0,11X$			
240 spiridiclofen	10,8	$X \pm 0,11X$			
241 spiromesifen	15,7	$X \pm 0,16X$			
242 spiroxamine-1	15,9	$X \pm 0,16X$			
243 spiroxamine-2	9,9	$X \pm 0,10X$			
244 sulphur	15,9	$X \pm 0,16X$			
245 TDE,p,p	12,6	$X \pm 0,13X$			

Bu çizelgede X, analiz sonucu bulunan kalıntı miktarını temsil etmektedir.

4.5.5.3. Örnek olarak alachlor için hesaplanan ölçüm belirsizliği

4.5.5.3.1. Alachlor referans standarttan gelen ölçüm belirsizliği

Dr. Ehrenstorfer GmbH firmasından temin edilen Alachlor referans standardının sertifikasında standart saflık belirsizliği % 99,5 ± 0,2 (Güven aralığı k=2) olarak verilmiş ve aşağıdaki verilen formüle (4.3) göre hesaplanmıştır (Miller ve Miller 2008)..

$$U_{\text{Referans Standart}} = \frac{0,2}{2} = 0,1 \quad (4.3)$$

Referans standarttan gelen ölçüm belirsizliği 0,1'dir.

4.5.5.3.2 Alachlor için kesinlik çalışmalarından gelen ölçüm belirsizlikleri

Kalibrasyon Eğrisinden Gelen Belirsizlik (4.4) formülüne göre hesaplanmıştır (Miller ve Miller 2008).;

$$U_{(\text{kalibrasyon})} = \frac{S_{xy}}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x} - x_i)^2}{S_{xx}}} \quad (4.4)$$

Kalibrasyon eğrisi belirsizliği; S_{xy} , a,b değerleri Kalibrasyon grafiğinden ve regrasyon istatistiki işleminden yararlanılarak bulunmuştur (Miller ve Miller 2008). Hesaplamalar Microsoft Office 2010 Excel yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Regresyon analizi sonucu elde edilen koeficient katsayıları $(Co/Cort)^2$ ve regrasyon değerleri sırasıyla Çizelge 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Kalibrasyon grafiği koeficient katsayısı hesaplamaları

Alachlor Analit Konsantrasyonu	Alachlor Alanı / İSTD Alanı Oranı	Alachlor Alanı	ISTD Alanı	Hesaplanan Konsantrasyon	$(Co/Cort)^2$
10 ng/g	0,0982504	432320	4400188	10,34 ng/g	4311,672069
20 ng/g	0,200684594	729449	3634803	20,52 ng/g	3078,421764
50 ng/g	0,498587756	1698517	3406656	50,12 ng/g	669,6833386
100 ng/g	0,982858247	3496240	3557217	98,25 ng/g	494,9745883
200 ng/g	2,014556629	7466039	3706046	200,78 ng/g	15569,31641
Ortalama= 76					24124,06817

Çizelge 4.10. Kalibrasyon grafiği regrasyon istatistik hesaplamaları

a (regresyon doğrusunun y eksenini kesişim noktası)	-0,005762395
Sxy (sapma oranı)	0,011717768
b (regresyon doğrusunun eğimi)	0,010062499
p (toplam tayin sayısı)	5
n (tayin tekrarı)	1
Co (seçilen konsantrasyon)	85
Cort (ortalama konsantrasyon)	76
Sxx (sapma değeri)	24124,06817
$(Co-Cort)^2$	81
$1/p+1/n+((Co-Cort)^2/Sxx)$	1,203357643
Sxy/b	1,164499
$U_{(Co)}$ (kalibrasyon eğrisi belirsizliği)	1,277427903

4.5.5.3.3. Geri kazanım çalışmalarından gelen belirsizlik

10 ve 100 ng/g konsantrasyon içerecek şekilde numune hazırlanmış olup, geri kazanımları ve standart sapmaları ile ilgili hesaplamalar Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Alachlor geri kazanım değerleri ve relatif standart sapma değerleri

Geri Kazanım	1.Deney	2.Deney	3.Deney	4.Deney	5.Deney	X_{ort}	Std Sapma	%RSD
10 ng/g	11,501	11,412	11,556	10,078	11,093	11,131	0,476	4,280
	6.Deney	7.Deney	8.Deney	9.Deney	10.Deney			
	11,271	11,275	11,563	10,962	10,603			

Geri Kazanım	1.Deney	2.Deney	3.Deney	4.Deney	5.Deney	X _{ort}	Std Sapma	%RSD
100 ng/g	104,889	110,162	104,004	103,102	104,239	106,383	4,035	3,808
	6.Deney	7.Deney	8.Deney	9.Deney	10.Deney			
	109,614	104,790	100,462	113,826	108,737			
							Geri Kazanım	4,044

4.5.5.3.4. Alachlor için birleşik ve genişletilmiş belirsizlik

Alachlor pestisitinin nihai ölçüm belirsizliğinin hesaplanabilmesi için herhangi bir numunede temsili bir kalıntı miktarı tanımlanmıştır. Temsili olarak Alachlor kalıntı miktarı 85 ng/g olarak kabul edilmiştir.

Alachlor kalıntı miktarı 85 ng/g için bileşke belirsizlik aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Alachlor için hesaplanan belirsizlikler, aşağıda verilen formül (4.5) kullanılarak birleştirilmiştir (Miller ve Miller 2008).

$$\frac{U_{C_{alachlor}}}{C_{alachlor}} = \sqrt{\left(\frac{U_X}{X}\right)_{\text{stok.çzlt}}^2 + \left(\frac{U_V}{V}\right)_{100-100\mu\text{l transferpipet hacmi}}^2 + \left(\frac{U_V}{V}\right)_{100-100\mu\text{l transferpipet hacmi}}^2 + \left(\frac{U_V}{V}\right)_{100\mu\text{l şırınga hacmi}}^2 + \left(\frac{U_M}{M}\right)_{\text{tartım}}^2 + \left(\frac{U_X}{X}\right)_{\text{kalibrasyon}}^2 + \left(\frac{U_X}{X}\right)_{\text{gerikazanım}}^2}$$

$$\frac{U_{C_{alachlor}}}{C_{alachlor}} = \sqrt{\left(\frac{0,15}{50}\right)^2 + \left(\frac{0,758}{750}\right)^2 + \left(\frac{0,418}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,281}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,014}{25}\right)^2 + \left(\frac{1,2774}{85}\right)^2 + \left(\frac{0,0404}{1}\right)^2} \quad (4.5)$$

$$\frac{U_{C_{alachlor}}}{C_{alachlor}} = 0,0432$$

$$C_{alachlor} = 85 \mu\text{g/kg}$$

$$U_{C_{alachlor}} = 85 \times 0,0432 = 3,678$$

$$\% 95 \text{ Güven aralığında} \rightarrow k = 2 \text{ 'dir}$$

$$U_{C_{alachlor}} = 3,678 \times 2 = 7,356 \approx 7,4$$

$$C_{alachlor} = 85 \pm 7,4 \mu\text{g/kg} \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Numunedeki Alachlor miktarı $0,085 \pm 0,007 \text{ mg / kg}$ olarak raporlanmıştır.

Belirsizlik hesabı yapılırken % 95 güven aralığında ($k=2$) verilmiştir.

Metoda yazılacak ölçüm belirsizliği;

$$C_{alachlor} = 100 \pm 8,6 \mu\text{g/kg} \text{ olarak bulunmuştur.}$$

$$C_{Alachlor} = X \pm 0,09 \times X \quad \text{ölçüm sonucu olarak raporlanmıştır.}$$

Bu hesaplamada X, analiz sonucu bulunan kalıntı miktarını temsil etmektedir.

5. SONUÇ

Bu araştırma sonucunda gıdalarda 266 adet pestisit tespiti için doğru ve güvenilir sonuçlar veren bir analiz metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz metodu kullanılarak standart etken maddesi temin edilebilen ve gaz kromatografisi ile uyumlu tüm pestisitleri belirlemek mümkündür. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar, gaz kromatografisi ile uyumlu pestisitlerin sadece bir kısmını analiz etmeye yönelik çalışmalardır. Etken madde sayısının çokluğu açısından bu çalışma kapsamında geliştirilen metodun en iyi metotlardan biri olduğu değerlendirilmektedir.

Geliştirilen metodun performans ölçütlerini değerlendirmek amacıyla metod validasyonu ve ölçüm belirsizliği çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada doğrusal çalışma aralığı, tespit limiti ve ölçüm limiti değerleri ile geri kazanım çalışması yöntemi kullanılarak doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda 266 adet pestisit analizini 23 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirebilen bir metod elde edilmiştir. Metodun pestisitler için elde edilen LOQ değerleri 3,3-18,5 ng/g aralığındadır. Ortalama geri kazanımlar ise % 70,31 ile % 115,32 aralığında elde edilmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ölçüm belirsizliği değerleri de % 6,6 ile % 19,8 aralığındadır.

Metot validasyon çalışmasından elde edilen değerler geliştirilen metodun doğru, güvenilir ve kesin sonuçlar verdiğini göstermektedir. Analizi yapılan tüm pestisitler için bu çalışmada olduğu gibi geliştirilen metotların bu konudaki denetim ve izleme çalışmaları yapan kurumlara ve akademik çalışmalara bir katkı sunacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- AHMED, F. E. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trend in Analytical Chemistry*, 20 (11): 649-659.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D. ve SCHENCK, F.J. 2002. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for the Determination of Pesticide Residues. Florida Pesticide Residue Workshop.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D. ve 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.
- ANONİM, 2014. Resmî Gazete, 29099. Türk Gıda Kodeksi. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/08/20140825M1-1.htm>
- ANONYMOUS, 1995. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO, Geneva, 1995, ISBN92-67-10188-9. (Reprinted 1995).
- ANONYMOUS, 2005. Extraction of Organic Analytes from Foods A Manual of Methods. Ron Self, University of East Anglia, Norwich.
- ANONYMOUS, 2007a. Fundamentals of Analytical Toxicology. Robert J Flanagan Department of Clinical Biochemistry, King’s College Hospital NHS Foundation Trust, London.
- ANONYMOUS, 2007b. Mass Spectrometry, Principles and Applications Third Edition Edmond de Hoffmann Universit’e Catholique de Louvain, Belgium & Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium Vincent Stroobant Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels.
- ANONYMOUS, 2009a. Pesticide Analyzer Reference. Thermo Fisher Scientific Inc. :182.
- ANONYMOUS, 2009b. TSQ Series operator’s manual. Thermo Fisher Scientific Inc. 122 p. USA.
- ANONYMOUS, 2011. Analytical Quality Control – Guidelines for the publication of analytical results of chemical analyses in foodstuffs NMKL Protocol No. 5, 2011. <http://www.nmkl.org/attachments/article/50/Protocol%20No%205%20QCguideline%202011-10-11.pdf>. (Ulasim: 01.05.2017).
- ANONYMOUS, 2012a. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, 3rd Edition, (QUAM:2000.P1)

https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
(Ulaşım: 01.11.2016).

ANONYMOUS 2012b. Thermo scientific material catalogue: Sample preparation.
Thermo Scientific Inc. 1-80, USA.

ANONYMOUS 2012c. Datapool of The EU Reference Laboratories For Residues of
Pesticides. <http://www.crl-pesticides-datapool.eu/>. (Ulaşım: 20.11.2016).

ANONYMOUS 2013. Guidance document on analytical quality control and
validation procedures for pe residues analysis in food and feed.
SANCO/12571/2013. : 10- 12
http://www.eurlpesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf (Ulaşım: 01.11.2016).

CABRAS, P. 2003. Pesticides: Toxicology and Residues in Food. Food Safety:
Contaminants and Toxins. J P F D'Mello (Editor), Scottish Agricultural
College, Edinburgh.

COCHRAN, J., COX, C. ve DORMAN, F. 2002. Fast Gas Chromatography- Time-of-
Flight Mass Spectrometry of Pesticides in Fruits and Vegetables. Florida
Pesticide Residue Workshop.

COLOSIO, C., TIRAMANI, M. and MARONI, M. 2003. Neurobehavioral Effects of
Pesticides: State of the Art. *NeuroToxicology*, 24 (2003): 577–591.

DELEN, N., DURMUŞOĞLU, E., GÜNCAN, A., GÜNGÖR, N., TURGUT, C. ve
BURÇAK A. 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda
duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik
Kongresi, :629-648, Ankara.

DE PINHO, G.P., NEVES, A.A., DE QUEIROZ, M.E.L.R. ve SILVERIO, F.O. 2010.
Pesticide determination in tomatoes by solid–liquid extraction with purification
at low temperature and gas chromatography. *Food Chemistry*, 121 (2010): 251–
256.

FILLION, J., HINDLE, R., LACROIX, M. ve SELWYN, J. 1995. Multiresidue
determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatpgraphy –
mass selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection,
Journal of AOAC International, Vol. 78, No. 5, 1252 – 1266.

FILLION, J. ve THORP, J. 1995. Multi- Pesticide Residue Analysis Utilizing SIM
GC/MSD. Hewlett Packard Application Note. 228-348.

FRENICH, A. G., VIDAL, M. J. L., LOPEZ, T. L., AGUADO, S. C. ve SALVADOR,
I. M. 2004. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and
vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal
of Chromatography A*, 1048 (2004): 199–206.

- GOTO, T., ITO, Y., YAMADA, S., MATSUMOTO, H., OKA, H. ve NAGASE, H. 2006. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column. *Analytica Chimica Acta*, 555 (2006): 225–232.
- GÜLER, Ç. ve ÇOBANOĞLU, Z. 1997. Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. Ankara.
- KAUSHIK, G., SATYA, S. and NAIK, S.N. 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. *Food Research International*, 42: 26–40.
- KLEIN, J. ve ALDER, L. 2003. Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *The Journal of AOAC Int.*, 86: 1015-1037.
- LUKE, M. A., FROBERG, J. E. ve MASUMOTO, H. T. 1975. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 58.5: 1020-1026.
- LUKE, M. A., FROBERG, J. A., DOOSE, G. M. and MASUMOTO, T. 1981. Improved Multiresidue Gas Chromatographic Determination of Organophosphorus, Organonitrogen and Organohalogen Pesticides in Produce, Using Flame Photometric and Electolytic Conductivity Dedectors. *Journal of AOAC*, Vol: 64, No: 5, 1187-1195.
- LEHOTAY, S.J. 2007. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. *The Journal of AOAC International*, 90: 485–520.
- LEHOTAY, S.J., SON K.A., KWON, H., KOESUKWIWAT, FU W., MASTOVSKA K., HOH, E. ve LEEPIPATPIBOON, N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010): 2548–2560
- LENICEK, J., SEKYRA, M. ve CITKOVA, M. 1989. Estimation of Residues of Synthetic Pyrethroids in Vegetables and Fruit. *Ceskoslovenska-Hygiena*, 34 (1), 28-38.
- MAESTRONI, M.B. 2005. Uncertainty of laboratory operations. In lectures database/uncertainty of analytical results/principles of estimation of uncertainty. FAO/IAEA Training Workshop on Introduction to QC/QA in

Pesticide Analytical Laboratories, Training and Reference Center for Food and Pesticide Control, Seibersdorf, Vienna, Austria, 12 Sept- 7Oct 2005.

MAÑES, J., FONT, G. ve PICO, Y. 1993. Evaluation of a solid-phase extraction system for determining pesticide residues in milk, *Journal of Chromatography A*, Vol 642, 195 – 204.

MARINAS, A., LAFONT, F., ARAMENDÍA, M.A., GARCÍA, I.M., MARINAS, J.M. ve URBANO, F.J. 2010. Multiresidue Analysis of Low-and Medium polarity Pesticides in Olive Oil by GC-MS/MS. *Elsevier Inc.*: 667-682.

MEYER, V.R. 2007. Measurement uncertainty. *Journal of Chromatography A*, 1158: 15-24.

MILLER, J., MILLER, J. 2008. Analitik Kimyacılar için İstatistik ve Kemometri. İlke Yayınevi, Çeviri, Prof. Dr. Ahmet Uyanık Ankara, 312 ss.

MILLS, P.A., ONLEY, J.H. ve GUITHER, R.A. 1963. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 46, 186–191.

MOL, H.G., VAN DAM, R.C. ve STEIJGER, O.M. 2003. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. *Journal of Chromatography A*, 1015: 119-127.

MOLTO, J. C., PICO, Y., FONT, G. ve MAÑES, J. 1989. Pesticide determination in water after separation on reverse-phase minicolumns. *Revista de sanidad e higiene pública*, 63 (7-8): 31 – 37.

MOLTO, J. C., PICO, Y., FONT, G. ve MAÑES, J. 1991. Determination of triazines and organophosphorus pesticides in water samples using solid phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 555, 137 – 145.

NIESSEN, W.M.A. 2010. Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010): 4061–4070.

RODRÈGUEZ, LC., GRACIA, L. G., LOÈPEZ, E.M.A., BOSQUE, J.M.S. 2001. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 20, no. 11: 620-636.

SANNINO, A., BOLZONI, L. ve BANDINI, M. 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1036 (2004): 161–169.

- SHARMA, D. NAGPAL, A., PAKADE, Y.B. ve KATNORIA, J.K. 2010. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, 82: 1077-1089.
- SOLER, C., HAMILTON, B., FUREY, A. ve JAMES, K.J. 2006. Optimization of MS/MS using triple quadrupole mass analyzer for the simultaneous analysis of carbosulfan and its main metabolites in oranges. *Analytica Chimica Acta*, 571:1-11.
- SOLER, C., JAMES, K.J. ve PICO, Y. 2007. Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food- Application to estimate their daily intake. *Journal of Chromatography A*, 1157 (2007): 73-84.
- TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M. ve BOCKSTAELE, E.V., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* volume (23) No: 8, 535-552.
- VIDAL, J.L.M., Arrebola, F.J. ve MATEU-SANCHEZ, M. 2002. Application of Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to The Analysis of Pesticides in Fruits And Vegetables. *Journal of Chromatography A*, 959: 203-213.
- VIDAL, J.L.M., PLAZA-BOLANOS, P., ROMERO-GONZALES, R. ve FRENICH, A.G. 2009. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6767-6788.
- WEISS, B., AMLER, S. ve AMLER, R.W., 2004. Pesticides. *Pediatrics*,; 2004.113: 1030- 1036.
- WEITZEL, M. L. J., LEE, S. M., SMOOT, M., VIAFARA, N. ve BRODSKY, M. 2007. ISO 17025 requirements for method verification. *ALACC Guide 2007*.
- WILKOWSKA, A. ve BIZIUK, M. 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125 (2011): 803-812.
- YÜCE, T.Y. 2006. Gıdalarda organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin miktar tayini metot validasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71 ss.
- ZAMORA, J.G., POZO, O.T., LOPEZ, F.J. ve HERNANDEZ, F. 2004. Determination of tridemorph and other fungicide residues in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045 (2004): 137-143.

ÖZGEÇMİŞ



Taner ERKAYMAZ 1976 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1994 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun olduktan sonra özel sektörde gıda kirleticileri analizleri alanında çalışmaya başladı ve halen aynı alan üzerinde çalışmaktadır. Ocak 2011'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği

Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2010 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nde çalışmaktadır.

