



**KEÇİBOYNUZUNDA GC/MSMS İLE ETİLEN OKSİT ANALİZİ METOT
GELİŞTİRME VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hasan ATCA

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
Temmuz 2024

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEÇİBOYNUZUNDA GC/MSMS İLE ETİLEN OKSİT ANALİZİ
METOT GELİŞTİRME VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

Hasan ATCA

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Temmuz 2024

TEZ ONAY SAYFASI

Hasan ATCA tarafından hazırlanan “Keçiboynuzunda GC/MSMS ile etilen oksit analizi metot geliştirme ve validasyon çalışmaları” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 11 / 06 / 2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

Başkan : Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Gökhan AKARCA
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Recep PALAMUTOĞLU
Afyonkarahisar Sağlık Bil. Üni. Sağlık Bilimleri Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Bekir YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11 / 06 / 2024

Hasan ATCA

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**KEÇİBOYNUZUNDA GC/MSMS İLE ETİLEN OKSİT ANALİZİ METOT
GELİŞTİRME VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI**

Hasan ATCA
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

Bu araştırmada, gıda ürünlerinde sterilizasyon amacıyla fümigant olarak kullanılan etilen oksit (EO) kalıntısının miktar tayinini sağlamak amacıyla metot şartlarının geliştirilmesi ve elde edilen metodun keçiboynuzu matriksinde valide edilmesi amaçlanmıştır. Metodun ekstraksiyon işleminde solvent olarak asetonitril, saflaştırma safhasında Quecher's kiti ve analiz edilmesinde GC/MSMS cihazı kullanılmıştır. Validasyon sürecinde içeriğinde EO içermediği bilinen keçiboynuzu numunesine EO ve 2-CE (2-Kloroetanol) ile kirletme yapılmış ve elde edilen veriler ile ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır.

Validasyonda, seçicilik / spesifiklik, ölçüm aralığı / doğrusallık, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, geri kazanım ve sağlamlık parametreleri çalışılmıştır. Yapılan validasyon ve ölçüm belirsizliği çalışmaları sonucunda; EO için ölçüm limiti 100 µg/kg ve geri kazanım oranı % 103,01, genişletilmiş belirsizlik sonucu 0,11 olarak bulunmuştur. Validasyon sonucunda elde edilen analiz verileri istatistiksel testlerle karşılaştırılmış ve uygun olarak değerlendirilmiştir.

2024, x + 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Keçiboynuzu, Etilen Oksit, 2-Kloroetanol, Validasyon

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

**METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION STUDIES FOR ETHYLENE
OXIDE ANALYSIS WITH GC/MSMS IN CAROB BEAN**

Hasan ATCA

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Ramazan ŞEVİK

In this study, it was aimed to develop method conditions for the quantification of ethylene oxide (EO) residue used as fumigant for sterilization in food products and to validate the obtained method in carob matrix. Acetonitrile was used as solvent in the extraction process of the method, Quecher's kit was used in the purification phase and GC/MSMS device was used in the analysis. During the validation process, carob samples known to be EO-free were contaminated with EO and 2-CE (2-Chloroethanol) and the measurement uncertainty was calculated from the data obtained.

In validation, selectivity / specificity, measurement range / linearity, repeatability, reproducibility, recovery and robustness parameters were studied. As a result of the validation and measurement uncertainty studies, the measurement limit for EO was 100 µg/kg, the recovery rate was 103,01% and the expanded uncertainty result was 0,11. The analysis data obtained as a result of validation were compared with statistical tests and evaluated as appropriate.

2024, x + 45 pages

Keywords: Carob bean, Ethylene Oxide, 2-Chloroethanol, Validation

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK ve tez yazım aşamasındaki öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Gökhan AKARCA ile bölüm hocalarıma,

Her türlü yapıcı eleştirileri ve yönlendirmesiyle tezimize büyük katkı sağlayan Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Recep PALAMUTOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimine başlamaya beni teşvik eden Afyonkarahisar Gıda Kontrol Laboratuvar müdürü Sayın Murat KUZKALE, müdür yardımcısı Sayın Ahmet YILDIRIM, kalıntı analiz birimi sorumlusu Sinan KOLÇAK, İzmir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü personeli Ergin Mehmet HARUNOĞLU ve analizlerin gerçekleştirilmesi ve sürecin yürütülmesinde desteklerini eksik etmeyen değerli mesai arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, haklarını ödeyemeyeceğim kıymetli aileme,

Beni her koşulda destekleyen, varlıklarıyla bana güç veren ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim kıymetli eşim Kur'an Kursu Öğreticisi Emine ATCA, kızlarım Vera ve Serra'ya çok teşekkür ederim.

Hasan ATCA

Afyonkarahisar 2024

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Keçiboynuzu.....	3
2.2 Etilen Oksit	4
2.2.1 Etilen Oksidin Sağlığa Zararları	9
2.3 2-Kloroetanol.....	11
2.4 2-Bromoetanol.....	14
2.5 Etilen Oksit Analizinde Uygulanan Bazı Metotlar.....	15
3. MATERYAL ve METOT	18
3.1 Materyal.....	18
3.2 Metot.....	18
3.2.1 Standartların Hazırlanması	19
3.2.2 Kromatografik Şartlar	19
3.2.3 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	20
3.2.4 Etilen Oksit Analizi.....	21
3.2.5 Validasyon.....	21
3.2.6 Ölçüm Belirsizliği	22
3.2.7 İstatistiksel Analizler ve Değerlendirmeler.....	22
4. BULGULAR	24
4.1 Validasyon Çalışmaları.....	24
4.2 Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity).....	24
4.3 Doğrusallık (Linearity)	25
4.4 Tekrarlanabilirlik (Repeatability)	27
4.5 Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik (Reproducibility)	30
4.6 Geri kazanım (Doğruluk).....	32
4.7 Sağlamlık (Robustness / Ruggedness).....	33

4.8 Ölçüm Belirsizliği	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
5.1 Tartışma.....	36
5.2 Sonuç	39
6. KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
C	Karbon
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
k	Kapsama Faktörü
kg	Kilogram
kGy	Kilo Gray
L	Litre
log	Logaritma
m	Metre
m ³	Metreküp
mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
N ₂	Azot
NaCl	Sodyum klorür
pH	Power of Hydrogen
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
psi	Pounds Per Square Inch
R ²	Korelasyon Katsayısı

Kısaltmalar

2-BE	2-Bromoetanol
2-CE	2-Kloroetanol
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BfR	German Federal Institute for Risk Assessment
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Collision Energy
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EC	European Commission
ECHA	European Chemicals Agency
EEC	European Economic Community
EO	Etilen Oksit
EURL-SRM	European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides Requiring Single Methods
FAO	Food and Agriculture Organization
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MSMS	Gaz Kromatografisi-Kütle Kütle Spektroskopisi
GH	Grubb's High
GL	Grubb's Low
IARC	International Agency for Research on Cancer
LC/MSMS	Likit Kromatografisi-Kütle Kütle Spektroskopisi
Max	Maksimum
Min	Minimum
MRL	Maximum Residue Limit
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MSMS	Kütle Kütle Spektroskopisi
NIH	National Institutes of Health
ORT	Ortalama
PRSD	Horwitz Eşitliğinden Hesaplanan Relatif Standart Sapma
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PTFE	Politetrafloroetilen
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions Per Minute
%RSD	% Relative Standard Deviation
RSD	Relative Standard Deviation
RT	Retention Time
SD	Standard Deviation
TGK	Türk Gıda Kodeksi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Etilen oksit yapısı.....	4
Şekil 2.2 2020-2021 yılı RASFF EO bildirim grafiği	5
Şekil 2.3 Etilenden EO ve 2-CE'ye olası kimyasal ve biyolojik yollar	12
Şekil 2.4 2-BE kimyasal yapısı	15
Şekil 2.5 Lipitlerin rolü ve pestisitlerin polaritelerine bağlı olarak fazlar arasında bölünmesi açısından Quechers ve Quoil'e genel bakış.....	15
Şekil 4.1 EO standardı GC/MSMS kromotogramı.....	25
Şekil 4.2 2-CE standardı GC/MSMS kromotogramı.	25
Şekil 4.3 EO kalibrasyon grafiği.	26
Şekil 4.4 EO residüel kontrol grafiği.....	26
Şekil 4.5 Belirsizlik bileşenleri.	35
Şekil 4.6 Belirsizlik bileşenleri grafiği.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Keçiboynuzu (100 g için) bileşen özellikleri	3
Çizelge 2.2 Sulu eo solüsyonlarının fiziksel özellikleri	7
Çizelge 2.3 EO ve 2-CE'nin fizikokimyasal özelliklerinin yaygın çözücülerle karşılaştırılması.....	14
Çizelge 2.4 EURL-SRM EO metot şartları	16
Çizelge 2.5 EURL-SRM EO ve 2-CE MRM detayları	16
Çizelge 2.6 Agilent EO uygulama kılavuzu GC şartları	17
Çizelge 2.7 Agilent EO uygulama kılavuzu MS şartları	17
Çizelge 3.1 GC/MSMS cihaz bilgileri ve çalışma şartları.	20
Çizelge 3.2 EO ve 2-CE analitlerine ait GC/MSMS cihazındaki MRM verileri.	20
Çizelge 3.3 Kalibrasyon grafiği standart kullanım miktarları.	21
Çizelge 4.1 Keçiboynuzu matriksinde EO lineer ölçüm sonuçları.	26
Çizelge 4.2 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon (100 µg/kg).....	27
Çizelge 4.3 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon Ftesti (100 µg/kg)...	28
Çizelge 4.4 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon t testi (100 µg/kg)...	28
Çizelge 4.5 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon (200 µg/kg).	28
Çizelge 4.6 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon F testi (200 µg/kg). 29	
Çizelge 4.7 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon t testi (200 µg/kg). 29	
Çizelge 4.8 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon (100 µg/kg).	29
Çizelge 4.9 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon F testi (100 µg/kg).	30
Çizelge 4.10 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon t testi (100 µg/kg).	30
Çizelge 4.11 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon (200 µg/kg). ...	31
Çizelge 4.12 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon F testi (200 µg/kg).	31
Çizelge 4.13 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon t testi (200 µg/kg).	31
Çizelge 4.14 Keçiboynuzu geri kazanım değerleri düşük konsantrasyon (100 µg/kg)..	32
Çizelge 4.15 Keçiboynuzu geri kazanım değerleri yüksek konsantrasyon (200 µg/kg). 32	

Çizelge 4.16 Düşük ve yüksek konsantrasyonlar için ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi.	33
Çizelge 4.17 Sağlamlık parametreleri.	33
Çizelge 4.18 Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.	34
Çizelge 4.19 Sağlamlık değerlendirmesi.	34
Çizelge 4.20 EO toplam belirsizlikleri	35



1. GİRİŞ

Gıdalar belirli bir süreç içerisinde yetişen veya üretilen ve sonrasında insanların tüketimine sunulan maddelerdir. Gıdaların tüketilmeden önce sıcaklık, nem, ışık vb. koşullar göz önüne alınarak muhafaza edilmesi gerekmektedir. Bu muhafaza işleminde süregelen farklı teknikler kullanılmakta olup; ürünün fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısının korunması esas alınmaktadır. Yapının korunma sürecinde kimi zaman kimyasal kimi zaman da fiziksel işlemler uygulanarak ürünün raf ömrü uzatılmaya çalışılmaktadır. Ancak yapılacak olan işlem ürünün görüntüsünü, tadını ve besin değerini olumsuz yönde etkilememeli; ürünün raf ömrünü uzatmalıdır.

Gıda maddeleri çeşitli (biyolojik, kimyasal, fiziksel vb.) sebeplerden dolayı bozulabilmektedir. Bozulmaya sebep olan etmenleri ortadan kaldırmaya yönelik çeşitli (kurutma, ısıtma işlemi, fermantasyon, tuzlama, dumanlama, konserveleme, dondurma, soğukta muhafaza, kimyasal maddelerle muamele) gıda muhafaza yöntemleri geliştirilmiştir (Aydemir ve Atasever 2007). Örneğin, süt ürünlerinin korunması amacıyla pastörizasyon ve sterilizasyon işlemleri uygulanırken, ısıtma işlemi duyarlı gıdalar için ısıtma ve fümigasyon işlemleri uygulanmaktadır.

Baharattaki mikroorganizmaların ortadan kaldırılması için fümigasyon, termal inaktivasyon ve ısıtma ile soğuk pastörizasyon gibi çeşitli yöntemlere literatürde sıklıkla rastlanmaktadır (Abbas ve Halkman 2003). Fümigasyon amacıyla bazı ürünlerde tütüsü ajanları kullanılırken bazen de etilen oksit gibi kolay buharlaşabilen kimyasal koruyucular kullanılabilmektedir. Ancak bu koruyucu kimyasallar üründe bazı kalıntılar bırakmakta ve insan sağlığına olumsuz etki gösterebilmektedirler. Piyasaya sunulan ürünler çeşitli denetim mekanizmalarıyla (Rutin denetim, Sınır kontrolleri vb.) kontrol sırasında analiz edilmekte ve kalıntılar tespit edilebilmektedir. Örneğin Avrupa Birliği (AB) ithal edilen ürünlerin bazılarında etilen oksit (EO) maddesine rastlanmış, Gıda ve Yem için Hızlı Alarm Sistemi -Rapid Alert System for Food and Feed- (RASFF) ile ürünlerin bazılarını geri çağırma bazılarını da sınır kontrollerinde reddederek gıda ürünü olarak tüketimi engellenmiştir (Anonim 2020).

Etilen Oksit, fındık, baharat, kurutulmuş meyveler, süt tozları ve tahıllar gibi düşük su aktivitesine sahip gıdaların mikroorganizma ve böceklerden korunması için fümigasyonda kullanılmaktadır (Dudkiewicz vd. 2022).

Etilen oksit ilk kez 1859'da Charles Adolphe Wurtz tarafından 2-kloroetanolün bir baz ile tepkimeye girmesi ile sentezlenmiştir. Kimya endüstrisinde etilen glikol, glikol eterler, polimerler ve yüzey aktif madde üretiminde, ilaç sektöründe, inert gazlarla birleştiğinde tıbbi ekipmanların sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra tekstilde, kozmetikte, tarım ve gıda sektörlerinde de oldukça önemlidir (Dolmaseven 2023).

Etilen oksit 1960 yılından bu yana sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca sağlık sektöründe malzemelerin sterilizasyonunda, ilaç sektöründe vb. sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Etilen oksit, soluma veya deri yoluyla nüfuz etmektedir. İki farklı yolla metabolize edilmektedir. Etilen oksidin sıvı ve gaz formlarının ciltle teması yanıklara ve alerjik reaksiyonlara neden olabilir (Dikmetaş vd. 2020).

Avrupa Birliği, çeşitli gıda ve tarım ürünlerinde hem EO hem de onun birincil metaboliti 2-kloroetanol (2-CE) için 0,02 ila 0,1 mg/kg arasında değişen maximum residue limit (MRL) belirlemiştir (Anonim 2022). Ülkemizde ise Avrupa Birliği mevzuatı baz alınarak hazırlanan “Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği”nde EO için 0,02-0,1 mg/kg arasında değişen MRL belirlenmiştir (TGK 2021).

Bu çalışmada keçiboynuzunda GC/MSMS ile etilen oksit analizi metodu geliştirilmesi ve etilen oksit kalıntısının tespitinde kullanılan analiz metodunun valide edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Keçiboynuzu

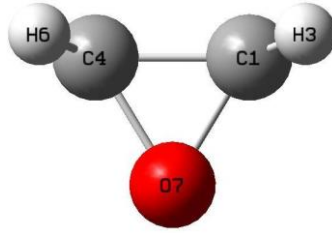
Doğu Akdeniz ve Ortadoğu'ya özgü bir tür olan keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*), *Leguminosae* familyası içerisinde yer almaktadır. Çok eski çağlardan bu yana bilinen bu türün, en az 4000 yıl öncesinde kültüre alındığı tahmin edilmektedir (Gübbük vd. 2016). Baklagiller (*Fabaceae*) familyasına ait olup içerisinde sert çekirdekleri bulunan baklalardan oluşmaktadır (Sarıduman 2023). *Leguminosae* (*Fabaceae*) familyasına ve *Caesalpinaceae* alt familyasına ait bir ağaç olan keçiboynuzu, “harnup”, “harup”, “boynuz” isimleri ile de bilinmektedir (Şener 2022). Keçiboynuzu ağacının tohumu buğday ve arpa gibi tahılların tohumunun yapısına benzer yapıda tohuma sahiptir. Taze meyve olarak da tüketilebilen keçiboynuzunun çekirdekleri, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal bir gıda katkı maddesi olan gam üretiminde, meyvesi ise toz haline getirildiğinde şekerleme ürünlerinde kakao ikamesi olarak kullanılmaktadır (Sarıduman 2023). Keçiboynuzu bileşen özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Keçiboynuzu (100 g için) bileşen özellikleri (Türkomp, İnt. Kyn.3).

Bileşen	Birim	Ortalama	Minimum	Maksimin
Enerji	kcal	293	290	298
Enerji	kJ	1226	1213	1247
Su	g	12,22	12,00	12,46
Kül	g	2,47	2,15	2,56
Protein	g	4,18	3,69	5,98
Azot	g	0,67	0,59	0,96
Yağ, toplam	g	0,69	0,57	0,78
Karbonhidrat	g	54,61	53,25	55,99
Lif, toplam diyet	g	25,83	23,43	27,11
Lif, suda çözünür	g	2,68	2,10	4,21
Lif, suda çözünmeyen	g	23,14	19,22	24,62
Sakaroza	g	16,40	13,75	17,50
Glukoz	g	8,96	3,25	13,16
Fruktoz	g	11,47	5,23	15,97
Laktoz	g	0,00	0,00	0,00
Maltoz	g	0,06	0,00	0,29
Tuz	mg	12	10	17
Demir	mg	2,20	1,25	5,44
Fosfor	mg	211	85	681
Kalsiyum	mg	311	251	361
Magnezyum	mg	119	63	326
Potasyum	mg	992	843	1215
Sodyum	mg	5	4	7
Çinko	mg	1,45	0,61	4,27
Selenyum	µg	2,5	0,0	5,9

2.2 Etilen Oksit

Etilen oksit (Cas no:75-21-8), kütlesi 44,05, en basit siklik eterdir. Renksiz bir gaz veya sıvıdır ve tatlı, eterik bir kokusu vardır. Kısa C-C bağına ve gergin açılara sahip etilen oksit molekülü Şekil 2.1'de gösterilmektedir (Rebsdats ve Mayer 2000).



Şekil 2.1 Etilen oksit yapısı (Dolmaseven 2023).

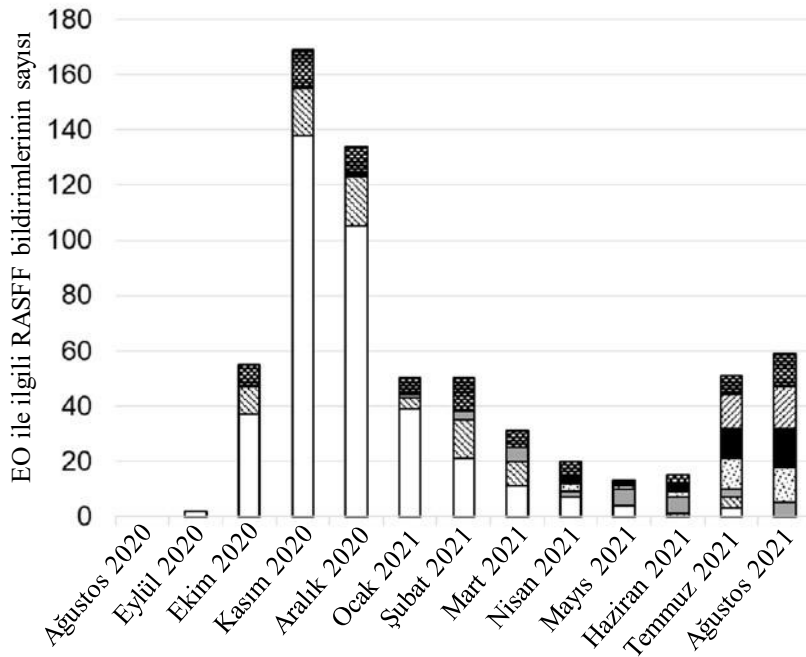
Etilen oksit ilk olarak 1859'da, potasyum hidroksit çözeltisi kullanılarak etilenklorohidridinden hidroklorik asidi elimine ederek hazırlayan Charles Adolphe Wurtz tarafından tanımlanmıştır. Wurtz'un keşfine dayanan klorohidrin prosesi ile endüstriyel üretim 1914'te başlamıştır. O zamandan bu yana etilen oksidin üretimi ve önemi giderek artmıştır (Rebsdats ve Mayer 2000).

1931'de Lefort, etilenin doğrudan katalitik oksidasyonunu keşfetmiştir. Bu, yavaş yavaş klorohidrin prosesinin yerini almıştır. Şu anda etilen oksit, etilenin hava veya oksijenle doğrudan oksidasyonu yoluyla üretilmektedir. Dünya çapında yıllık üretim kapasitesi 15×10^6 tonun üzerinde olması onu önemli bir endüstriyel kimyasal haline getirmektedir. Etilen oksidin kendisi dezenfektan, sterilizasyon maddesi ve fümigant olarak kullanılmaktadır. En önemli türevi olan etilen glikol (Cas no:107-21-1), antifrizde (araba radyatörleri) ve polyester elyafların (elyaflar, polyester elyaflar, polyesterler) üretiminde kullanılmaktadır (Rebsdats ve Mayer 2000). Aynı zamanda fizyolojik süreçlerin bir sonucu olarak endojen olarak üretilmektedir (Lynch vd. 2022).

Etilen oksit reaktif bir epoksit ve güçlü bir biyosit olduğundan, gıda maddelerinin ve tıbbi ekipmanların fümigasyonu ve sterilizasyonu için küçük bir miktar (toplam üretimin %1'inden azı) kullanılır. Yüksek koku eşiği ($900 - 1260 \text{ mg/m}^3$) nedeniyle duyuşal olarak tanıma, sağlık açısından tehlike konusunda yeterli uyarı sağlamamaktadır (Bruyn 1987).

Etilen oksit, mikroorganizmaların hücre duvarı ile reaksiyona girerek geri dönüşümsüz alkalileşmeye sebep olan bir sterilan olarak çalışmaktadır (Zenciroğlu 2005). Baharat endüstrisinde *Salmonella* ve *E. coli* gibi mikrobiyal gelişimi önlemek, bakteri yüklerini, maya ve küfü, koliformları ve diğer patojenleri azaltmak için kullanılmaktadır. Bitki, baharat, tohum gibi ürünlere zarar verebilecek yüksek sıcaklıktaki işlemlerin yerine kullanılmaktadır (Anonim 2022).

Baharatlarda yapılan bir çalışmada, mezofilik aerobik bakteri sayısında 2,5 log birimi azalma etilen oksit (600 g/m^3 , $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 saat) ve 5 kGy ışınlama ile sağlanabilmiştir. Bu fümigasyon ve ışınlama uygulamasında koliform bakteri ve *E. coli* tümüyle indirgenmiştir (Abbas ve Halkman 2003). Etilen oksit, maksimum kalıntı limitleri ile ilgili 396/2005 sayılı European Commission (EC) yönetmeliğinde listelenen bir pestisitir. Bu pestisit AB'de gıdalarda kullanımı 1991 yılından itibaren yasaklanmıştır. Ancak 9 Eylül 2020'de Belçika, Hindistan'dan gelen susam tohumlarında yüksek düzeyde EO tespit etmiştir. Bu seviye $30,1 \text{ mg/kg}$ olup, susam için Avrupa MRL'sini ($0,05 \text{ mg/kg}$) aşmıştır. Bunu takiben, RASFF veri tabanına kaydedilen EO ile kontamine olmuş gıdaların sayısı Eylül ayında 2 iken Kasım 2020'de 169'a yükselmiştir (Dudkiewicz vd. 2022). Ağustos 2020-Ağustos 2021 tarihleri arasındaki RASFF etilen oksit bildirim grafiği Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 2020-2021 yılı RASFF EO bildirim grafiği (Dudkiewicz vd. 2022 kaynağından esinlenmiştir).

Susamdaki *Salmonella* sorunu sadece Hindistan ile sınırlı kalmamıştır. Yıllar geçtikçe Afrika'nın çeşitli ülkelerinden gelen susam tohumlarında da *Salmonella*'ya rastlanmıştır. Bu, Uganda (Aralık 2016), Nijerya ve Sudan (Haziran 2017) ve Etiyopya (Ocak 2019) menşeli susamın ithalat kontrollerinin artırılmasını gerektiren AB düzenlemelerinin uygulamaya koyulmasına neden olmuştur. Kontrollerin sıklığı başlangıçta %50 olarak belirlenmiş ve daha sonra Sudan ve Uganda örneğinde (Mayıs 2020'den itibaren) %20'ye düşürülmüştür (Anonim 2020).

Temmuz ve Ağustos 2021'de EO bulaşmış ürünlere ilişkin bildirimlerin sayısı yeniden artmıştır. Bu kez EO'nun MRL'nin üzerinde tespit edildiği ana gıda grupları süt ürünleri (süt, buz ve tatlılar dâhil), gıda katkı maddeleri ve tatlandırıcılar, diyetetik gıdalar, takviyeler ve güçlendirilmiş gıdalardır. Bu ürün grupları arasında çok sayıda bildirimde (yaklaşık %30), örneğin dondurmada koyulaştırıcı veya stabilizatör olarak kullanılan keçiyoynuzu gamı (E410) yer almaktadır(Dudkiewicz vd. 2022).

Bu pestisit, dondurma üretiminde ikincil bileşenler olarak kullanılan stabilizatör karışımları yoluyla besin zincirine girmiştir. Sonuç olarak, çoğu durumda nihai üründe pestisit kalıntısının tespit edilip edilmeyeceğine bakılmaksızın, AB çapında birçok ülkede uygunsuz kalıntı içeren tüm ürünler geri çekilmiştir veya geri çağırılmıştır (Bessaire vd. 2021).

Buharlaşıma ve matris bileşenleriyle reaksiyonlar, EO'nun gıdalardaki ana yayılma yollarıdır. EO fümigasyonunun ardından, ürünler havalandırılırsa, fümigasyona tabi tutulan ürünlerdeki EO seviyeleri hızla düşer. Tipik olarak, EO seviyeleri fümigasyondan sonraki 2 hafta içinde 1 ppm'in altına düşer. Havalandırma olmadığında veya numuneler kapatıldığında EO seviyeleri daha yavaş düşer. EO'nun gıda ürünlerinden uzaklaştırılmasına bazen vakum veya daha yüksek sıcaklıklar uygulanarak hızlandırılır. İkincisi bazen gıda ürünlerinin duyu özelliklerini olumsuz yönde etkiler (Anonim 2020).

Sıvı etilen oksit ve su her oranda tamamen karışabilir. Klatrat oluşumundan kaynaklanan nispeten yüksek erime noktaları özellikle dikkat çekicidir. Klatratlar bir kafes yapısı içine alınmış organik moleküllerden oluşur. Bu durumda kafes, her biri 46 su molekülü içeren birim hücrelerden, altı büyük olan (14 kenarlı, tetradekahedra) ve iki küçük olan (12

kenarlı, dodecahedra) iki tür boşluktan oluşan bir buz kafesidir. Klatratların, etilen oksitin giderek yoğunlaşan sulu çözeltilerinden kristalleştirilmesi sağlanırsa yoğunlukları ve EO içerikleri de artar. EO ilk önce su kafesinin altı tetradekahedral boşluğunu doldurur, ardından dodekahedral boşlukların %20-40'ını doldurur (Rebsdats ve Mayer 2000). Çizelge 2.2’de sulu EO solüsyonlarının fiziksel özellikleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 Sulu EO solüsyonlarının fiziksel özellikleri (Rebsdats ve Mayer 2000).

EO içeriği (%)	Erime noktası (°C)	Kaynama Noktası °C	10°C’de yoğunluğu (g/L)	Alevlenme noktası (°C)
0	0.0	100	0.9991	
0.5				41.5
1	-0.4			31
2				3
3	-1.3			
5	-1.6	58	0.9988	-2
10	5.6	42.5	0.9980	
20	10.4	32	0.9945	-21
30	11.8	27	0.9882	-28
40	10.4	21	0.9792	-35
60	7.8	16	0.9534	-45
80	3.7	13	0.9194	-53
100	-112.5	10.4	0.8826	-57

EO gıda ile temas ettiğinde matrise bağlı olarak etilen glikol, 2-kloroetanol ve 2-bromoetanol oluşabilmektedir. Son ikisi sırasıyla klorür ve bromür iyonlarının varlığında oluşmaktadır. Dietilen glikol ve dioksan da bir dereceye kadar oluşmaktadır. Metil bromür ile fümigasyonun EO ile fümigasyondan önce yapıldığı ve yüksek bromür kalıntıları bıraktığı durumlarda, 2-bromoetanol oluşum seviyeleri çok yüksek olabilmektedir. EO ayrıca amino asitler, pürinler ve yağ asitleri gibi matris bileşenleriyle doğrudan reaksiyona girerek hidroksi-etil eklentileri oluşturmaktadır (Anonim 2020).

Etilen oksit bitkilerde metabolizmanın bir ürünü olarak oluşabilir. Örneğin, Faba fasulyesinin, her yerde bulunan bir bitki büyüme hormonu olan etilenin enzimatik oksidasyonu yoluyla EO ürettiği gösterilmiştir. Etilen birçok bitki tarafından üretilmektedir, ancak Hintli ihracatçılar da dâhil olmak üzere işletmeler bunu ürünlerin, özellikle de meyvelerin yapay olarak olgunlaştırılması için de kullanmaktadır (Dudkiewicz vd. 2022).

EO'nun, etilenin enzimatik olarak katalize edilmiş oksidasyonu yoluyla doğal olarak oluşabileceği gösterilebilir; CYP-450 oksidazları içermektedir. Bu hem bakteriler hem de bitkiler için kanıtlanmıştır. Bağırsak kanalındaki bakteriyel aktivite yoluyla insan vücudunda etilenin EO'ya endojen oksidasyonu Ehrenberg ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Anonim 2020).

Etilen gaz şeklinde bir hormondur. Kimyasal bileşimi çok basit olmasına rağmen, bitkilerdeki fizyolojik etkisi çok düşük konsantrasyonlarda bile görülebilmektedir. Bitkilerde yüksek aktiviteli ve çok yönlü etilen gazının pratik yoldan elde edilebilmesi, etileni serbest kılan bileşiklerin bulunmasını gerektirmiştir. Bu maddeler çiçeklenmeyi teşvik etmektedir. Etli meyve ve sebzelerde olgunlaşma üzerine etki etmekte, ceviz, zeytin, kiraz, vişne vb. meyve dökülmesini teşvik ederek seyrekleşmeyi sağlamaktadır (Kumlay ve Eryiğit 2011).

Muz, narenciye, armut, domates, kavun, ananas gibi meyve türlerinin olgunlaştırılması ve sarartılmasında etilen gazı kullanılmaktadır. Etilenin meyveyi olgunlaştırma şeklinde uyarması ile klorofilin yapısının bozulması ve diğer pigmentlerin sentezlenmesi, hücre duvarının parçalanması ile meyve yumuşaması, meyve kokusunu oluşturan uçucu bileşiklerin sentezlenmesi, solunumun hızlanması ve nişastanın şekere dönüşmesi gibi metabolik olaylar meydana gelmektedir (Algül vd. 2016).

Etilen oksit, N₂, CO₂ veya dikloroflorometan ile patlayıcı olmayan bir karışım olarak kullanıldığında mükemmel bir dezenfektan, sterilizasyon maddesi ve fümiganttır. Gaz gözeneklere, ambalajlara veya giysilere nüfuz eder. Örneğin hastanelerdeki cerrahi aletleri sterilize etmek veya baharatlardan, kürklerden vb. zararlıları ve mikroorganizmaları uzaklaştırmak için kullanılabilir (Rebsdats ve Mayer 2000). Baharatların ve aromatik bitkilerin lezzet verici özellikleri içerdikleri uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır. Bu ürünler güneşte kurutma, depolama ve taşıma esnasında mikrobiyel bulaşmaya maruz kalabilmektedir. Bu yüzden satışa sunulmadan önce buharla, etilen oksitle veya ışınlama ile muamele edilebilmektedir (Aydemir ve Atasever 2007).

EO sterilizasyon işlemi ön koşullandırma, sterilizasyon döngüsü ve havalandırma gibi aşamaları içermektedir. EO uygulamasından önce tıbbi cihazların belirli bir sıcaklık ve

nemde ön koşullandırılması, ürünün bağıl nemini kontrol etmeye yardımcı olmakta ve sterilizasyon döngüsünün süresini azaltmaktadır. EO ile elde edilen sterilizasyon, mikroorganizmaların nem içeriğinden etkilenmektedir. Düşük nem seviyeleri mikrobiyal direnci artırabilmektedir (Jagadeeswaran ve Chandran 2022). Bütün ve öğütülmüş baharatın mikrobiyel kontaminasyonu, $<10^4$ bakteri düzeyine indirmek için 20-25 °C 'da 6-8 saat süreli %10 bağıl nemde (ya da daha yüksek bağıl nemde daha kısa süreli) ve 500-750 mL etilen oksit/ m³ konsantrasyonda etilen oksit uygulaması ve kalıntı problemleri Coretti tarafından yapılan çalışmada ele alınmıştır. Öğütülmüş hardal dışında fümige edilmiş baharatta renk ve koku kaybı olmadığı, havalandırma ve birkaç haftalık depolama sonunda EO kalıntısının fümigasyon, depolama ve paketleme koşullarına göre değişmek üzere genellikle 50-100 ppm olduğu, iyi havalandırılmış olmak kaydı ile etilen klorohidrin gibi toksik etilen oksit türevlerinin tuzlanmış ürünlerde önemsiz konsantrasyonlarda bulunabileceği gösterilmiştir (Coretti 1978).

Farklı kaynaklardan gelen EO / 2-CE kalıntıları, özellikle tespit edilen seviyelerin çok düşük olduğu (örn. $<0,1$ mg/kg) ve EO'nun tedarik zinciri boyunca fümigant olarak kullanımının doğrulanmadığı durumlarda, risk yönetimi kararları alınırken dikkate alınmalıdır (Bessaire vd. 2021).

Etilen oksitin faydaları risklerinden daha ağır basmaktadır. Bununla birlikte, uygunsuz veya yetersiz havalandırma yüzünden oluşan veya tamir edilemez doku hasarına yol açabilecek etilen oksit kalıntıları ile ilgili olan sağlık tehlikelerinden haberdar olmak gerekmektedir (Erbil 2007).

2.2.1 Etilen Oksidin Sağlığa Zararları

Gıda fümigasyonu için EO kullanımı, sağlığa olumsuz etkileri nedeniyle dünya çapında birçok ülkede aşamalı olarak kaldırılmıştır. Almanya'da, gıdalarda kalan EO kalıntılarının toksikolojik etkileri nedeniyle 1981 yılında gıdaların EO ile fümigasyonu yasaklanmıştır. 1985 yılında Çin, EO kullanımını sadece boş depolarla sınırlandırmıştır. 1986'da European Economic Community (EEC), EO'nun bitki koruma ürünü olarak pazarlanmasını ve kullanılmasını yasaklamış, ancak bazı küçük ölçekli geçici muafiyetler ulusal düzeyde uygulanmaya devam etmiştir. 1991 yılında EEC, Kategori 2 kanserojen

ve mutajen olarak sınıflandırıldığı için sağlık riskleri nedeniyle aktif bileşen olarak EO içeren tüm bitki koruma ürünlerini tamamen yasaklamıştır (Anonim 2020).

Etilen oksit, proteinler ve deoksiriboz nükleik asit (DNA) dâhil biyolojik makromoleküllerdeki nükleofilik gruplar tarafından kolayca açılabilen, oldukça gergin 3 üyeli halkası nedeniyle güçlü bir elektrofildir. Makromoleküler nükleofilik gruplarla reaksiyona girmenin yanı sıra, hayvanlarda ve insanlarda etilen oksit için diğer biyotransformasyonlar, glutatyonla konjugasyon ve etilen glikol oluşturmak için hidrolizi içeren iki detoksifikasyon yolunu içermektedir (Allemang vd. 2022).

Etilen oksit solunduğunda kolaylıkla emilmekte, vücuda dağıtılmakta ve hızla metabolize edilmektedir. Buna göre çoğu organ, kimyasalın ve metabolitlerinin eşdeğer dozlarını almaktadır. Proteinlerin ve DNA'nın alkilasyon derecesi, farklı organlar ve kan arasında biraz farklılık göstermektedir. İnsanda ve kemirgenlerde bileşiğin dokulardaki yarı ömrünün 9-10 dakika olduğu tahmin edilmektedir (Bruyn 1987).

İnsanlarda etilenden bazı endojen oluşumlar vardır ve hücrelerarası sıvıda keşfedilmiştir. Atmosferi kirletici olarak doğal gazda, sigara dumanında ve dizel egzozunda bulunabilmektedir. Etilen oksit doğada nadir olmasına rağmen biyolojik etkisi, tüm biyolojik sistemlerin DNA ve ribonükleik asit (RNA) evrimi üzerinde temel bir etkiye sahip olabilmektedir (Rebsdatt ve Mayer 2000).

Etilen oksidin çevreye girişinin ana yolu, üretim, taşıma, depolama, nakliye ve kullanım sırasında buharlaşma ve açığa çıkan gazlar nedeniyle atmosfere karışmasıdır. Sterilant veya fümigant olarak uygulanan etilen oksidin çoğu atmosfere karışacaktır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde katalitik oksidasyonla üretilen etilen oksit tonu başına üretim kayıplarının 13 kg olduğu tahmin edilmektedir (Bruyn 1987). İnsanların etilen okside maruz kalmasının başlıca yolları, mesleki, tüketici veya çevresel maruziyet yoluyla meydana gelebilecek soluma ve yiyeceklerle alınmasıdır. Etilen oksit son derece patlayıcı ve reaktif olduğundan, işlenmesi için kullanılan ekipman genellikle sıkıca kapalı ve yüksek otomasyonlu sistemlerden oluşmaktadır. Bu da mesleki maruziyet riskini azaltmaktadır (NIH, İnt. Kyn.1). Özellikle DNA'ya zarar verme yönü ile insanlarda kalıcı hastalıklara sebebiyet vermesi gibi nedenlerle tespiti oldukça önemlidir (Dolmaseven 2023).

Sterilizasyon ve havalandırma sürelerinin uzun olması, sıvıların sterilizasyonunun yapılamaması, paketlemede kumaş kullanılamaması, alev bastırıcı ile karıştırılmazsa gaz yanıcı ve patlayıcı etki yaratması, toksik artık veya artıklar bırakması, kullanıcı hatalarına açık olması, reaktif olması, zehirli olması ve kanserojen özelliği olması etilen oksitin dezavantajlarındandır (Akça 2022). Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir ve 2020'de yaklaşık 10 milyon ölüme neden olacağı bildirilmektedir. Meme kanseri, kadınlarda akciğer kanserinden sonra kanserden kaynaklanan ikinci ölüm nedenidir ve 2020'de teşhis edilen toplam yeni vakaların %12,5'ine karşılık gelmektedir (Jamil vd. 2022). Lenfoma ve lösemi, mesleki olarak etilen oksit maruziyetiyle ilişkili olduğu en sık bildirilen kanserlerdir. Mide ve meme kanserleri de etilen oksit maruziyetiyle ilişkili olabilmektedir (NIH, İnt. Kyn.1).

Etilen oksit maruziyeti olanlarda gebelik düşüklerinin fazla olduğu bilinmektedir. Finlandiya'daki bir çalışmada 80 hastanede sterilizasyon işlerinde çalışan kadınların, aynı hastanelerde diğer işlerde çalışanlara göre daha fazla düşük yapmış oldukları görülmüştür (Bilir 2002).

Hava içindeki etilen oksit konsantrasyonuna maruz kalma hayvan ve insanlarda genetik materyalin bozulduğunu gösterir bulgulara yol açmıştır. Ayrıca hemoglobinin alkilasyonu, programlanmış DNA sentezi, kardeş kromatit değişiklikleri, kromozal aberasyonlar ve fonksiyonel sperm anomalileri görülebilmektedir. Etilen oksit sıvı formunun göze temasta göz irritasyonu kornea yaralanması, cilde temasında şiddetli irritasyon, donma ve su toplaması olabilmektedir. Yutulması gastrik irritasyon ve karaciğer hasarına yol açabilmektedir. Etilen oksit buharlarının inhalasyonu solunum irritasyonu, akciğer yaralanması, baş ağrısı, bulantı, kusma, dispne, diyare ve siyanoza yol açabilmektedir (Zenciroğlu 2005). Düşük konsantrasyonlara bile sürekli maruz kalmak koku duyusunun uyuşmasına neden olabilmektedir (FAO, İnt. Kyn.1).

2.3 2-Kloroetanol

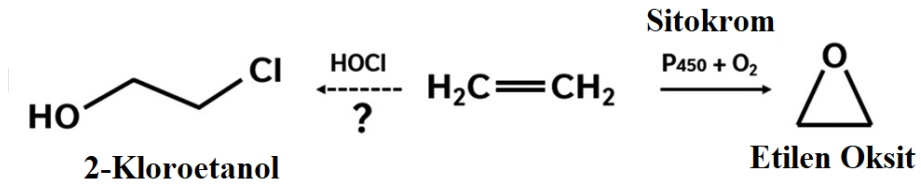
Etilen oksit ile kararsız hidrojen atomları içeren bileşikler arasında çok çeşitli reaksiyonlar meydana gelmektedir; bu nedenle bu tür bileşikler genellikle türevler üretmek için kullanılmaktadır (Rebsdatt ve Mayer 2000). EO'nun gıda bileşenleriyle olan

ana reaksiyonları, 2-kloroetanol, 2-bromoetanol ve etilen glikol gibi ürünlerle sonuçlanmaktadır (Dudkiewicz vd. 2022).

2-Kloroetanol (Cas no: 107-07-3), tekstil baskı boya için bir antioksidan ve diğer endüstriyel maddelerin üretiminde endüstriyel bir çözücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca EO ve etilen glikol sentezinde bir ara ürün olarak kullanılmaktadır (Allemang vd. 2022).

EO'nun yüksek uçuculuğu (kaynama noktası 10,4°C) nedeniyle hızla dağılmasının ve/veya ortam koşulları altında klorür gibi nükleofillerle reaksiyona girerek daha az uçucu metabolit 2-kloroetanol (kaynama noktası 129°C) oluşturmalarının beklendiğini belirtmek önemlidir. Dolayısıyla, Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğü 396/2005'e göre kalıntı tanımı, EO artı 2-CE'nin toplamıdır ve EO olarak ifade edilmektedir (Bessaire vd. 2021).

Analitik yöntemler esas olarak otlar, baharatlar, kurutulmuş sebzeler, kuruyemişler, tahıllar vb. kuru gıdalar için geliştirilmiştir. Üstelik kullanılan yaklaşımlar çok çeşitlidir; yani EO, asit işlemiyle (HCl / NaCl) 2-CE'ye tamamen dönüştürülebilmekte veya 2-CE, alkali işlemiyle tekrar epoksite dönüştürülebilmektedir (Bessaire vd. 2021). Şekil 2.3'de EO ve 2-CE dönüşüm tepkimeleri gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Etilenden EO ve 2-CE'ye olası kimyasal ve biyolojik yollar (Bessaire vd. 2021 kaynağından esinlenmiştir).

2-CE, bir klorohidrin fonksiyonel grubu içeren nispeten küçük bir alifatik bileşik olduğundan, potansiyel analoglar alkil zincir uzunluğunda küçük değişikliklerle bir klorohidrin (veya bromohidrin) iskelesine sahip olmaktadır (Allemang vd. 2022).

Gıdalarda 2-kloroetanol tespit edilmesi genellikle pestisit etilen oksidin tedarik zincirinin bir aşamasında kullanıldığı varsayımına dayanmaktadır. Epidemiyolojik kanıtlar sınırlı olmasına rağmen, hayvanlarda yeterli kanıt ve genotoksik hususlara dayanarak

International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından insanlar için kanserojen (Grup 1) olarak sınıflandırılmıştır (Allemang vd. 2022).

2-CE oluşumunun pestisit uygulamasının yanı sıra alternatif yolları da etilenin klor ve su ile reaksiyonudur. Olefinlerin ilave klorlanması literatürde iyi bir şekilde tarif edilmiştir. Hipokloröz asit, olefinik çift bağa hızla eklenerek 2-CE elde edilebilmektedir. Hipoklorit yaygın olarak su dezenfektanı olarak kullanılmaktadır ve etilen önemli ve yaygın bir bitki hormonudur. Bu da bazı durumlarda eser miktarda 2-CE bulunmasının her zaman EO'nun fümigant olarak kullanımıyla ilişkili olmayabileceği anlamına gelmektedir (Bessaire vd. 2021).

Tamamen teorik bir perspektiften bakıldığında, bitkilerde endojen olarak üretilen etilen enzimatik olarak EO'ya oksitlendiğinde ve ayrıca bitki içinde 2-CE'ye dönüştürüldüğünde EO ve 2-CE gıdada bulunabilmektedir. Etilen teorik olarak hipokloritle (suda bulunan klorla) reaksiyona girerek 2-CE'yi oluşturabilmektedir. Bu, susamın işlenmesi sırasında (ısılatma, yıkama) veya tarımsal sulama esnasında gerçekleşebilmektedir (Anonim 2020).

Yiyeceklerde kalan ve dolayısıyla ağızdan alınan herhangi bir dönüşüme uğramamış EO kalıntısı, asidik koşulların ve yüksek klorür konsantrasyonlarının meydana geldiği midede kısmen 2-CE'ye dönüşmesi beklenmektedir (Anonim 2020).

EO, buharlaşma veya reaksiyonlar yoluyla gıdada hızla kaybolur, bu nedenle tüketicilerin gıda tüketimi yoluyla EO ile ilgili kalıntılara maruz kalması esas olarak EO reaksiyon ürünleri ile ilgili olacaktır ve bunlardan en önemlisi 2-CE'dir. 2-CE, mevcut MRL kalıntı tanımına dâhil edildiği için yasal olarak da önemlidir. Sindirilen 2-CE, alkol dehidrojenaz tarafından 2-kloroasetaldehide ve son olarak 2-kloroasetik aside oksitlenmektedir. Hem 2-kloroasetaldehit hem de 2-kloroasetik asit glutatyon konjugasyonu yoluyla detoksifiye edilmektedir. 2-kloroasetaldehit toksikolojik olarak 2-CE'den daha kritiktir ve European Chemicals Agency (ECHA) tarafından Kategori 2 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Anonim 2020). Hava sorunları nedeniyle filizlenmeyi hızlandırmak için üzüm asmalarına 2-CE bazı Tayvanlı çiftçiler tarafından uygulanmıştır. Bu uygulamayla kazara kendilerini zehirlenme riski meydana gelmiştir. Metabolik asidoz, inatçı hipotansiyon, solunum yetmezliği, nöbet ve komada kendini gösteren şiddetli veya ölümcül zehirlenme, oral, deri veya inhalasyon maruziyeti yoluyla ortaya çıkabilmektedir (Chen vd. 2010).

EC yönetmeliği 396/2005, EO ve türevi olan 2-kloroetanol (EO olarak ifade edilen her iki kimyasalın toplamı olarak) için 0,02 ila 0,1 mg/kg seviyelerinde MRL'ler verirken, ABD'de EO için MRL gıdanın türüne bağlı olarak 7 ila 50 mg/kg, 2-kloroetanol için 940 mg/kg'dır. Kanada'da EO için MRL'ler 7 mg/kg ve 2-kloroetanol için 940 mg/kg düzeyindedir (Dudkiewicz vd. 2022).

German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) yakın zamanda 2-CE'nin toksisitesini değerlendirmiştir. 2-CE'nin kesin olmayan toksikolojik tablosu göz önüne alındığında, ihtiyat yaklaşımının izlenmesine ve 2-CE'nin EO ile eşit derecede toksik olduğuna karar verilmiştir (Anonim 2020). Çizelge 2.3'te EO ve 2-CE'nin bazı fizikokimyasal özellikleri belirtilmiştir.

Çizelge 2.3 EO ve 2-CE'nin fizikokimyasal özelliklerinin yaygın çözücülerle karşılaştırılması (Anonim 2020).

Bileşen	LogKow	Moleküler ağırlık	20 °C'de buhar basıncı	Kaynama noktası
EO	-0.3	44.05	1.45 bar	10.4 °C
Asetonitril	-0.34	41.05	0.1 bar	80.2 °C
Etanol	-0.3	46.07	0.06 bar	78.5 °C
Su	---	18.02	0.02 bar	100 °C
2-CE	0.14	80.52	0.007 bar	129 °C

2.4 2-Bromoetanol

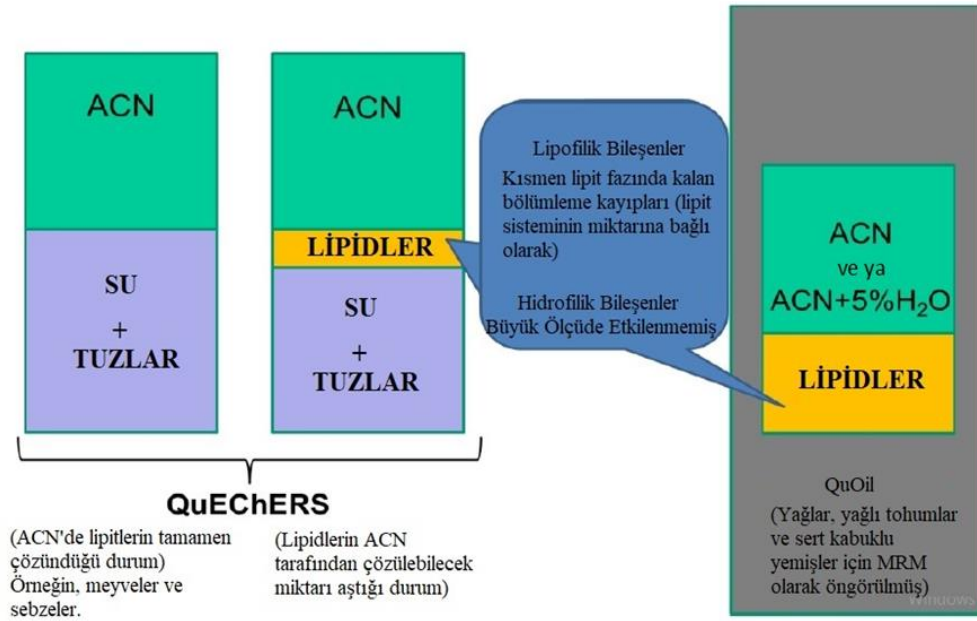
Benzer şekilde 2-bromoetanol (2-BE), EO'nun gıdadaki bromürlerle reaksiyonunun bir ürünüdür. 2-CE ve EO'ya benzer toksikolojik özelliklere sahiptir. Yani ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına neden olur, ayrıca ciltle temasında ve solunduğunda akut toksiktir. 2-CE aksine, 2-BE, 396/2005 sayılı EC yönetmeliğinde MRL'yi belirtmemektedir. Bunun nedeni muhtemelen gıdalardaki klorürlere kıyasla bromür seviyelerinin daha düşük olmasıdır. Dolayısıyla önemli konsantrasyonlarda EO ile kirlenmiş gıdalarda 2-BE oluşma potansiyeli düşüktür (Dudkiewicz vd. 2022). Şekil 2.4'de 2-BE kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.4 2-BE kimyasal yapısı (Merck, İnt. Kyn.4).

2.5 Etilen Oksit Analizinde Uygulanan Bazı Metotlar

European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides Requiring Single Methods (EURL-SRM) tarafından 2020 yılında yayınlanan analiz raporunda bu analizin yapılmasının Quecher's metoduyla saflaştırma ve asetonytril (ACN) ile ekstrakte etme şeklinde gerçekleştirildiği belirtilmiştir. $2 \pm 0,02$ g numune tartılmış ve üzerine 10 mL ACN ilave edilerek 15 dk çalkalanmıştır. Burada numunenin saflaştırma basamağında lipid ve yağ asitlerini uzaklaştırmak için Quecher's kiti $C_{18}/PSA/MgSO_4$ (25/25/150 mg/mL) ilave edilerek 1-2 dk daha karıştırılmış ve 3000 g'de santrifüj edilerek katı kısım filtre edilerek ayrıştırılmıştır. Elde edilen sıvı örnek cihaz vialine alınarak GC/MSMS cihazında okutulması sağlanmıştır. Şekil 2.5 Quecher's ve Quoil metotlarındaki faz ayrışımını gösterilmiştir (Anonim 2020). Bu metotta uygulanan GC şartları ve Multiple Reaction Monitoring (MRM) verileri Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5 Lipitlerin rolü ve pestisitlerin polaritelerine bağlı olarak fazlar arasında bölünmesi açısından QuEChERS ve QuOil'e genel bakış (Anonim 2020 kaynağından esinlenmiştir).

Çizelge 2.4 EURL-SRM EO metot şartları (Anonim 2020).

GC	Thermo Trace 1310 ile TriPlusRSH Autosampler
Enjeksiyon	Gerstel KAS 6
MSMS	Thermo TSQ 8000
Kolon	J&W HP-VOC GC Kolon, 30 m, 0.20 mm, 1.10 µm, Parti no:19091R-303
Ön Kolon	Fused Silica Tubing, Deactivated, Çap: 0.25 mm, Agilent J&W, uzunluk: 3 m
Mobil Faz / Akış	Helyum, 1 mL sabit akış
Enjeksiyon Modu	Split 1:4
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Enjeksiyon Isı Programı	90°C'de başlayın ve 0,8 dakika tutun, 12°C/s artışla 250°C'ye çıkın, 10 dakika tutun,
Kolon Isı Programı	Başlangıç: 45 °C, 2 dakika tutuldu, artarak 4,1 dakikada 150°C'ye ulaşıldı; 5,1 dakikada 280°C'ye ulaşıldı, 16. dakikaya kadar kalındı
MS Parametreleri	Kütle eksenini ayar modu: LowMass İyonizasyon modu: EI Transfer hattı sıcaklığı: 250°C; İyon kaynağı sıcaklığı: 270°C

Çizelge 2.5 EURL-SRM EO ve 2-CE MRM detayları (Anonim 2020).

Bileşen Adı	Alıkonma Süresi dk	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)	Collision Energy (CE)
EO	2.57	44	14	20
		44	28	5
		44	29	5
EO D4	2.57	48	16	20
		48	30	5
		80	31	5
2-CE	4.61	80	43	5
		82	31	5
		84	33	5
2- CE D4	4.61	86	33	5

Agilent firması tarafından uygulama kılavuzuyla 2022 yılında yayınladığı bilgede etilen oksit analizinin asidik ortamda klor ilavesiyle etilen oksitten 2-CE elde edilmiş ve analizin akışı 2-CE üzerinden devam etmiştir. Burada 2 g numune 50 mL'lik santrifüj tüpüne tartılmış ve 10 ng/g seviyesinde EO ile kirletme uygulanmıştır. Üzerine 2 mL saf su, 2 mL 0,2 N H₂SO₄ ve 1 mL doymuş tuzlu su çözeltisi ilave edilmiştir. 20 dk ultrasonik karıştırıcıda karıştırılmış, 1 saat 50 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Sonrasında oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış ve vortekslenmiştir. 5 mL etil asetat ilave edilerek 10 dk karıştırılmıştır. 8000 rpm'de 5°C'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan sıvı fazdan 1 mL alınarak Quecher's temizleme kitine konularak çalkalanmış ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Son haldeki sıvı kısım analiz vialine alınarak GC/MSMS cihazında okutulması gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 10 ng/g seviyesindeki EO'nun geri kazanım oranı

%82,3 olarak bildirilmiştir (Anonim 2022). Bu metotta uygulanan GC şartları ve kütle spektroskopisi (MS) verileri Çizelge 2.6 ve Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.6 Agilent EO uygulama kılavuzu GC şartları (Anonim 2022).

GC Koşulları	
Kolon	Agilent VF-624 ms, 60 m × 0.25 mm, 1.4 µm (p/n CP9103)
İnlet	Agilent Multimode İnlet 5190-2293, splitless liner, Enjeksiyon Hacmi: 2 µL
Enjeksiyon Modu	Pulsed Splitless, 0,8 dakikaya kadar 25 psi, 1,25 dakikada 40 mL/dak'lık temizleme akışı
İnlet Sıcaklığı	250°C
Kolon Fırını	2 dk 60 °C, 10 °C/dk artışla 150 °C, 40 °C/dk artışla 250 °C, 20 dk sabit
Taşıyıcı Gaz	% 99.9995 saflıkta Helyum 1.0 ml/dk, sabit akış modu

Çizelge 2.7 Agilent EO uygulama kılavuzu MS şartları (Anonim 2022).

MS Koşulları	
Quadropol Sıcaklığı	150 °C
İyon Kaynağı Sıcaklığı	EI 280 °C
Taşıyıcı Hat Sıcaklığı	250 °C
MRM Etilen Klorohidrin için Geçişler	82 & 31 (CE: 5) 80 & 43 (CE: 5) 80 & 31 (CE: 5)
EMV Modu	Kazanım Faktörü:10
Her Geçiş için Bekleme Süresi	75
Solvent Gecikmesi	9.5

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

Validasyon çalışması için içeriğinde EO ve 2-CE tespit edilmeyen keçiboynuzu numuneleri Afyonkarahisar Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

Bu çalışmada Shimadzu 2030 GC, Shimadzu MSMS / TQ8050NX, Shimadzu AOC-20i autosampler, Rxi-624 Sil MS 30m x 1,40µm x 0,25mm kolon, helyum ve argon gazları (99,999 saflıkta), Blendtech blender, Shimadzu terazi (TX4202VN), Centurion soğutmalı santrifüj (K2015R), Hydra ultrasonik su banyosu (UC-DP18), vorteks, Heidolph çalkalayıcı, MS grade ultra saf su (Carlo Erba, batch number: V3C703303C), MS grade asetonitril (J.T Baker, Lot no: 2222905860), NaCl (Chem Lab, batch number: 30.9703103), HCl (Honeywell, Lot no: M040A), EO (Accustandard, Cas No: 75-21-8) ve 2-CE (Accustandard, Cas No: 107-07-3) standartları ve 0,22 PTFE (Chrom Fil, Lot no: 20220319001) membran filtre kullanılmıştır.

3.2 Metot

Gıda matriksindeki pestisitlerin belirlenmesinde çoğunlukla aseton, etil asetat ve asetonitril gibi çözücüler kullanılmaktadır. Bu kimyasalların hepsi de analitlerin geri kazanımlarında büyük bir başarı sağlamaktadır. Yapılan denemelerde meyve ve sebzelerde ekstraksiyon aşamasında asetonitril kullanmanın, aseton ve etil asetatla karşılaştırıldığında girişim sorunlarını azalttığı ve bu nedenle, Quecher's yönteminde ekstraksiyon çözücü olarak kullanılmasının daha uygun olduğu belirlenmiştir (Erkaymaz 2017, Anonim 2020).

Literatür araştırmalarındaki metot şartları göz önüne alınarak uygulanacak olan metot değerlendirilmiştir. Literatür bilgilerinde belirtildiği gibi EO düşük sıcaklıklarda buharlaşabilmesi göz önüne alındığında bu maddenin türevlendirilerek 2-CE'ye dönüştürülmesi analiz stabilitesi için daha uygun olacağı değerlendirilmektedir. Bu dönüştürme işlevinin yapılabilmesi için gerekli olan asit ortam için 0,2 N HCl; klor iyonu kaynağı için de doygun NaCl çözeltisi kullanılmıştır (Wenio vd. 2023). Türevlendirme sonrasında numunenin saflaştırma basamağında iki aşamalı Quecher's kitleri kullanılmış;

birinci aşamada magnezyum sülfat ve sodyum asetat, ikinci aşamada PSA, magnezyum sülfat ve C₁₈ kullanılmıştır (Anonim 2022).

Bu çalışmada tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları aynı laboratuvar, aynı cihaz ve metotla, aynı uygulama koşulları altında, iki farklı analist tarafından ve iki farklı konsantrasyonda 5 tekrarlı olarak analizler gerçekleştirilmiştir (Anonim 2021). Çalışmalar aynı koşullar altında farklı zamanlarda iki farklı analist tarafından tekrarlanarak laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik verileri elde edilmiştir. Ayrıca seçicilik/spesifiklik, doğrusalılık ve sağlamlık parametreleri de çalışılarak veriler elde edilmiştir (Anonim 2018a).

Ülkemiz mevzuatında yürürlükte olan Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'nde belirtildiği üzere ürün sınıfına bağlı olarak 0.02 mg/kg ila 0.1 mg/kg değişen mevzuat limitleri yer almaktadır (TGK 2021). Bu değerlere bakıldığında EO için verilen mevzuat limitinin EO ve 2-CE toplamının EO olarak cinsinden değerlendirilmesi ifade edilmiştir. Yani üründe hem EO varlığı hem de 2-CE varlığı dikkate alınarak toplam limit EO cinsine çevrilmesi gerekmektedir. 2-CE için EO cinsine çevirme katsayısı Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddelerinin Spesifikasyonları Hakkında Yönetmeliğin Ek-2 bölümünde belirtildiği üzere 0,55 olarak hesaplanmaktadır. Tespit edilen 2-CE, 0,55 olan çevirme katsayısıyla çarpılmakta ve elde edilen değer tespit edilen EO ile toplanarak toplam EO sonucu elde edilmektedir (TGK 2017).

3.2.1 Standartların Hazırlanması

Bu çalışmada EO 5000 µg/mL ve 2-CE 100 µg/mL standartları kullanılmıştır. Bu standartlardan EO için 250, 10 ve 1 µg/mL; 2-CE için 10 ve 1 µg/mL ara stok çözeltileri hazırlanmıştır. Standart hazırlama amacıyla solvent olarak GC MS grade asetonitril kullanılmıştır (Anonim 2020, Anonim 2021).

3.2.2 Kromatografik Şartlar

Numunelerde kalıntı olarak bulunması beklenen ana analit olan 2-CE, güçlü molekül içi hidrojen bağlarına atfedilen, boyutuna göre oldukça düşük bir uçuculuk göstermektedir. Ayrıca matriste ve GC analizi sırasında oldukça kararlılık göstermektedir. 2-CE ve

EO'nun standart LC/MSMS ölçümüne uygun olmaması ve her iki bileşiğin de GC/MSMS'ye uygun olması, ikinci yaklaşımı odaklanılacak ilk seçenek haline getirmektedir (Anonim 2020). Bu çalışmada kullanılan GC/MSMS çalışma şartları ve MRM verileri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 GC/MSMS cihaz bilgileri ve çalışma şartları.

GC	Shimadzu TQ8050NX
Enjeksiyon	Shimadzu AOC
MSMS	Shimadzu 2050
Kolon	Rxi-624 Sil MS 30m x 1,40um x 0,25mm kolon
Mobil Faz / Akış	Helyum ve Argon Gazları, 1,8 mL sabit akış
Enjeksiyon Modu	Splitless
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Enjeksiyon Sıcaklığı	70°C
Kolon Sıcaklık Programı	Başlangıç: 35 °C, 2,5 dakika tutuldu, dakikada 15°C artarak 150°C'ye ulaşıldı; dakikada 35°C artarak 230°C'ye ulaşıldı ve 1 dk sabit kalındı
MS Parametreleri	Kütle eksenini ayar modu: LowMass İyonizasyon modu: EI Transfer hattı sıcaklığı: 250°C; İyon kaynağı sıcaklığı: 270°C

Çizelge 3.2 EO ve 2-CE analitlerine ait GC/MSMS cihazındaki MRM verileri.

Analit	Q1-Ana İyon (m/z)	Q3-Yavru İyon (m/z)	Collision Energy (CE)
Ethylene Oxide	44.00	28.00	5.00
	44.00	29.00	5.00
	44.00	14.00	20.00
	80.00	43.00	5.00
	80.00	44.00	5.00
2-Chloroethanol	80.00	31.00	5.00
	79.00	42.00	6.00
	82.00	31.00	8.00

3.2.3 Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrileri matrix-matched olarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon kurvesi kullanılarak analiz edilen numunede bulunan kalıntı konsantrasyonu hesaplanmıştır (Anonim 2021). Kalibrasyon eğrisi çizdirmek amacıyla, eşit konsantrasyondaki EO ve 2-CE mix stoklarından Çizelge 3.3’de belirtilen hacimlerde kirlenme yapılarak, blank-20-50-100-250 µg/kg konsantrasyonlarındaki numunelerle 5 noktalı kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken hazırlanacak konsantrasyonlar için kullanılan standart miktarları Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Kalibrasyon grafiği standart kullanım miktarları.

Kalibrasyon Noktaları	Konsantrasyon (µg/kg)	Numune Miktar (g)	200 µg/kg EO ve 2-CE miks Stok Alınan Hacim	1 mg/kg EO ve 2-CE miks Stok Alınan Hacim
1	Blank	2	-	-
2	20	2	130 µl	
3	50	2		65 µl
4	100	2		130 µl
5	250	2		325 µl

3.2.4 Etilen Oksit Analizi

Analize alınacak olan numune öncelikle homojenize edilmiştir. Bu çalışmada homojenizasyon amacıyla Blendtech marka blender ile numune öğütülerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örnekten 2 g numune 50 ml’lik santrifüj tüpüne tartılmıştır. 1 ml 0,2 N HCl, 2 ml doymuş NaCl çözeltisi (Wenio vd. 2023) ve 7 ml asetonitril eklenmiştir (Erkaymaz 2017, Anonim 2020). 60°C Ultrasonik su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan numuneler oda sıcaklığına ulaşması sağlanmış ve 10 dk dinlendirilmiştir. Üzerine 3,2 g magnezyum sülfat ve 0,8 g sodyum asetat eklenmiştir. Bu aşamada çeşitli firmalardan temin edilebilecek hazır pestisit analiz kitleri kullanılabilir. 10 dk kuvvetlice çalkalanmış ve 10 dk 10°C’de 4000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Üst faz 15 ml’lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 0,2 g PSA, 0,6 g magnezyum sülfat ve 0,2 g C₁₈ ilave edilmiştir (Anonim 2022). Bu aşamada çeşitli firmalardan temin edilebilecek hazır pestisit analiz kitleri kullanılabilir. 10 dk kuvvetlice çalkalanmış ve 10 dk 10°C’de 4000 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Üst faz 0,22 µm’lik PTFE filtrelerden geçirilerek cihaz vialine alınmıştır.

3.2.5 Validasyon

Bu metodun validasyon (geçerli kılma) çalışması, aşağıdaki parametreler göz önüne alınarak yapılmıştır;

- Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
- Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik (Reproducibility)
- Geri kazanım (Recovery)
- Sağlamlık (Robustness / Ruggedness)

3.2.6 Ölçüm Belirsizliği

Uygulanan analiz metodunun ölçüm belirsizliğine etki eden belirsizlik bileşenleri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır;

- Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik
- Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlikten gelen belirsizlik
- Geri Kazanımdan gelen belirsizlik

3.2.7 İstatistiksel Analizler ve Değerlendirmeler

Bu çalışmada Grubb's testi, her bir çalışma setinde laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik parametrelerinde sapan değerler olup olmadığını istatistiksel olarak kontrol etmek için kullanılmıştır. Grubb's testi hesaplamaları uygun olarak elde edilmiştir (Anonim 2014).

Bu çalışmada analiz sonuçlarını istatistiksel olarak karşılaştırmak için F ve t testleri uygulanmıştır. F testi ile elde edilen veri setlerinin iki standart sapması arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını; elde edilen veri setlerindeki ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı t testi ile kontrol edilmiştir. Karşılaştırma testlerindeki hesaplamalar uygun olarak elde edilmiştir (Anonim 2014; Anonim 2018a).

Uygulanan metot şartlarında meydana gelebilecek olana küçük değişikliklerin metodun sonucuna etki ederek anlamlı bir farkın olup olmayacağı Youden istatistiği kullanılarak metot sağlamlığı kontrol edilmiştir. Sağlamlık çalışmasında, 7 faktörlü Youden deney deseni oluşturulmuş ve hesaplanan veriler laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik bileşik standart sapma değeriyle karşılaştırılmıştır. İlgili hesaplama ve değerlendirmeler uygun olarak elde edilmiştir (Anonim 2014; Anonim 2018a).

Tekrarlanabilirliğin ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirliğin kontrolünü sağlamak amacıyla tekrarlanabilirlik relatif standart sapması ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik relatif standart sapması hesaplanmıştır. Hesaplanan relatif standart sapmalar Horwitz eşitliğinde hesaplanan relatif standart sapma değerleri ile karşılaştırılmıştır. Hesaplamalar ve karşılaştırmalar uygun olarak yapılmıştır (Anonim 2014; Anonim 2018a).

Yapılan çalışmada % geri kazanım oranlarının hesaplanması Anonim (2018a)'e göre yapılmıştır. Düşük (100 µg/kg) ve yüksek (200 µg/kg) konsantrasyon için %70-%120 ortalama geri kazanım oran aralığı belirlenmiştir (Anonim 2021). İlgili hesaplama ve değerlendirmeler uygun olarak elde edilmiştir (Anonim 2018a, Anonim 2021).

Lineerlik (Doğrusallık) çalışmasında elde edilen veriler residüel standart sapma ve regresyon analiziyle değerlendirilmiştir. Residüel standart sapma değerinin $\leq \pm \%20$ olduğu görülmüştür. Residüel standart sapma ve korelasyon katsayısı (R^2) Anonim (2018a)'e göre hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen veriler kullanılarak ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları Anonim (2012) ve Anonim (2018b) kaynaklarında belirtilen formüllere göre yapılmıştır. Ölçüm belirsizliği, ölçüm belirsizliği bileşenleri olan tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım relative standard deviation (RSD) değerleriyle birleştirilmiş standart belirsizlik ve genişletilmiş belirsizlik değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Validasyon Çalışmaları

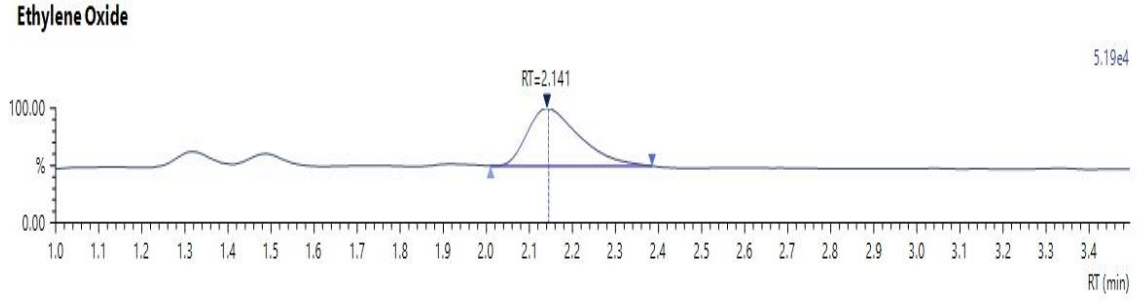
Validasyon, ulusal/uluslararası kabul görmüş standartlara göre, bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunu ve performansını yazılı olarak ortaya koymak için yapılan test ve ölçme işlemleridir (Anonim 2018a). Analitik bir prosedürün doğruluğunu ortaya koymak amacıyla yapılan validasyon çalışmaları, laboratuvarında kullanılan prosedür çerçevesinde yöntemin ihtiyaçlarını ve performansını karşılamak için oluşturulan süreçlerdir. Metot validasyonlarında doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık, çalışma aralığı, sağlamlık, vb. kullanılan validasyon parametreleridir (Çapraz 2024). Bu araştırmada fümigant olarak kullanılan EO kalıntısının validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon çalışmalarında uygulanan analiz metodu EO ve 2-CE kalıntılarının ürünün içeriğinde var olabileceği değerlendirilmiş ve metot şartları buna göre oluşturulmuştur. Ürünün içeriğinde var olabilecek EO kalıntısının asidik ortamda klor iyonu varlığında EO'dan daha stabil bir madde olan 2-CE'ye türevlendirilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada GC/MSMS cihazıyla seçicilik, doğrusallık (linearite), doğruluk (geri kazanım), kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik) ve sağlamlık (robustness / ruggedness) çalışmaları yapılmıştır. Valide edilen sonuçlar Çizelge 4.1-4.20, kromatogramlar ise Şekil 4.1-4.2 aralığında verilmiştir.

4.2 Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity)

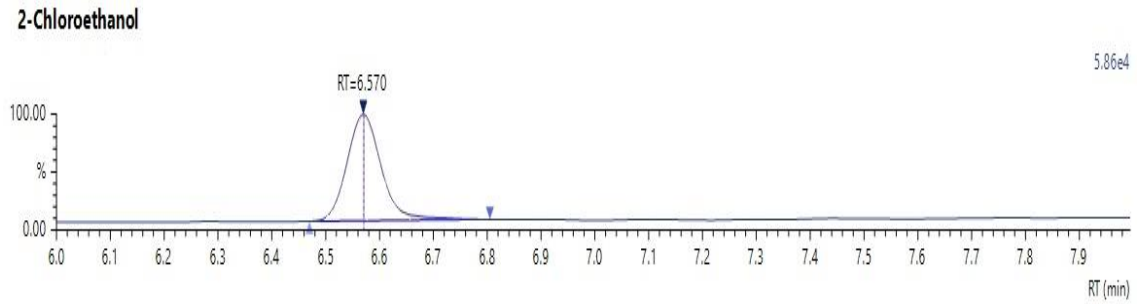
Seçicilik, metodun diğer analitlerin, matrikslerin ve/veya potansiyel girişim yapan materyallerin varlığında hedef analiti ölçebilmesidir (Anonim 2018a). Yapılan çalışmada kullanılan GC/MSMS cihazı ile EO ve 2-CE maddelerinin retention time (RT) belirlenmiştir. Parçalanma öncesi ana iyon kütleleri, CE ve parçalanma sonrasında oluşan yavru iyon kütleleri ile cihaz koşulları optimize edilmiştir.

Bu çalışmada kontrol numunesi olarak eşit konsantrasyonda EO ve 2-CE standartları keçiyoynuzu numunesine spike yapılarak cihaza verilmiştir. Kullanılan metoda göre 2-CE maddesinin Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi ana kütleleri 79, 80 ve 82 olarak tespit edilmiştir. Analiz sonucunda GC/MSMS cihazında parçalanma iyonu olarak 31, 42, 43 ve 44 kütleli ürünlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu tespit edilen iyonlara ait

piklerin aynı anda geldiği, bunların dışında başka bir pik gelmediği görülmüştür. Bu çalışmaya ait kromatogram verisi Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.



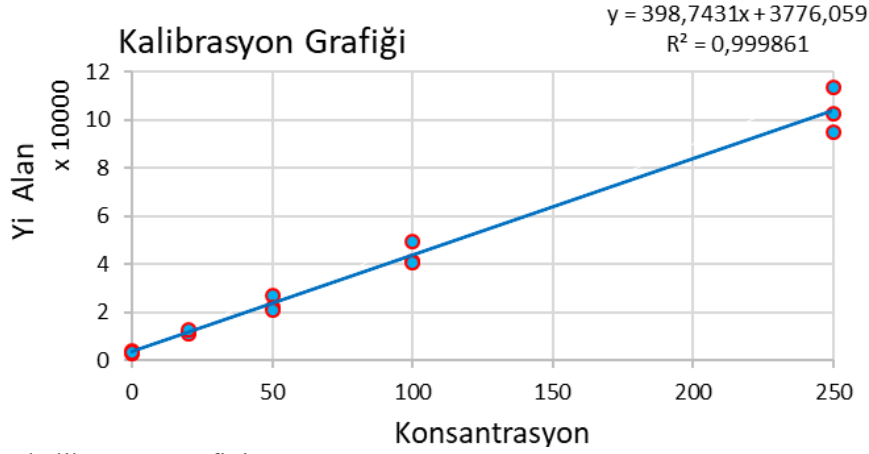
Şekil 4.1 EO standardı GC/MSMS kromatogramı.



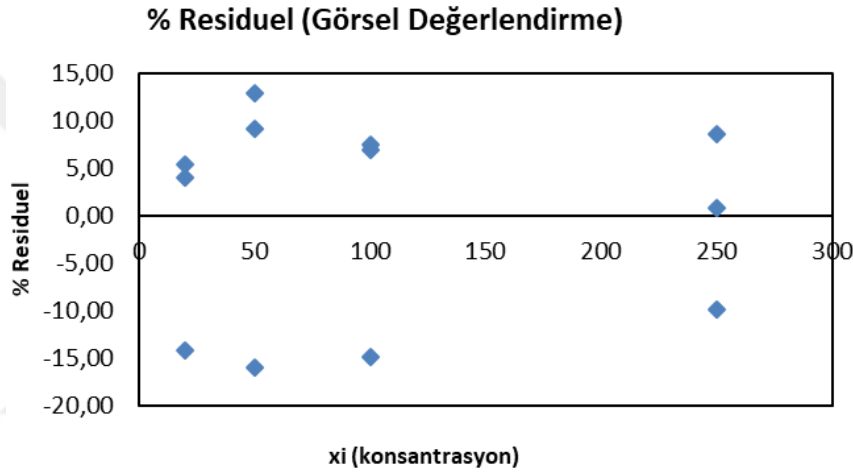
Şekil 4.2 2-CE standardı GC/MSMS kromatogramı.

4.3 Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık, analit konsantrasyonu ile test sonuçlarının orantılı olarak elde edilebilmesidir (Anonim 2018a). Doğrusallık çalışmasında uygulanacak analit konsantrasyonları validasyon çalışmasındaki tüm konsantrasyonları kapsayacak şekilde yapılması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmada doğrusallık kontrolü için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi keçi boynuzu numunesinde matrix-matched olarak hazırlanmıştır (Anonim 2021). Kalibrasyon eğrisi, blank-20-50-100-250 µg/kg konsantrasyonlarından blank dâhil 5 noktalı olarak hazırlanmış ve her bir nokta üçer kez okutulmuştur. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken hazırlanacak konsantrasyonlar için kullanılan standart miktarları Çizelge 3.3’te gösterilmiştir. Öngörülen konsantrasyon aralıkları için tespit edilen kalibrasyon fonksiyonlarının uygunluğu, $\text{residual} \leq \pm \%20$ koşuluna göre değerlendirilmiştir. Kalibrasyona ait veriler Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.3 EO kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.4 EO residüel kontrol grafiği.

Çizelge 4.1 Keçiboynuzu matriksinde EO lineer ölçüm sonuçları.

X_i (Konsantrasyon)	Y_i (Alan)	X_i Hesaplanan	Sapma= X_i Hesaplanan- X_i	% Sapma
0	4083,00	0,77	-0,77	-----
0	2786,00	-2,48	2,483	-----
0	3417,00	-0,90	0,9	-----
20	11432,00	19,20	0,8	4
20	11321,00	18,92	1,078	5,39
20	12885,00	22,84	-2,844	-14,22
50	26899,00	57,99	-7,99	-15,98
50	21910,00	45,48	4,522	9,044
50	21144,00	43,56	6,443	12,886
100	49593,00	114,90	-14,903	-14,903
100	40913,00	93,14	6,865	6,865
100	40656,00	92,49	7,51	7,51
250	113382,00	274,88	-24,88	-9,9516
250	102680,00	248,04	1,96	0,7844
250	94914,00	228,56	21,44	8,5748

4.4 Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Tekrarlanabilirlik, kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altındaki kesinliği ifade eder, aynı zamanda, deneme-içi (intra assay) olarak da adlandırılır (Ertaş vd. 2018). Tekrarlanabilirlik çalışmasında aynı laboratuvarında, aynı cihaz ve metotla, aynı uygulama koşulları altında, iki farklı analist tarafından iki farklı konsantrasyonda 5 tekrarlı olarak analizler gerçekleştirilmiştir (Anonim 2021). Bu çalışmada içeriğinde EO ve 2-CE kalıntıları tespit edilmemiş keçiboynuzu numunesi EO ve 2-CE (EO cinsinden düşük 100 µg/kg, yüksek 200 µg/kg) ile zenginleştirilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak Grubb's değerlendirmeleri, standard deviation (SD), RSD ve %RSD değerleri hesaplanmıştır. Metoda uygun şekilde analiz edilen numunelere ait sonuçlar Çizelge 4.2-4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon (100 µg/kg).

Analizi Yapanlar	I. Analist	II. Analist
Numune		
1	98,758	101,985
2	106,286	107,071
3	99,982	102,651
4	109,83	100,114
5	105,384	104,679
Ortalama (ORT)	104,048	103,300
SD	4,603	2,666
Minimum (Min)	98,758	100,114
Maksimum (Max)	109,830	107,071
Grubb's Low (GL)	1,149	1,195
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
Grubb's High (GH)	1,256	1,415
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,672	1,672
N	5	5
Hedef RSD	20	20
%RSD	4,424	2,581
Değerlendirme	Uygun	Uygun
RSD	0,044	0,026
RSDbirleşik	0,036	
En Kötü Durum (RSD)	0,044	

Çizelge 4.3 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon F testi (100 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	104,048	103,3
Varyans	21,18538	7,105776
Gözlem	5	5
df	4	4
F	2,981430881	
P(F<=f) tek-uçlu	0,157563767	
F Kritik iki-uçlu	6,388232909	

Çizelge 4.4 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik düşük konsantrasyon t testi (100 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	104,048	103,3
Varyans	21,18538	7,105776
Gözlem	5	5
Birikimli Varyans	14,145578	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	8	
t Stat	0,31445699	
P(T<=t) tek-uçlu	0,380609214	
t Kritik tek-uçlu	1,859548038	
P(T<=t) iki-uçlu	0,761218428	
t Kritik iki-uçlu	2,306004135	

Çizelge 4.5 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon (200 µg/kg).

Analizi Yapanlar	I. Analist	II. Analist
Numune		
1	201,689	203,707
2	207,699	202,714
3	205,329	208,156
4	216,718	212,011
5	214,772	200,751
ORT	209,241	205,468
SD	6,348	4,554
Min	201,689	200,751
Max	216,718	212,011
GL	1,190	1,036
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
GH	1,178	1,437
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,672	1,672
n	5	5
Hedef RSD	20	20
%RSD	3,034	2,217
Değerlendirme	Uygun	Uygun
RSD	0,030	0,022
RSDbirleşik	0,027	
En Kötü Durum (RSD)	0,030	

Çizelge 4.6 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon F testi (200 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	209,2414	205,4678
Varyans	40,3029253	20,7429797
Gözlem	5	5
df	4	4
F	1,942967013	
P(F<=f) tek-uçlu	0,267913524	
F Kritik iki-uçlu	6,388232909	

Çizelge 4.7 Keçiboynuzu tekrarlanabilirlik yüksek konsantrasyon t testi (200 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	209,2414	205,4678
Varyans	40,3029253	20,7429797
Gözlem	5	5
Birikimli Varyans	30,5229525	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	8	
t Stat	1,079972252	
P(T<=t) tek-uçlu	0,155817278	
t Kritik tek-uçlu	1,859548038	
P(T<=t) iki-uçlu	0,311634555	
t Kritik iki-uçlu	2,306004135	

Çizelge 4.8 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon (100 µg/kg).

Analizi Yapanlar	I. Analist	II. Analist
Numune		
1	105,384	104,679
2	94,069	104,758
3	101,017	95,974
4	103,899	109,746
5	105,082	106,453
ORT	101,890	104,322
SD	4,700	5,098
Min	94,069	95,974
Max	105,384	109,746
GL	1,664	1,637
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
GH	0,743	1,064
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,672	1,672
n	5	5
Hedef RSD	20	20
%RSD	4,613	4,887
Değerlendirme	Uygun	Uygun
RSD	0,046	0,049
RSDbirleşik	0,048	
En Kötü Durum (RSD)	0,049	

4.5 Laboratuvar İçi Tekrar Üretilirlik (Reproducibility)

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik çalışmasında aynı laboratuvar, aynı cihaz ve metotla, farklı zaman aralıklarında, iki farklı analist tarafından iki farklı konsantrasyonda 5 tekrarlı olarak analizler gerçekleştirilmiştir (Anonim 2021). Bu çalışmada içeriğinde EO ve 2-CE kalıntıları tespit edilmemiş keçi boynuzu numunesi EO ve 2-CE (EO cinsinden düşük 100 µg/kg, yüksek 200 µg/kg) ile zenginleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen beşinci veriler laboratuvar içi tekrar üretilebilirliğin ilk verisi olarak alınmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak Grubb's değerlendirmeleri, SD, RSD ve %RSD değerleri hesaplanmıştır. Metoda uygun şekilde analiz edilen numunelere ait sonuçlar Çizelge 4.8-4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.9 Keçi boynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon F testi (100 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	104,322	101,8902
Varyans	25,9918965	22,0907877
Gözlem	5	5
df	4	4
F	1,176594373	
P(F<=f) tek-uçlu	0,439283512	
F Kritik iki-uçlu	6,388232909	

Çizelge 4.10 Keçi boynuzu tekrar üretilebilirlik düşük konsantrasyon t testi (100 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	104,322	101,8902
Varyans	25,9918965	22,0907877
Gözlem	5	5
Birikimli Varyans	24,0413421	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	8	
t Stat	0,784184952	
P(T<=t) tek-uçlu	0,227760638	
t Kritik tek-uçlu	1,859548038	
P(T<=t) iki-uçlu	0,455521275	
t Kritik iki-uçlu	2,306004135	

Çizelge 4.11 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon (200 µg/kg).

Analizi Yapanlar	I. Analist	II. Analist
Numune		
1	214,772	200,751
2	207,456	191,414
3	197,189	203,157
4	199,552	212,077
5	205,9	198,404
ORT	204,974	201,161
SD	6,947	7,515
Min	197,189	191,414
Max	214,772	212,077
GL	1,121	1,297
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
GH	1,410	1,453
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,672	1,672
n	5	5
Hedef RSD	20	20
%RSD	3,389	3,736
Değerlendirme	Uygun	Uygun
RSD	0,034	0,037
RSDbirleşik	0,036	
En Kötü Durum (RSD)	0,037	

Çizelge 4.12 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon F testi (200 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	201,1606	204,9738
Varyans	56,4790573	48,2557282
Gözlem	5	5
df	4	4
F	1,17041146	
P(F<=f) tek-uçlu	0,441234203	
F Kritik iki-uçlu	6,388232909	

Çizelge 4.13 Keçiboynuzu tekrar üretilebilirlik yüksek konsantrasyon t testi (200 µg/kg).

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	204,9738	201,1606
Varyans	48,2557282	56,4790573
Gözlem	5	5
Birikimli Varyans	52,36739275	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	8	
t Stat	0,833161346	
P(T<=t) tek-uçlu	0,214462465	
t Kritik tek-uçlu	1,859548038	
P(T<=t) iki-uçlu	0,42892493	
t Kritik iki-uçlu	2,306004135	

4.6 Geri kazanım (Doğruluk)

Geri kazanım (doğruluk), analitin gerçek (referans) değeri ile analiz işleminden elde edilen sonucun yüzde (%) oranı olarak ifade edilebilmektedir. Analiz çalışması esnasında oluşabilecek hatalara karşı bir kontrol mekanizması olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmada içeriğinde EO ve 2-CE tespit edilmemiş keçiboynuzu numunesi eşit konsantrasyonlarda EO ve 2-CE (EO cinsinden düşük 100 µg/kg, yüksek 200 µg/kg) ile zenginleştirilmiştir. Burada gösterilen sonuçlar Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilmiştir (Anonim 2018a).

Geri Kazanım düşük konsantrasyon sonuçları Çizelge 4.14’de, yüksek konsantrasyon sonuçları Çizelge 4.15’de, tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.14 Keçiboynuzu geri kazanım değerleri düşük konsantrasyon (100 µg/kg).

Analizi yapanlar	I. Analist		II. Analist	
Kabul Kriteri (%GK)	Min: %70, Max:%120		Min: %70, Max:%120	
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	98,76	Uygun	101,99	Uygun
2	106,29	Uygun	107,07	Uygun
3	99,98	Uygun	102,65	Uygun
4	109,83	Uygun	100,11	Uygun
5	105,38	Uygun	104,68	Uygun

Çizelge 4.15 Keçiboynuzu geri kazanım değerleri yüksek konsantrasyon (200 µg/kg).

Analizi yapanlar	I. Analist		II. Analist	
Kabul Kriteri (%GK)	Min: %70, Max:%120		Min: %70, Max:%120	
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	100,84	Uygun	101,85	Uygun
2	103,85	Uygun	101,36	Uygun
3	102,66	Uygun	104,08	Uygun
4	108,36	Uygun	106,01	Uygun
5	107,39	Uygun	100,38	Uygun

Çizelge 4.16 Düşük ve yüksek konsantrasyonlar için ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi.

% Geri Kazanım Oranı ORT	103,68
SD	3,116250945
n	20
Standart belirsizlik $u(x)=Sd/karekök(n)$	0,696814895
t testi	5,274930298
t ölçütü	2,093024054
Relatif belirsizlik	0,006721105

4.7 Sağlamlık (Robustness / Ruggedness)

Sağlamlık bir metodun veya analiz prosedürünün uygulama esnasında meydana gelmesi muhtemel olan küçük değişikliklere karşın analiz değerlerindeki sapma olarak tanımlanabilir. Burada değişkenler pH, sıcaklık, çalkalama süresi ve numune miktarı olabileceği gibi kimyasal malzemelerin saflığı ve farklı kimyasallar da olabilmektedir. Bu çalışmada metod sağlamlığının kontrol edilmesi için seçilen parametreler Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Sağlamlık parametreleri.

Parametreler	Ana Metot Değerleri		Değişen Metot Değerleri	
Çalkalama Süresi	A	10 dk	a	8 dk
Su Banyosu süresi	B	30 dk	b	25 dk
Su Banyosu sıcaklığı	C	60 °C	c	57 °C
İkinci çalkalama	D	10 dk	d	8 dk
Santrifüj Sıcaklığı	E	10 °C	e	12 °C
Santrifüj Devri	F	4000 rpm	f	3000 rpm
Kolon Akış Hızı	G	1,8 ml	g	1,6 ml

Çizelge 4.17’te gösterildiği gibi 7 parametrede değişiklikler yapılarak her Keçiboynuzu numunesine 2-CE ve EO (EO cinsinden 100 µg/kg) ile kirletme uygulanarak iki tekrarlı analiz sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları ile Çizelge 4.18’de belirtilen Youden Deney Deseni oluşturularak laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapması baz alınarak değerlendirilmiştir (Anonim 2018a). Sağlamlık değerlendirmelerine ait veriler Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.18 Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.

Parametre Değer	Test No							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A-a	A	A	A	A	a	a	a	a
B-b	B	B	b	b	B	B	b	b
C-c	C	c	C	c	C	c	C	c
D-d	D	D	d	d	d	d	D	D
E-e	E	e	E	e	e	E	e	E
F-f	F	f	f	F	F	f	f	F
G-g	G	g	g	G	g	G	G	g
Birinci Analiz Sonucu (µg/kg)	97,6	102,6	97,7	100,3	100,5	97,4	99,2	98,0
İkinci Analiz Sonucu (µg/kg)	98,9	100,9	100,4	102,5	99,6	96,8	99,0	104,3
Ortalama (µg/kg)	98,2	101,8	99,0	101,4	100,0	97,1	99,1	101,1

Çizelge 4.19 Sağlamlık değerlendirmesi.

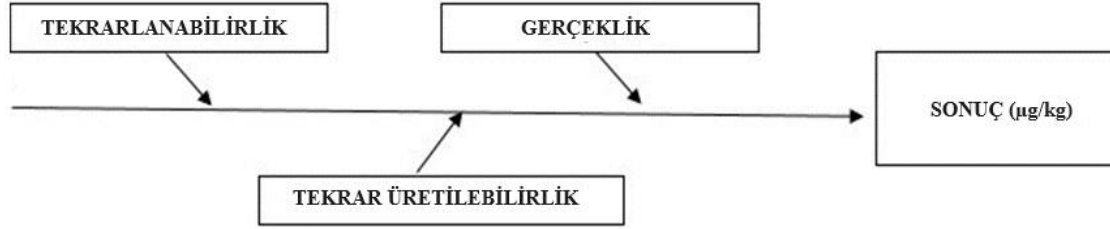
Parametre Değer	Fark (Di)	Farkların Karesi (Di ²)	SD	Değerlendirme
A-a	3,1	9,79	1,67	Değişiklik Önemli Değil
B-b	-3,5	12,22	1,87	Değişiklik Önemli Değil
C-c	-4,997	24,97	2,67	Değişiklik Önemli Değil
D-d	2,653	7,04	1,42	Değişiklik Önemli Değil
E-e	-6,847	46,88	3,66	Değişiklik Önemli Değil
F-f	3,785	14,33	2,02	Değişiklik Önemli Değil
G-g	-6,103	37,25	3,26	Değişiklik Önemli Değil
Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik – SD _{Birleşik}			4,90	

4.8 Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği, belirli bir ölçüm prosedürünün performans karakteristiği değil, ölçüm prosedürü kullanılarak elde edilen sonuçlardır (Ertaş vd. 2018).

Burada ayrı bir çalışma yapılmamış olup; tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım çalışmalarından elde edilen relatif belirsizlikler kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Uygulanan analiz metodunun belirsizlik bileşenleri

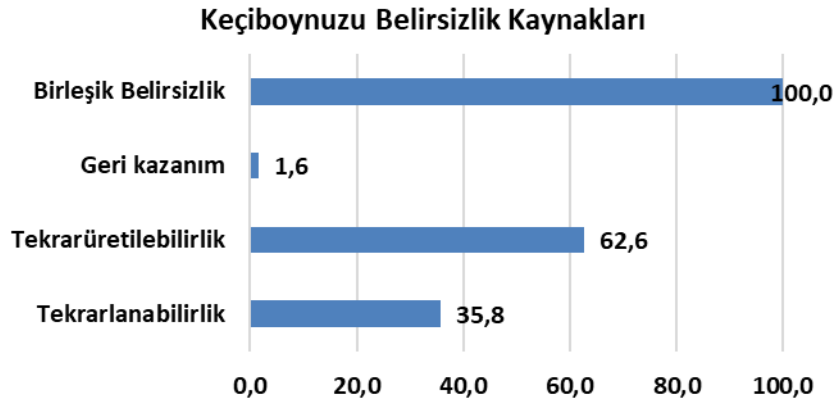
Şekil 4.5'te, belirsizlik bileşenleri grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir. EO için tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım belirsizlikleriyle hesaplanan birleşik belirsizlik ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği Çizelge 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Belirsizlik bileşenleri.

Çizelge 4.20 EO toplam belirsizlikleri (k=2 %95 güven aralığında verilmiştir).

Belirsizlik bileşenleri	Toplam Belirsizlik ve Belirsizlik Bütçesi
Tekrarlanabilirlik	0,03176
Tekrar üretilebilirlik	0,04201
Geri kazanım	0,00672
Birleşik Belirsizlik	0,05309
Genişletilmiş Bel.	0,10619
Genişletilmiş Bel. (%)	10,62



Şekil 4.6 Belirsizlik bileşenleri grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Wenio vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, yaklaşık 4 g guar gam 50 mL falcon tüpe tartılmış, üzerine 10 mg/L konsantrasyonunda EO standardından birinci seviye için 11 µL ve ikinci seviye için 110 µL kirletme uygulanmıştır. Sonrasında 100 µL internal standart ilave edilmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir. 10 °C’de soğutulmuş buzlu su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. 0,2 N HCl içiren ACN (1,7 mL HCl + 98,3 mL ACN) solüsyonundan 10 mL ve doymuş NaCl çözeltisinden 1 mL ilave edilmiş ve 30 dk çalkalanmıştır. 0,5 g MgSO₄ ilave edilerek 3000 rpm’de 2 dk santrifüjlenmiştir. Maksimum 4 mL süpernatant ile ekstrakte edilerek GC/MSMS’de analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada sonucunda 0,011 mg/kg seviyesindeki konsantrasyonda %101,4 geri kazanım ve 1,5 RSDwR (%) elde edilmiştir.

Bessaire vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, 5 g dondurma numunesi 50 mL falcon tüpe tartılmış ve buzlu su banyosuna konulmuştur. Numunede 0,02 mg/kg konsantrasyonunda olacak şekilde 2,5 µg/mL internal standarttan 40 µL ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. 5 mL doymuş NaCl ve 100 µL seyreltilmiş sülfirik asit (0,05 M, suda) ilave edilerek seramik homojenizer ile homojenize edilmiştir. 60 °C’lik yatay çalkalamalı su banyosunda 2 saat EO’dan 2-CE’ye türevlendirilmiştir. Süre sonunda 10 dk buzlu suda soğutulmuş ve 10 mL ACN ilave edilerek 1 dk 1500 rpm’de karıştırılmıştır. Kullanıma hazır Quecher’s tuzları ilave edilmiş ve 3 dk karıştırılmıştır. 4000 x g devirde, 10 °C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. 6 mL süpernatant, içerisinde MgSO₄, PSA and C₁₈ bulunan 15 mL’lik falcon tüpe aktarılmıştır. 1 dk çalkalama ve 4000 x g devirde, 10 °C’de, 5 dk santrifüjleme sonrasında 2,5 mL süpernatant yeni bir 15 mL tüpe alınmış ve oda sıcaklığında azot gazı ile 0,5 mL’ye konsantre edilmiştir. Konsantre işlemi sonrasında 17000 x g devirde, 4°C, 10 dk santrifüj edilmiş ve sıvı kısım GC/MSMS vialine alınmıştır. Bu çalışma sonucunda %95 geri kazanım ve % 28 RSD oranı bulunmuştur.

Tateo ve Bononi (2004) tarafından çeşitli biberlerde yapılan bir çalışmada, 2 g numune tartılarak 2 mL 0,02 N H₂SO₄ ve 200 mL doymuş NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Numune, 30 dakika boyunca ultrasonik bir banyoda karıştırılarak 60°C’de 2 saat boyunca 80 mL etil asetat ile iki kez ekstrakte edilmiştir. Etil asetat fazı her seferinde susuz sodyum sülfat

(3 g) üzerinden filtrelenmiş, katı kalıntı üç kez 10 mL etil asetat ile yıkanmış ve elde edilen sıvı fazın tümü kapalı bir şişede toplanmıştır. Ekstrakt, döner bir buharlaştırıcının vakumunda yaklaşık 1 mL'ye kadar konsantre edilmiş ve daha sonra hacim etil asetat ile seyreltilerek vialer alınmış ve GC/MS cihazıyla analiz edilmiştir. Bu çalışmada EO için 91 µg/L konsantrasyonda %84 geri kazanım oranı elde edilmiştir.

Literatür ve mevzuat kapsamındaki bilgiler göz önüne alındığında, etilen oksitin yüksek uçuculuğu, çok reaktif bir madde olması ve gıda ürünlerindeki klor kaynağının yaygın bir şekilde bulunabilmesinden dolayı uygulanacak olan metot şartlarının hem EO hem de 2-CE maddesinin var olabilirliği dikkate alınarak seçilmiştir. Etilen oksitin uçuculuğu ve birçok ürünle hızlıca reaksiyona girmesi dikkate alındığında, serbest halde EO bulunmasının düşük bir ihtimal olabileceği; var olsa bile diğer bileşenlere bağlı olarak kalabileceği değerlendirilmiştir (Anonim 2020). Ayrıca analiz prosedürünün türevlendirme yapılmadan gerçekleştirilmesi durumunda etilen oksitin yüksek uçucu özelliğinin olması nedeniyle geri kazanım oranının düşürebileceği öngörülmüştür. Buradaki matriks bileşenlerine bağlı olan etilen oksitin asidik ortam ve klor iyonu kaynağı sayesinde daha kararlı madde olan 2-CE dönüşmesi amaçlanmıştır. Ürünün içeriğinde 2-CE maddesinin bulunması durumunda, analiz prosedürü süresince herhangi bir etkileşime girmeden ekstrakte edilebileceği düşünülmüştür. Hal böyle iken, ürünlerdeki EO ve 2-CE bulunabilirliği öngörülmüş ve yapılan çalışmalarda içeriğinde EO ve 2-CE tespit edilmemiş keçiboynuzu numunesine eşit konsantrasyonlarda EO ve 2-CE içeren standart karışımı hazırlanarak kirlenme yapılmıştır.

Hedef analitlerin tespit edilmesini sağlamak amacıyla GC/MSMS cihazında MRM metot şartları oluşturulmuş ve analitlere ait anne iyon, yavru iyon ve CE bilgileri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. MRM verileri uygulanarak seçicilik/spesifiklik çalışmalarıyla kromatogramlar incelendiğinde hedef analite girişim yapabilecek herhangi bir pikin bulunmadığı görülmüştür. Bu kapsamda elde edilen GC/MSMS kromatogramlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada Lineerlik (doğrusallık) kontrolünü sağlamak amacıyla içeriğinde EO ve 2-CE tespit edilmemiş keçiboynuzu numunesine Çizelge 3.3'te belirtilen miktarlarda kirlenme yapılarak blank-20-50-100-250 µg/kg konsantrasyonlarında 5 noktalı kalibrasyon verileri elde edilmiştir. Kalibrasyona çalışmasında elde edilen veriler Şekil

4.3, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Yapılan kalibrasyonun lineer özellik gösterdiğinden, residüel standart sapma değerinin $\leq \pm \%20$ olduğundan ve korelasyon katsayısının 0,99’dan yüksek olduğundan uygun olarak değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında içeriğinde EO ve 2-CE içermeyen numuneye Çizelge 3.3’te belirtilen miktarlarda kirletme yapılarak veriler elde edilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışması iki farklı analist tarafından düşük (100 µg/kg) ve yüksek (200 µg/kg) konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler Çizelge 4.2-4.7’de gösterilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasındaki tüm analiz sonuçlarının Grubb’s testine göre uygun olup sapan değer bulunmadığı görülmüştür. Tekrarlanabilirlik çalışmasındaki her bir veri setinde relatif standart sapma (%RSD) değerleri hesaplanmış ve Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma (PRSD) değerleri ile karşılaştırıldığında düşük olduğu görülmüş ve uygun olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen veriler konsantrasyonlarına göre F ve t testlerine tabi tutulmuş; F değerinin F Kritik iki-uçlu değerinden ve t Stat değerinin t Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmadığından yapılan çalışma uygun olarak değerlendirilmiştir.

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik çalışmasında numune Çizelge 3.3’te belirtilen konsantrasyonlara göre EO ve 2-CE standart stok karışımıyla kirletme yapılarak Çizelge 4.8-4.13’te belirtilen veriler elde edilmiştir. Bu aşamada farklı zamanlarda iki farklı analist tarafından düşük (100 µg/kg) ve yüksek (200 µg/kg) konsantrasyonlarda çalışılmış ve elde edilen tüm analiz sonuçlarının Grubb’s testine göre uygun olup sapan değer bulunmadığı görülmüştür. Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik çalışmasında elde edilen veriler konsantrasyonlarına göre F ve t testlerine tabi tutulmuş; F değerinin F Kritik iki-uçlu değerinden ve t Stat değerinin t Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmadığından yapılan çalışma uygun olarak değerlendirilmiştir.

Geri kazanım çalışmasında elde edilen veriler 4.6 Geri kazanım (Doğruluk) bölümünde gösterilmiştir. Burada düşük konsantrasyonda %98,76 ilâ %109,83 arasında geri kazanım değerleri elde edilmiş ve Çizelge 4.14’te gösterilmiştir. Geri kazanım yüksek

konsantrasyonda ise %100,38 ilâ %108,36 arasında değerler elde edilmiş ve Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Düşük ve yüksek konsantrasyon çalışmalarından ortalama geri kazanım değeri %103,68 olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Bu çalışmanın kontrolünde düşük ve yüksek konsantrasyon için %70-%120 ortalama geri kazanım oranı aralıkları belirlenmiş ve tüm analiz sonuçlarının geri kazanım oranları bu geri kazanım oranı kriterlerine göre uygun olarak değerlendirilmiştir (Anonim 2021).

Keçiboynuzu matriksine EO kalıntısının tespit edilebilmesi için uygulanan metot şartlarının, analiz prosedürünün uygulama esnasında meydana gelebilecek küçük değişikliklerden etkilenip etkilenmediği kontrol edilmesi amacıyla sağlamlık çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada Youden deney deseni (7 faktörlü) uygulanarak Çizelge 4.17'de belirtilen parametrelere göre değişimler incelenmiş ve Çizelge 4.18'de belirtilen sonuçlar elde edilmiştir. Burada hesaplanan sapmalar, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapmasından ($SD_{\text{Birleşik}} = 4,903$) küçük olduğu görülmüş ve uygulanan metotta belirlenen parametreler açısından sağlam olarak değerlendirilmiştir (Anonim 2018a).

Ölçüm belirsizliğine ait bileşenler Şekil 4.5'te belirtilmiştir. Burada tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım verilerinden elde edilen RSD değerleriyle birleşik belirsizlik değeri ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri hesaplanmıştır. Çizelge 4.20'de belirtildiği gibi genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri %10,62 olarak hesaplanmıştır.

5.2 Sonuç

Yapılan bu çalışmada keçiboynuzunda GC/MSMS ile etilen oksit analizi metodu geliştirilmesi ve etilen oksit kalıntısının tespitinde kullanılan analiz metodunun valide edilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda uygulanan doğrusallık, seçicilik / spesifiklik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ve sağlamlık parametrelerine uygun şekilde valide edilmiştir. Geri kazanım oranı %103,68 ve hesaplanan ölçüm belirsizliği % 10,62 olarak hesaplanmıştır. Ancak etilenin bitkisel ürünlerde bir hormon olarak bulunabilirliği, oksitlenmesi sonucu EO oluşumu ve klor iyonu varlığında 2-CE'ye dönüşebildiği göz önüne alındığında % 50 ölçüm belirsizliğinin kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir (Çetinkaya ve Diler 2017). EO gıda ürünlerinde klor iyonu varlığında 2-CE ye dönüşmesi, birçok bileşenle reaksiyona girerek

bağlanması ve düşük sıcaklıklarda uçuculuğunun göz önüne alınmasıyla analiz için uygulanan kalibrasyonun EO ve 2-CE maddelerinin mix şeklinde spike yapılarak matrix-matched olarak yapılmasının hem EO tespiti hem de 2-CE tespiti için daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır. Matriksin keçi boynuzu seçilmesine rağmen bitkisel ürünlerin genel özellikleri dikkate alındığında bitkisel kaynaklı diğer matrikslere de uygun olabileceği değerlendirilmektedir. Bununla birlikte hayvansal ürünlerde ürün içeriği nedeniyle bu metot şartlarında matriks etkisi gösterebileceğinden, bu metodun geliştirilerek bu ürünlere de uygulanabilir hale getirilmesi sağlanabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abbas S N, Halkman K, 2003, Baharat Mikroflorası Üzerine Işınlamanın Etkisi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(3), 43-65.
- Akça D N, 2022, Etilen Oksit Sterilizasyonu ve Optimum Sterilizasyon Parametreleri, İzmir Bakırçay Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49s, İzmir.
- Algül B E, Tekintaş F E, Dalkılıç G G, 2016, Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kullanımı ve İçsel Hormonların Biyosentezini Arttırıcı Uygulamalar, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 13(2), 87-95.
- Allemang A, Lester C, Roth T, Pfuhler S, Peuschel H, Kosemund K vd, 2022, Assessing The Genotoxicity and Carcinogenicity of 2-Chloroethanol Through Structure Activity Relationships and In Vitro Testing Approaches, Food and Chemical Toxicology, 168, 113290, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113290>.
- Anonim, 2012, EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty In Analytical Measurement, Third Edition, 1-133.
- Anonim, 2014, EURACHEM Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, Second Edition, 1-62.
- Anonim, 2018a, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Anonim, 2018b, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberi, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Anonim, 2020, EURL-SRM-Analytical Observation Report, Analysis of Ethylene Oxide and its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC–MS/MS.
- Anonim, 2021, Gıda ve Yemde Pestisit Kalıntıları Analizi için Analitik Kalite Kontrol ve Metot Validasyonu Prosedürleri (Sante 11312/2021).
- Anonim, 2022, Ethylene Oxide and 2-Chloroethanol Analysis in Foods Using Triple Quadrupole GC/MS/MS, Agilent Technologies, Consumables Workflow Ordering Guide.

- Aydemir M ve Atasever M, 2007, Işınlamanın Gıda Teknolojisinde Kullanımı, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2(3), 107-116.
- Bessaire T, Stroheker T, Eriksen B, Mujahid C, Hammel Y A, Varela J, vd., 2021, Analysis of Ethylene Oxide In Ice Creams Manufactured with Contaminated Carob Bean Gum (E410), Food Additives & Contaminants: Part A, 38(12), 2116-2127, <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1970242>.
- Bilir N, 2002, Çalışma Hayatı ve Üreme Sağlığı, Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, 11(3), 86.
- Bruyn G W, 1987, Environmental Health Criteria 55: Ethylene oxide, World Health Organization, Geneva, 1985, Vammalan Kirjapaino Ot, Vammala, Finland.
- Chen Y T, Liao J W, Hung D Z, 2010, Protective Effects of Fomepizole on 2-Chloroethanol Toxicity, Human & Experimental Toxicology, 29(6), 507-512.
- Coretti K, 1978, Sterilization of Spices. Fleischwirtschaft, 58(8), 1239-1241.
- Çapraz Ö C, 2024, Asetmetasin (Acemetacin) Etken Maddenin Hplc'de Metot Validasyonu ve Optimizasyonu, Kırklareli Üniveritesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 48s, Kırklareli.
- Çetinkaya Açar Ö, Diler F, 2017, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Pestisit Analizleri için Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi, Ankara: TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
- Dikmetaş C, Doğan S, Kalafat U M, Tapkan R B, Dorter M, Bildik B, vd., 2020, Ethylene Oxide Intoxication: a Case Report, Eurasian Journal of Toxicology, 2(1), 29-30.
- Dolmaseven S, 2023, Au, Ag, Cu Metalleri Yüklenmiş Bor-Nitrür Nanotüp Yapılarının Etilen Oksit Adsorpsiyonu ve Gaz Sensörü için Kullanılabilirliğinin Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (Dft) ile İncelenmesi, Bursa Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 92s, Bursa.
- Dudkiewicz A, Dutta P, Kołozyn-Krajewska D, 2022, Ethylene Oxide In Foods: Current Approach to The Risk Assessment and Practical Considerations Based on The European Food Business Operator Perspective, European Food Research and Technology, 248(7), 1951-1958.
- Erbil H, 2007, Etilen Oksit ve Gaz Plazma Sterilizasyon Yöntemleri, 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 4-8 Nisan 2007, Antalya, 126-127.

- Erkaymaz T, 2017, Domateslerde Pestisit Tayini için GC-MS/MS ile Çoklu Kalıntı Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 70s, Antalya.
- Gübbük H, Tozlu İ, Doğan A, Balkiç R, 2016, Çevre, Endüstriyel Kullanım ve İnsan Sağlığı Yönleriyle Keçiboynuzu, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(2), 207-215.
- Jagadeeswaran I, Chandran S, 2022, ISO 11135: Sterilization of Health-Care Products-Ethylene Oxide, Requirements for Development, Validation and Routine Control of a Sterilization Process for Medical Devices (145-153), Shanmugam P S T, Thangaraju P, Palani N, Sampath T (Ed.), Medical Device Guidelines and Regulations Handbook, Springer, 385p, Switzerland, https://doi.org/10.1007/978-3-030-91855-2_9.
- Jamil M, Mustafa I S, Ahmed N M, Hamid S B S, 2022, Cytotoxicity Evaluation of Poly (Ethylene) Oxide Nanofibre in MCF-7 Breast Cancer Cell Line, Biomaterials Advances, 143, 213178.
- Kumlay A M, Eryiğit T, 2011, Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları, Journal of the Institute of Science and Technology, 1(2), 47-56.
- Lynch H N, Kozal J S, Russell A J, Thompson W J, Divis H R, Freid R D, vd., 2022, Systematic Review of The Scientific Evidence on Ethylene Oxide as a Human Carcinogen, Chemico-Biological Interactions, 364, 110031.
- Rebsdatt S, Mayer D, 2000, Ethylene Oxide, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, https://doi.org/10.1002/14356007.a10_117.
- Tateo F, Bononi M, 2006, Determination of Ethylene Chlorohydrin as Marker of Spices Fumigation with Ethylene Oxide, Journal of Food Composition and Analysis, 19(1), 83-87.
- Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği, 2021, T.C. Resmi Gazete, 27.09.2021, 31611.
- Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddelerinin Spesifikasyonları Hakkında Yönetmelik, 2017, T.C. Resmi Gazete, 03.04.2017, 30027.

- Sarıduman Y, 2023, Keçiboynuzu Pekmezi Üretiminde Ekstraksiyon ve Evaporasyon Aşamalarında Ohmik Isıtma Desteğinin Uygulanabilirliğinin İncelenmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 134s, İzmir.
- Şener Ö, 2022, Keçiboynuzu Unu ve Keçiboynuzu Çekirdeğinin Hamur Reolojik Özellikleri ve Ekmek Kalitesi Üzerine Etkisi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 142s, İzmir.
- Wenio I, Bartosiewicz I, Derewiaka D, Dewiszek K, Karniłowicz K A, 2023, Fast Method for Determination of Ethylene Oxide Using Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry GC-MS/MS, Applied Sciences, 13, 7480, <https://doi.org/10.3390/app13137480>.
- Zenciroğlu D, 2005, Etilen Oksit ile Sterilizasyon; Nasıl Çalışır? Kullanılan Cihazların Özellikleri Nelerdir? Nasıl Denetlenir? Olumlu ve Olumsuz Yönleri Nelerdir? Formaldehid ve Etilen Oksit Sterilizasyon Yöntemini Karşılaştırma, Önlemler ve Gaza Maruz Kalan Personele Uygulanacak İşlemler Nelerdir?, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 20-24 Nisan 2005, Samsun, 99-120.

İnternet Kaynakları

- 1- <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances/ethylene-oxide>, 05.5.2024
- 2- <https://www.fao.org/4/x5042e/x5042E0d.htm#Ethylene%20oxide>, 05.5.2024
- 3- <https://turkomp.tarimorman.gov.tr/food-376>, 08.06.2024
- 4- https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/2-Bromoethanol,MDA_CHEM-820175, 08.06.2024