



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PRETROID TOKSİKASYONUNA SEBEP OLAN
FLUMETRİNİN ANALİZİ İÇİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Nuray KOÇAK

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ**

**ANKARA
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRETROID TOKSİKASYONUNA SEBEP OLAN
FLUMETRİNİN ANALİZİ İÇİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Nuray KOÇAK

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün TYL-2023-3097 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Pretroid Toksikasyonuna Sebep Olan Flumetrinin Analizi İçin Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel, ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Ana Bilim Dalında
Nuray KOÇAK tarafından hazırlanan
“Pretroid Toksikasyonuna Sebep Olan Flumetrimin Analizi İçin Kromatografik
Yöntem Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK
LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/05/2024

Prof. Dr. H Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Ü. Adli Bilimler Enstitüsü
Üye

Doç. Dr. Nilgün ŞEN
Polis Akademisi Adli Bilimler Enstitüsü
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



ÖZET

Pretroid Toksikasyonuna Sebep Olan Flumetrinin Analizi İçin Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi

Bal arısı tarafından tozlaşma, insan beslenmesinde ve ekosistemde biyolojik çeşitliliğin korunmasında önemli bir rol oynar. Arı zararlılarından yaygın olarak gözlenen *Varroa destructor* dünyada çok ciddi arı kayıplarına sebep olabilmekte ve bu arı akarı ile olan mücadelede pretroid grubundan flumetrin ülkemizde ve dünyada olması gerekenden fazla ve uygunsuz bir şekilde kullanılmaktadır. Flumetrinin bilinçsiz kullanımı neticesinde bal arılarında toksisite kaynaklı zararlara yol açarken, lipofilik özelliğinden kaynaklı olarak arı ürünlerinde fazla miktarda birikebilmektedir. Literatürde flumetrinin bal ve bal ürünlerinden analizi için tayin yöntemleri mevcuttur ancak oldukça kısıtlıdır.

Bu çalışma kapsamında flumetrin için geleneksel yöntemlere alternatif olarak hassas, hızlı ve düşük tayin limitlerine ulaşılabilen analitik yöntem hedeflenmiştir. Geliştirilen LLE yöntemi, ICH Kılavuzlarına göre tamamen valide edilmiş ve flumetrin için yöntemin LOQ değerleri 0,05 µg/mL, LOD değerleri 0,02 µg/mL bulunmuştur. Geliştirilen LLE yöntemi ile Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen 10 adet bal numunesinde flumetrin kalıntısı tayin edilmiştir. Analiz için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş, ekstraksiyon verimi %82,76 olarak tayin edilmiş olup bu yöntemle ekstraksiyon işlemi 10 dakika sürmüştür. Bu çalışma, balda flumetrin kalıntılarının tespiti için etkili ve hızlı bir metodoloji sunmaktadır. Analiz sonuçları, farklı bölgelerden alınan bal numunelerinin flumetrin kalıntısı içerip içermediğini belirlemek amacıyla değerlendirilmiş, ayrıca yöntemin plazmada uygulanabilirliği de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırıldığında düşük tayin limitlerine ulaşması ve hızlı bir analiz imkanı sağlaması açısından HPLC kullanılarak yapılan çalışmalara göre geliştirilen yöntemin üstünlüğü belirlenmiştir.

Anahtar Sö züklerAkarisitler, Flumetrin, Gıda Güvenliği, Kromatografi, Toksikoloji

SUMMARY

Developing a Chromatographic Method for the Analysis Flumethrin Causing Prethyroid Toxicity

The honey bee plays a crucial role in pollination, preserving biological diversity in ecosystems, and supporting human nutrition. The widespread bee pest *Varroa destructor* can cause serious bee losses globally, leading to the excessive and inappropriate use of the pyrethroid group insecticide flumethrin in our country and worldwide to combat this bee mite. The indiscriminate use of flumethrin results in toxicity-related damage to honey bees and can accumulate in bee products due to its lipophilic properties. In the literature, there are methods available for the analysis of flumethrin in honey and honey products, but they are quite limited.

In this study, an analytical method that is sensitive, rapid, and achieves low detection limits has been targeted as an alternative to traditional methods for flumethrin. The developed liquid-liquid extraction (LLE) method has been fully validated according to ICH guidelines, with the method's limits of quantification (LOQ) for flumethrin being 0,05 µg/mL and limits of detection (LOD) being 0,02 µg/mL. The developed LLE method has been used to determine the residue of flumethrin in 10 honey samples obtained from different regions of Turkey. A liquid-liquid extraction method for analysis has been developed, with an extraction efficiency of 82,76% and an extraction process duration of 10 minutes. This study provides an effective and rapid methodology for detecting flumethrin residues in honey. The analysis results have been evaluated to determine whether honey samples from different regions contain flumethrin residues, and the applicability of the method in plasma has also been investigated. When compared with literature data, the superiority of the developed method over studies conducted using HPLC has been determined in terms of reaching low detection limits and providing a rapid analysis capability.

Keywords: Acaricides, Chromatography, Flumethrin, Food Safety, Toxicology

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	v
Summary	vi
İçindekiler	vii
Önsöz	ix
Simge ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitler	3
1.1.1. Pestisit Kullanımının Tarihçesi	4
1.1.2. Türkiye’de Pestisitlerin Kullanımı	4
1.1.3. Pestisitlerin Kullanılmasının İnsan Sağlığı Üzerine Yarattığı Etkiler	5
1.2. Piretroidler	6
1.2.1. Piretroidlerin Kimyasal Yapıları	7
1.3. Flumetrin	9
1.3.1. Flumetrinin Temel Etki Mekanizması	10
1.3.2. Flumetrinin Toksisitesi	11
1.3.3. Flumetrin ile Yapılmış Bazı Literatür Çalışmaları	12
1.4. Analitik Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri	14
2. GEREÇ ve YÖNTEM	16
2.1. Flumetrinin Analitik Tayin Yöntemleri	16
2.1.1. Sıvı Kromatografisi	16
2.1.2. Gaz Kromatografisi	17
2.1.3. Diğer Analitik Yöntemler	17
2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	18
2.3. Kullanılan Cihazlar	18
2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler	19
2.5. Kullanılan Analitik Kolonlar	19
2.6. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	20
2.7. Flumetrin için Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	20
2.8. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları	20
2.8.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması	20
2.8.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu	21
2.8.3. HPLC Kolon Denemeleri	21
2.8.4. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu	21
2.8.5. HPLC Hareketli Faz Akış Hızı Optimizasyonu	22
2.8.6. UV Dalga Boyu Optimizasyonu	22
2.9. HPLC Analizi için Yöntem Validasyon Çalışmaları	23
2.9.1. Seçicilik	23
2.9.2. Doğruluk	23
2.9.3. Kesinlik	23
2.9.4. Doğrusallık	24
2.9.5. Çalışma Aralığı	24
2.9.6. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	24

2.9.7. Sağlamlık	25
2.10. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntemi	25
2.11. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu	25
2.11.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi	25
2.11.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu	26
2.11.3. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu	26
2.11.4. İyonik Şiddet Optimizasyonu	26
2.11.5. Ekstraksiyon Süresi Optimizasyonu	26
2.12. Matris Etkisi	26
2.13. Belirlenen En Uygun HPLC Koşulu	27
2.14. Yerel Bal Üreticilerinden Elde Edilen Bal Numunelerinin Analizi	27
3. BULGULAR	29
3.1. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları	29
3.1.1. Hareketli Faz Optimizasyonu	29
3.1.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu	29
3.1.3. Hareketli Faz Akış Hızı Optimizasyonu	30
3.1.4. HPLC Kolon Denemeleri	31
3.1.5. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu	31
3.1.6. UV Dalga Boyu Optimizasyonu	31
3.2. HPLC için Analitik Yöntem Validasyon Çalışmaları	32
3.2.1. Seçicilik	32
3.2.2. Doğruluk	34
3.2.3. Kesinlik	34
3.2.4. Doğrusallık	34
3.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	35
3.3. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu	35
3.3.1. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu	37
3.3.2. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu	37
3.3.3. İyonik Şiddet Optimizasyonu	38
3.3.4. Ekstraksiyon Süresi	39
3.3.5. Matris Etkisi	39
3.4. Yerel Bal Üreticilerinden Elde Edilen Bal Numunelerinin Analizi Sonucu	40
4. TARTIŞMA	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	51

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında flumetrin analizi için seçici, hassas, doğru ve kesin bir kromatografik analiz yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Kullanılacak sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin literatüre oranla daha düşük maliyetli ve daha hassas tayin limitlerine ulaşabilmesi için yeni nesil sıvı kromatografisi sabit fazlarından faydalanılmış, daha düşük tayin limitlerine inmek için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha az çözücü harcanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında geliştirilmiş olan kromatografik tekniklerin validasyon çalışmaları yapılarak uluslararası geçerlilikleri de gösterilmiş, bu bağlamda HPLC çalışmaları için yeni nesil kolonlar kullanılmıştır. Bu kolonlarda farklı sıcaklık ve pH gibi parametre denemeleri yapılarak analize olan etkisi incelenmiş ve analitik yöntem validasyon çalışmaları tamamlanarak bal örneklerinden uygulamaları gösterilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca öğrencisi olduğum için şanslı hissettiğim, yenilikçi fikirleriyle her zaman bakış açımı değiştiren, her soruna çözümle yaklaşan, değerli tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a,

Her soruyu rahatlıkla sorabildiğim ve laboratuvar çalışmalarında desteğiyle her zaman yanımda olan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşım Ceren Hacer BOZMAOĞLU'na ,

Her konuda desteği ve bana olan inancı ile daima güç ve cesaret veren sevgili eşim Adem KOÇAK'a ve varlığı en büyük şansım, yaşam kaynağım olan biricik kızım Ahsen Gökçe KOÇAK'a

Her zaman olduğu gibi eğitim hayatım boyunca da desteklerini daima hissettiğim sevgili ailem ve birlikte büyürken çok eğlendiğim sevgili yeğenlerim Elif Nur ve Öznur KONUKÇU'ya,

Yüksek lisans tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne tüm destekleri için teşekkür ederim.

Son olarak bu tez çalışmamı, her zaman en büyük destekçim olan ve her sözüyle hayatıma ışık tutan, kızı olmaktan gurur duyduğum sevgili babama adıyorum.

SİMGE ve KISALTMALAR

α	Seçicilik
ACN	Asetonitril
%BSS	Yüzde Bağıl Standart Sapma
°C	Derece Santigrat
CE	Kapiller Elektroferez
CEC	Kapiller Elektrokromatografi
Cl	Klor
DAD	Diyot Dedektör
dk	Dakika
EMA	Avrupa İlaç Konseyi
ESI	Elektro Sprey İyonizasyonu
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi Dairesi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi (International Council for Harmonization)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Kg	kilogram
LC	Sıvı Kromatografi
LLE	Sıvı Sıvı Ekstraksiyon
LOD	Tayin Sınırı
LogP	Ayrılım Katsayısı
LOQ	Teşhis Sınırı
m	Eğim
MeOH	Metanol
Mg	Miligram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M.Ö.	Milattan Önce
MS	Kütle Spektrometri
MTBE	Metil Tert Bütıl Eter
MW	Moleküler Kütle
n	Kesişim
Na ⁺	Sodyum

NACI	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
Nm	Nanometre
NSP	İğne ve Şırınga Programı
QC	Kalite Kontrol
PBO	Piperonil Bütoksit
pH	Hidrojen İyon Derişimi
pKa	Asit Ayrışma Sabiti
PNCRC	Brezilya Ulusal Kalıntı ve Kirletici Planı
QC	Kalite Kontrol
R2	Belirleme Katsayısı
RNA	Ribonükleik Asit
s	Saniye
SFC	Süperkritik Akış Kromatografisi
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
SS	Standart Sapma
SUT	Sistem Uygunluk Testi
T1/2	Yarılanma Ömrü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
v/v	Hacim/Hacim
YY	Yüzyıl

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Deltametrin Piretroid	8
Şekil 1.2.	Flumetrin Kimyasal Yapısı.	9
Şekil 1.3.	Flumetrine ait temel etki mekanizması	11
Şekil 2.1.	Geri kazanım hesaplama denklemi	23
Şekil 2.2.	Bağıl standart sapma hesaplama denklemi	24
Şekil 2.3.	Teorik olarak teşhis ve tayin sınırı hesaplama denklemi	25
Şekil 3.1.	Hareketli faz çiflerinin optimizasyon kromatogramları	29
Şekil 3.2.	Hareketli faz pH denemelerine ait kromatogramlar	30
Şekil 3.3.	Farklı hareketli faz bileşimleri ile yapılan analizlere ait kromatogramlar	30
Şekil 3.4.	Kolon sıcaklık denemelerine ait kromatogramlar	31
Şekil 3.5.	UV Dalga Boyu Optimizasyonu sonrası elde edilen kromatogramlar	32
Şekil 3.6.	Ticari plazma ekstraksiyonu sonrası elde edilen kromatogramlar	33
Şekil 3.7.	Bal ekstraksiyonu sonrası elde edilen kromatogramlar	33
Şekil 3.8.	Flumetrin kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.9.	Ekstraksiyon solventinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi	36
Şekil 3.10.	Farklı ekstraksiyon solventleri kullanılarak yapılan ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar	36
Şekil 3.11.	Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu	37
Şekil 3.12.	Ekstraksiyon pH'sının ekstraksiyon verimine etkisi	38
Şekil 3.13.	İyonik Şiddet Optimizasyonu	38
Şekil 3.14.	Ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi	39
Şekil 3.15.	Bal ve sudan flumetrinin (1 mg/mL) ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar	40
Şekil 3.16.	Bal örneklerinde flumetrin tayini için (mg/mL) ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar	40

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Yıllara göre Türkiye pestisit kullanım miktarları (ton) Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021	5
Çizelge 1.2. Bazı piretroidlerin kronolojik keşfi	7
Çizelge 1.3. Flumetrine ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikler	10
Çizelge 2.1. Kullanılan malzeme listesi	18
Çizelge 2.2. Kullanılan cihazların listesi	18
Çizelge 2.3. Kullanılan sarf malzemelerin listesi	19
Çizelge 2.4. Kullanılan analitik kolonların listesi	19
Çizelge 2.5. Analitik standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri	20
Çizelge 2.6. Hareketli faz pH denemeleri için kullanılan analitik parametreler	21
Çizelge 2.7. HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri	22
Çizelge 2.8. HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri	22
Çizelge 2.9. En uygun HPLC-UV analitik yöntem koşulları	27
Çizelge 3.1. Flumetrin için sistem uygunluk parametreleri (SUT) sonuçları	33
Çizelge 3.2. Flumetrin için kesinlik ve doğruluk verileri	34
Çizelge 3.3. Flumetrin kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler	35
Çizelge 3.4. Bal örneklerinde yapılan flumetrin analizinden elde edilen veriler	41

1. GİRİŞ

Bal, bitkilerin çiçekleri ya da bu bitkilere ait olan diğer canlı kısımlarından salgılanmış olan nektar ve bitki üzerinde konak bazı böcekler tarafından bitkiden faydalanarak salgılamakta olduğu maddeler, arılar tarafından toplanması, taşınması ve depo edilerek olgunlaşmasıyla üretilen yüksek besin değerine sahip ve antimikrobiyal değeri nedeniyle insanlar tarafından sıklıkla tüketilen doğal bir fonksiyonel gıdadır (Mutlu vd., 2017).

Bal yaklaşık 200 çeşit bileşenin bulunduğu, içermiş olduğu vitaminleri, mineralleri, organik asitleri, flavonoidleri, fenolik asitleri, aminoasitleri ve enzimleri bakımından değerlendirildiğinde sindirim bakımından kolay, besin değeri yüksek ve bir çok hastalıktan koruyan aynı zamanda onarıcı etkisi bulunan fonksiyonel bir gıdadır (Özmen vd., 2006; Spilioti vd., 2014).

Balın kimyasal bileşimine bakıldığında coğrafi konumu ve bitki örtüsüne bağlı olarak değişim göstermekle birlikte karbohidrat oranı %82, su miktarı %17, mineral değeri %0.7, protein oranı %0.3, (yaklaşık değerlerdir) ayrıca içerdiği vitamini, organik asiti, fenolik bileşikler ve serbest amino asiti içeren bileşenleri içerdiği bilinmektedir (Karabagias vd., 2014; Özmen vd., 2006; Islam vd., 2012; Moniruzzaman vd.,2014).

Bal ve çiçek tozu üretimi sağlamak veya bitkilerde tozlaşmayı gerçekleştirmek amacıyla arı kovanlarında yapılan yer değiştirmeye "gezginci arıcılık" denir. Türkiye'de yeni tip kovanların kullanılmasıyla birlikte başlayan seyyar arıcılık ile bal üretiminin %80'den fazlası sağlamakta ve ülkemizde bu yöntemle bal üretimi fazla olmakla birlikte gezdirilen kovan sayısı toplam kovan sayısına oranı %30'dur. Bu sebeple zirai mücadelelerde özellikle gezginci arıcılık yapan arıcılara haber verilmesi oldukça önemlidir. Çünkü yapılan bu zirai mücadele arıların ölümlerine yol açmasa da, maruziyetin artması neticesinde insektisit kalıntılarının kovana taşınmasıyla balda oluşan kalıntı ürünlerde pazarlama sorunu oluşmaktadır (Tutkun, 2016).

Dünya nüfusunda özellikle 20.yy. dan itibaren meydana gelen hızlı artış besin madde ihtiyacının da artmasına sebep olmuş, bu sebeple tarımsal üretimde verimliliğin artırılması amacıyla öncelikli olarak kullanılan tarımsal arazilerin fazlalaştırılması yoluna gidilmiştir. Ancak coğrafi yer şekillerinin tarım için elverişli olmaması mevcut tarım alanların yetersiz

kalması sebebiyle birim alandan elde edilecek ürünü artırabilmek için yoğun tarım uygulamalarına geçilmiştir. Bu uygulanmanın başlanmasıyla birlikte değişen üretim modeli sonucu tarımda kimyasal kullanımı artmıştır. Bu yeni üretim modeli ne yazık ki ekolojik dengenin bozulmasına ve birçok yabancı böcek türlerinin yok olmasına sebep olmuş, yabancı olarak adlandırılan bu böcek türlerinin da azalmasıyla birlikte bal arıları ekositem için daha da önemli olmaya başlamıştır (Akyol, 2005).

Tıbbi ve besinsel amaçlarla insanlığa oldukça fayda sağlayan gezginci bir arı türü olan *Apis mellifera* L., tarımda sadece bal üretimin de değil, aynı zamanda mahsulün tozlaşmasında da hayati bir rol taşımaktadır. Arıların toplamış olduğu nektarları metabolize ederek bala dönüştürmesi biyokimyasal bir prosestir. Bu proses arılar için doğal ortamı olan kovanda gerçekleştiği bilinmektedir. Kovanda bulunan arı sayısı oldukça fazla olup yaklaşık 10 bin ile 40 bin arı arasında değişiklik göstermektedir. Her bir arı nektar ve polen toplamak için günde 10 ila 15 defa kovandan çıktığı, her çıkışında yaklaşık 80-100 çiçekten nektarı ve polenleri topladığı değerlendirilmektedir (Nisbet vd., 2013). Bu sebeple birçok böcek zararlısı ve bakteriler bal arılarına saldırabilmekte ve önemli verim kayıplarına neden olabilmektedir. Bir arı akarı (zararlısı) olan *Varroa Destructor*, da bal arısı *Apis mellifera* L., saldırarak arıların larvaları, pupaları ve ergin olanları üzerinde yaşayamaya başlaması ve burada hızla çoğalmaya başlaması sonucunda arıların kitle halinde ölümüne sebebiyet verebilecek tehlike bir dış parazit olarak arıcılıkta oldukça büyük sorun teşkil etmeye başlamıştır.

Varroa Destructor'ın ülkemize girmesi ve kovanlara bulaşması ise; asıl konağı Hindistan ve Uzakdoğu ülkelerinde bulunan bir arı cinsi olan *Apis cerana* ile bu arı zararlısı uzun yıllar yaşaması neticesinde parazite karşı bir savunma mekanizması geliştirmiş ve *Varroa*'ya karşı direnç kazanmıştır (Uygur, 2008). Gezginci bir arı türü olan *Apis mellifera*'nın Uzakdoğu ve Rusya sınırında *Apis cerana* ile bir arada bulunması nedeniyle parazit *Apis mellifera*'ya geçmiş, ancak *varroa destructor*'a karşı aynı direnci gösterememiştir. Daha sonra bu parazit arı ticareti neticesinde Rusya ve Ukrayna batısındaki ve güneyindeki ülkelere bulaşmış, Ülkemize ise 1977 yılında girmiştir.

Gerçekleşen bulaş neticesinde ise arı zararlıları ile mücadelede insektisit amaçla sentetik akarisitler kullanılmaya başlanılmıştır. Bu sentetik akarasitlerin yanlış kullanımı arılarda arı toksisitesi gibi ciddi sorunları da beraberinde getirmiş, ve arı ürünlerinde kalıntı bırakabildiği gözlemlenmiştir (Daş, 2004).

Arı zararlıları ile yapılabilecek mücadele tekniğinin aynı zamanda çevreye dost bir yöntem olması gerekmektedir. Ancak, dünya nüfusundaki artış ve altyapı yetersizliği gibi sebeplerden dolayı bu zararlılar ile yapılacak olan mücadeleye duyulan ihtiyaç gün geçtikçe önemini daha da artırmaktadır.

Günümüzde zararlılar mücadelede kullanılan en etkin yöntem insektisit gruplarından piretroidler kullanılması suretiyle gerçekleşmektedir. Diğer insektisit gruplarına göre hızlı etki göstermesi maliyetinin kısmen daha düşük olması, memeli toksisitesi ve birçok benzer nitelikteki avantajlarından dolayı tüm dünyada en fazla tercih edilen insektisit olmuştur (Güntay, 2021).

1.1. Pestisitler

Birleşmiş Milletlerde Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılan tanıma göre pestisitler; “insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması ve/veya pazarlanması sırasında bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddelerdir. Bu tanım, ayrıca bitki büyümesini düzenleyici, yaprak dökücü, kurutucu veya meyve seyreltici veya ham meyvelerin dökülmesini önleyici etkenleri ve depolanma ve taşınma sırasında ticari malların bozulmasını önlemek amacıyla hasat öncesi ve sonrası ürüne uygulanan maddeleri de kapsamaktadır.” (FAO, 2002).

Tarımsal üretimde verimliliğin artırılması için pestisitlerin kullanımı vazgeçilmezdir. Çiftçiler tarafından yabancı otları ve böcekleri kontrol etmek için kullanılması ve tarım ürünlerinde dikkate değer artışların sağlanması, 20. yüzyılda dünya nüfusunun artması, gıda üretiminde paralel bir artış olmadan mümkün olamamaktadır. Günümüzde tarım ürünlerinin yaklaşık üçte biri pestisit uygulamasına bağlı olarak üretilmekte, Pestisit kullanılmadığı takdirde meyve üretiminde %78, sebze üretiminde %54 ve tahıl üretiminde %32 kayıp yaşanmaktadır. Bu nedenle pestisitler dünya çapında hastalıkların azaltılmasında ve mahsul veriminin artırılmasında kritik bir rol oynamaktadır.

Pestisitlerin tarihsel perspektifi, türleri ve spesifik kullanımları ve pestisit davranışı, kirliliği ve doğal çevre üzerindeki olumsuz etkilerine bakıldığında, tarımsal kalkınmada dünyanın birçok yerinde kullanılmaktadır (Tudi vd., 2021).

Pestisitler, kimyasal maddeler kullanılarak zararlıları öldürmek ve yabancı otları kontrol altına almak için kullanılır; dolayısıyla kuşlar, balıklar, faydalı böcekler ve hedef olmayan bitkilerin yanı sıra hava, su, toprak ve mahsuller de dahil olmak üzere diğer organizmalar için de toksik olabilmektedirler. Bunun neticesinde meydana gelen pestisit kirliliği hedef bitkilerden uzaklaşarak çevre kirliliğine neden olabilmektedir. Bu tür kimyasal kalıntılar çevre ve gıda kirliliği yoluyla insan sağlığını da etkilemektedir.

Pestisitlerin hedef olarak belirlediği organizma, kimyasal ve fiziksel yapıları göz önünde bulundurulduğunda ayrımlarında net olmamakla birlikte inorganik, sentetik ve biyolojik pestisitler şeklinde sınıflandırılmaktadır (CSA, 1997).

1.1.1. Pestisit Kullanımının Tarihçesi

Tarımsal üretimde zararlılar ile mücadelede pestisitler eski çağlardan itibaren etkili yöntem olarak kullanıldığına dair kayıtların bulunduğu bilinmekte ve bilinen en eski pestisit kullanımı M.Ö. 1500'lere dayanmaktadır. Elemental kükürt tozu bilinen ilk pestisittir. (Mezopotamya'da, antik Sümerlerde kullanıldığına dair kaynaklar vardır.) Zaman içerisinde tarımsal verimin artırılması ve zararlılar ile yapılan mücadelede pestisit olarak çeşitli kimyasallara yönelim gerçekleşmiş ve bunun sonucunda 15.yy.'da arseniğin, civanın ve kurşunun, 17. yy. tütünden ekstrakte edilen nikotin sülfat, insektisit olarak, 19. yy.'da ise doğal pestisit olan krizantemden elde edilen pyrethrum (pire otu) ve tropik bitki köklerinden elde edilen rotenon kullanılmıştır (Miller, 2002).

1.1.2. Türkiye'de Pestisitlerin Kullanımı

Sürdürülebilir bir yaşam için ve özellikle sağlıklı doğal ürünleri üretebilmek bu ürünlerin ulaşılabilirliğine olan ihtiyaç yetersiz kaynak ve hızla artan dünya nüfusundan dolayı ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bu sebeple birim alandan elde edilebilecek verimin artırılması, kimyasal mücadelenin kısa zamanda tesir etmesi ve kolay bir kullanımının olması gibi çeşitli nedenlerle dünyada ve ülkemizde çokça tercih edilen bir yöntem halini

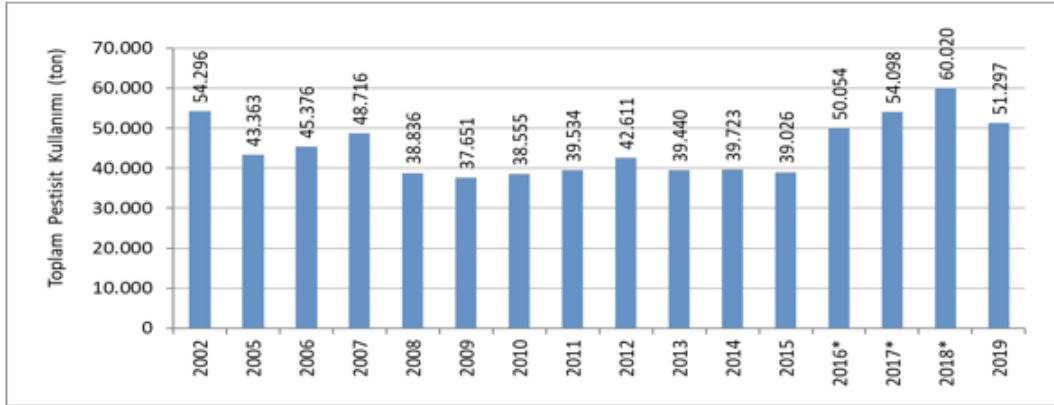
almış ve sonuç olarak pestisit kullanımında 1940 yılında başlanılmış ve 1979 yılından sonra hızlı artış gözlemlenmiştir.

Tarım zararlılarına karşı kimyasal mücadeleye alternatif olarak biyolojik ve biyoteknik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi bu doğrultuda entegre mücadele tekniklerinin kullanılması insan sağlığı ve ekolojik çevre bakışı açısından önemlidir(Özercan ve Özdem 2015).

Tarımda yapılan kimyasal mücadele; ürünleri çeşitli hastalıktan korumak ya da kurtarmak, zararlı ve yabancı otların zararından koruyabilmek, üretimde kalitenin ve en önemlisi sağlıklı üretimi artırabilmek için kullanılan bir mücadele tekniğidir (Tiryaki vd., 2010).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2021 yılına kadar hazırlanan ülkemizdeki pestisitlerin kullanım verileri incelenerek, hazırlanmış olan pestisit gruplarının kullanım miktarları yer aldığı çizelge aşağıda sunulmuştur

Çizelge 1.1. Yıllara göre Türkiye pestisit kullanım miktarları (ton) Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021



(*) 2016 yılından ve sonra hesaplama metodu için değişiklik yapılması nedeniyle bir kullanım miktarı biraz yüksek gözükülmektedir.

1.1.3. Pestisitlerin Kullanılmasının İnsan Sağlığı Üzerine Yaratdığı Etkiler

Pestisitlerin tarımsal üretimde kullanılması ve oluşan tarımsal kirlenme ele alınması gereken ciddi bir sorundur. Meydana gelen kirlilik bir kimyasalın toksisitesine maruz kalmanın uzunluğuna ve miktarına bağlı olarak ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir. Özellikle tarım işçileri ve aileleri, tarımsal pestisitlere en fazla maruz kalanlardır. Pestisit kalıntıları genetik mutasyonlara ve hücresel bozulmaya neden

olabilmektedir. Analiz ve sterilizasyona tabi tutulmayan tarım ürünlerinin tüketilmesi ve kirliliğe maruziyetin boyutu özellikle çocukları etkilediği bilinmektedir. Çünkü kimyasallar biyolojik olarak birikme büyütme özelliğine sahip olmasından dolayı zamanla vücutta biyolojik olarak konsantre olabilir. Bunun sonucunda pestisitlere maruz kalmanın etkisine bağlı olarak ciltte oluşabilecek tahrişlere, kan ve sinir sisteminde bozulmalara, endokrin bozukluklarına ve hatta ölüm ile neticelenecek durumlara sebebiyet verebilir (Lin ve ark., 2010; Al-Waili vd., 2012).

Son dönemlerde insanlarda çevreye olan duyarlılık artmış ve sağlık ve çevre bilinci ve biyolojik açıdan çeşitliliğin korunması temel amaç halini almıştır. Bu nedenle uygulanan mücadelede temiz tarıma öncelik verilmiş bu sebeple kullanılan pestisitlerin azaltılma yoluna gidilmesi ekosistem ve insan sağlığı açısından vazgeçilmez bir zorunluluk halini almıştır (Altıkat. vd., 2009).

1.2. Piretroidler

Piretrum, kurutulmuş kasımpatı çiçeklerine ait olan oleoresin özüdür. Piretrinler piretrum ekstraktındaki insektisidal olarak yer alan ve yaklaşık % 50 aktif maddeleridir. Yani piretrinler pestisidal aktiviteye sahip oldukları yüzyıllar önce saptanan kurutulmuş kasımpatı çiçeğinin (*Chrysanthemum cinerariifolium*) extrelerinden elde edilmişlerdir.

Bu bileşiklere ait temel yapısal özellikler İsviçreli kimyacı Hermann Staudinger ve Leopold Ruzicka tarafından 1910-1916 arasında bulunmuştur(Casida, 1980). İlk olarak vücuttaki bitler için Kafkasya’da bulunan kabileler kullanmaya başlamıştır (West, 1959). Kasımpatı çiçeği Ermenistan’da 1928 yılında, ticari amaçla üretilmeye başlanıldığı bilinmektedir. Bu ticari üretimlerin özellikle 1 ve 2. Dünya Savaşlarının ardından Afrika’nın doğu ve kuzeyinde merkezlendiği bilinmektedir (West, 1959; Casida, 1980). Çok yıllık otsu bir bitki olan *C. cinerariifolium*, Compositae ilk ticari piretroiddir. Piretrinler, bu piretrum bitkilerinin su, ferment, nektar (balözü), müsilaj, kauçuk, reçine, uçucu yağ, tanen gibi salgı kanallarına yerleşerek, burada foto-kompozisyon korunarak ve çiçekler ile etkileşim oluşturmakla birlikte bitki üzerinde yer alan ve onlarla beslenmekte olan böcekler için toksisite göstermektedir. Çiçekler yaklaşık 3-4 mg piretrin (bir adet çiçekte) içerdiği gözlemlenmiştir (Casida, 1980).

Doğal piretrinler, memeliler için düşük toksisiteye sahip, kalıcı olmayan böcek öldürücülerdir. 1910-16 yılları arasında yapılan çalışmalarda doğal bileşiklerden ardışık izosterik modifikasyonlarla geliştirilen sentetik analoglar ve piretroidler, elde etmiştir. Böylelikle allethrin adı verilen ilk sentetik analog elde edilmiştir. Daha sonraki süreçte yapılan çalışmalarla neticesinde birçok yeni piretroid keşfi gerçekleşmiştir (Casida, 1980). 1950 yılından günümüze kadar bazı zararlı olan türler ve bunlar ile yapılan mücadeleye piretroidler ve insektisitler katılarak önleme çalışmaları büyük ölçüde ivme kazanmıştır.

Piretroidler ile ilgili özellikle 1940-1970 yılları arasında yapılan yoğun deneme prosesleri sonucunda bazı bileşikler geliştirilmiştir. Bulunan diğer bazı piretroidlerin kronolojik keşfi ise aşağıda sunulmuştur.

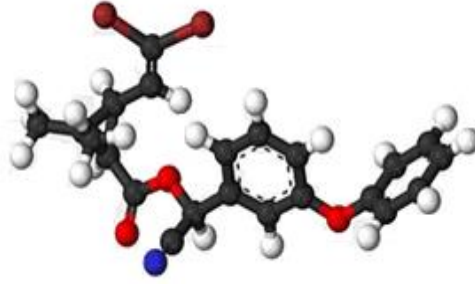
Çizelge 1.2. Bazı piretroidlerin kronolojik keşfi

Yıl	Piretroid Keşfi
1949	Allethrin
1962	Resmethrin
1967	Bioresmethrin
1973	Permethrin
1974	Deltamethrin
1976	Fenvalerate
1979	Esfenvalerate
1984	Lambda-cyhalothrin
1986	Flumetrin
1990	Silafluofen

Bu sentetik piretroidler günümüzde de çeşitli alanlarda böcek öldürü olarak kullanıldığı saptanmıştır (Soderlund ve Bloomquist, 1989). Özellikle permetrin ve deltametrinin keşfedilmesiyle birlikte tarım arazilerinde kullanılmaya başlanmış, güneş ışınlarına karşı dayanıklı yapıda olmalarından dolayı günümüzün en fazla tercih edilen ve kullanılan insektisit grubu halini almıştır(Soderlund, 2008).

1.2.1. Piretroidlerin Kimyasal Yapıları

Piretroidler, asit, bir adet merkezi ester bağı ve bir adet alkol kısmı içerdiği bilinen, asit kısmında kiral karbona sahip lipofiliktik özellikteki bileşiklerdir (Perry, 1998). Piretroidler stereoizomerik yapıda olan bileşiklerdir.



Şekil 1.1. Deltametrin Piretroid

Piretroidler stereo-spesifik özelliklerinden dolayı Na^+ kanalları ile etkileşime girerek daha uzun süre açık tutarak aksiyon potansiyelleri artırır, böylece ana klinik belirtisi titreme olan aşırı uyarılma sonucu reseptörünün klorür kanallarını bloke eder ve nöbetlere neden olarak böcek öldürücü aktivite gösterirler. Piretroidler böcek öldürücü ve memeli toksisiteyi değişiklik gösterebilirler. Cis izomerleri trans izomerlerinden genellikle daha toksik özellikte olmasının sebebi ester bağının hidroliz edilmesi yoluyla daha kolay metabolize olabilmesinden kaynaklıdır (Costa, 2015; Smith 2016).

Piretroidler, birbirinden farklı özelliklere sahip en az dört stereoizomer halinde bulunabilirler. Bunlar rasemik karışım ya da tek izomer yapıda pazarlanmaktadır. Ticari formülasyonlarda piretroidlerin aktivitesi genellikle aktif bileşenin metabolik bozulmasını önleyen piperonil butoksit gibi bir sinerjist ilavesiyle arttırılırlar. (Bradberry, 2005). Piperonil bütoksit (PBO), en fazla kullanılan sinerjistir. Yani birbirlerinden farklı oranda toksik veya hiç toksik olmayabilirler ve diğer bileşenle birlikte kullanıldığında aktivitesini değiştirdiği ve artırdığı gözlemlenmiştir (Perry, 1998).

Piretroidler hem evde hem de ticari böcek ilacı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Tropikal ülkelerde sivrisinek ağları, sıtma hastalığına karşı genellikle deltametrin solüsyonlarına batırılır. Piretroidler böcekler için memelilere göre yaklaşık 2250 kat daha toksiktir. Çünkü böceklerin sodyum kanalı hassasiyeti fazla, vücut boyutları daha küçük ve vücut sıcaklıkları da daha düşüktür. Ek olarak memeliler, zayıf dermal emilim ve toksik olmayan metabolitlere hızlı metabolizma nedeniyle korunur. Piretroidlerin tek başına toksik olma mekanizmaları karmaşıktır ve piperonil butoksit veya organofosforlu bir insektisit veya her ikisiyle birlikte formüle edildiklerinde bu bileşikler piretroid metabolizmasını inhibe ettiğinden daha karmaşık hale gelirler.

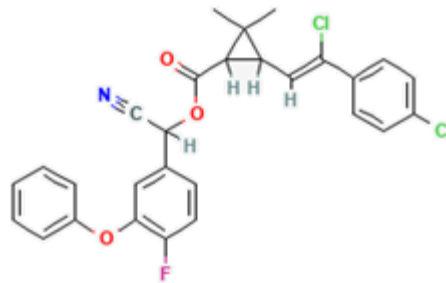
Piretroidlerin ana etkileri sodyum ve klorür kanalları üzerindedir. Piretroidler, kapanmalarını geciktirmek için voltaja duyarlı sodyum kanallarının geçit özelliklerini değiştirir. Uzun süreli bir sodyum akışı (sodyum 'kuyruk akımı' olarak anılır) ortaya çıkar; bu, eğer yeterince büyük ve/veya uzunsa, aksiyon potansiyeli eşiğini düşürür ve tekrarlayan ateşlemeye neden olur; Yüksek piretroid konsantrasyonlarında, sodyum kuyruk akımı daha fazla aksiyon potansiyeli oluşumunu ve 'iletim bloğunun' ortaya çıkmasını önleyecek kadar büyük olabilir. Duyusal nöron fonksiyonunu değiştirmek için yalnızca düşük piretroid konsantrasyonları gereklidir. Tip II piretroidler ayrıca voltaja bağlı klorür kanalları yoluyla klorür akımlarını azaltır ve bu etki tip II piretroidlerle zehirlenmenin ana nedenidir (Bradberry, 2005).

1.3. Flumetrin

Flumetrin ilk olarak piretroid grubu pestisitlerden, 1986 yılından Bayer firması tarafından bir akarisit olarak ilk kez sentezlenmiştir (De Paoli, 1992).

- Kimyasal ismi: “(RS)-a-siyano-4-fluro-fenoksibenzil--3-(b,4-diklorostyryl)-2,2-dimetilsiklopropankarboksilat”,
- Moleküler Ağırlığı: 510, 3836,
- CAS Numarası: 69770-45-2, olup sarı renkte olup akışkan olmayan vizkz lipofilik formdadır (Kaneko, 2001).

Kimyasal olarak incelendiğinde izomerlerin kompleks bir karışımı olduğu görülmektedir. Flumetrin molekülü şekil 1.2’de gösterilmiştir.



şekil 1.2. Flumetrin Kimyasal Yapısı.

şekil 1.2’de görüldüğü flumetrinin dört adet stereoizomerizm bölgesi vardır. Bunlar simetrik olmayacak şekilde yerleşmiş 3 kiral karbon ve geometrik izomerizmin bölgesi

olmak üzere 16 izomerli yapıda bulunurlar. Geometrik olarak cis/trans yapıya sahiptir. Trans Z1 ve Z2 izomerleri olarak iki farklı formülasyon ile pazarlanmaya sunulan flumetrin akut olarak Z2 izomeri daha toksiktir(Schnitzerling vd., 1989).

Flumetrine ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 1.3'te sunulmuştur.

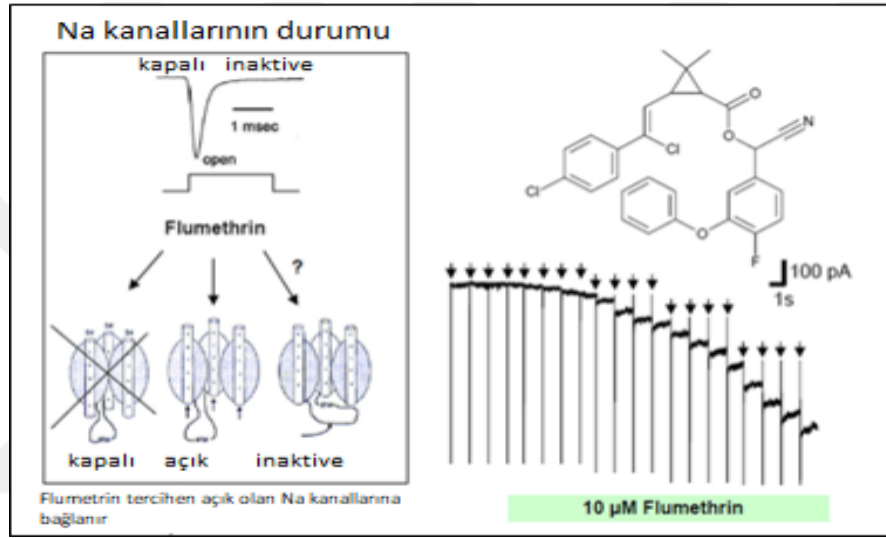
Çizelge 1.3. Flumetrine ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikler

Özellikleri	Sonuç																		
Rengi ve Fiziksel Durumu	Sarı-Kehribar Rengi, Katı																		
Koku	Ayırt edici bir kokusu yok																		
Erime Sıcaklığı	156,4°C																		
Kaynama Noktası ve Sıcaklığı	> 250°C																		
20°C de Yoğunluk	1,383 g/cm ³																		
20°C'de Buhar Basıncı	< 2,442 × 10 ⁻⁵ Pa at 24,8°C																		
Ultraviyole (UV) Görünür Spektrum	λ _{max} = 268 nm, independent of pH																		
31°C'de Suda Çözünürlük	Su = 0,067 mg/L pH 4 = 0,046 mg/L pH 7 = 0,47 mg/L pH 9 = 0,33 mg/L																		
21°C'de Organik Solventlerde Çözünürlük	<table> <tr> <th>Solvent</th><th>Çözünürlük(g/L)</th></tr> <tr> <td>Aseton</td><td>199</td></tr> <tr> <td>Asetonitril</td><td>>200</td></tr> <tr> <td>Diklorometan</td><td>>200</td></tr> <tr> <td>Dimetil sülfoksit</td><td>44</td></tr> <tr> <td>Etanol</td><td>44</td></tr> <tr> <td>Etil asetat</td><td>>200</td></tr> <tr> <td>Heksan</td><td>22</td></tr> <tr> <td>Toluen</td><td>>200</td></tr> </table>	Solvent	Çözünürlük(g/L)	Aseton	199	Asetonitril	>200	Diklorometan	>200	Dimetil sülfoksit	44	Etanol	44	Etil asetat	>200	Heksan	22	Toluen	>200
Solvent	Çözünürlük(g/L)																		
Aseton	199																		
Asetonitril	>200																		
Diklorometan	>200																		
Dimetil sülfoksit	44																		
Etanol	44																		
Etil asetat	>200																		
Heksan	22																		
Toluen	>200																		
n-Oktanol Su Bölme Katsayısı (Kow)	log Kow = 7,52																		
Ayrışma Sabiti (pKa)	Literatür Verisi Yoktur.																		

1.3.1. Flumetrinin Temel Etki Mekanizması

Flumetrin sentetik bir piretroid olan Tip II piretroid olarak anılan bir insektisittir. Flumetrin yağda çözünebilir bir insektisittir. Tip II piretroid türevi uzun etkili bir madde olduğu için hayvanlarda dış parazitlere karşı dökme çözelti ve banyo şeklinde uygulanır. Etkisi diğer piretroidler gibi temas yoluylaadır.

Sentetik piretroidler öncelikle nörotoksik etkilere neden olur. İnsektlerin nöromembranlarının aksonlarında bulunan voltaja duyarlı sodyum kanallarının geçit özelliklerini değiştirir. Böylece uzun süreli bir sodyum akışı ortaya çıkar; nöronlardaki voltaja bağımlı sodyum kanallarına bağlanarak kapanmasını geciktirir ve böylelikle sodyum kanalları ve nöronların depolarizasyonlarına neden olur. Bu aksiyon potansiyellerini etkiler veya tekrarlayan aktiviteye (Tip I piretroidler) ya da sinir iletiminin tıkanmasına (Tip II) sonucu böceklerde ölümcül etki oluşturduğu gözlemlenmiştir (Mishra vd., 2012b; Stanneck vd., 2012b).



Şekil 1.3. Flumetrine ait temel etki mekanizması (Stanneck, 2012)

Flumetrin; özellikle bağırsaklarda, akciğerlerde ve deride çabuk emilim gösterdiği bilinmekte ve maruziyete bağlı olarak dermal lezyonlar görülmektedir. Flumetrin vücutta, glukuronidasyon gerektirmeyen basit bir metabolizmaya uğraması sonrasında inaktif metaboliti flumetrin asit oluşmaktadır (Stanneck vd. 2012b; Anadon vd., 1995; Kaneko ve Miyamoto, 2001).

1.3.2. Flumetrinin Toksisitesi

Flumetrinin bazı laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan kısa ve uzun vadeli çalışmalarda toksik etkileri olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda birincil hedef sinir sistemi olsa da organizma üzerinde oral maruziyete bağlı olarak dermal lezyonlar ve intraperitoneal uygulamalarla karaciğerdeki enzimlerin üzerinde önemli farklılıklara sebebiyet verdiği bilinmekte, vücuttaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozduğu

ayrıca yapılan çalışmalar dikkate alındığında flumetrinin karaciğer hasarı oluşturabileceği gözlemlenmiştir (Mishra vd., 2012b; Anadon vd., 1995).

1.3.3. Flumetrin ile Yapılmış Bazı Literatür Çalışmaları

Flumetrin için kromatografik yöntemler kullanılarak yapılan literatürdeki bazı çalışmalara baktığımızda;

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılarak bal ve balmumundan flumetrin kalıntıları tespitinde beş *Apis mellifera* kolonisinden flumetrin işleminden önce ve uygulamadan 30, 60 ve 90 gün sonra kırk bal örneği toplandı; Bal numuneleri, hücrelerin kapaklarının bıçakla açılması ve 12 mL kapasiteli bir şırınga ile balın çıkarılmasıyla alınmıştır. Seçilen beş arı kovanından yirmi balmumu örneği (her koloninin periferik çerçevelerinden bir örnek) toplandı. Bal ve balmumu numunelerinin ekstrakt olarak n-hekzan ve diklorometan (4:6, h/h) olmak üzere iki solvent kullanıldı; bunlar döner buharlaştırmayla daha da konsantre edilmiştir. Tüm numuneler saflaştırıldı ve 267 nm dalga boyunda saptandı. 40 numunede HPLC kalıntı analizinden, tüm bal numunelerinin akarisit flumetrin içermediği bununla birlikte, 30 gün sonra arı kolonilerinden alınan balmumu örneklerinde tüm balmumu numuneleri flumetrin kalıntıları tespit edilmiştir. HPLC aracılığıyla mevcut flumetrin saptama yönteminin, yüksek hassasiyetle Gaz Kromatografisinin umut verici bir alternatifi olduğu kanıtlanmıştır ve bal ve balmumundan flumetrin kalıntılarını belirlemek için uygun bir yöntem olduğu rapor edilmiştir(Jamal, 2020).

Flumetrin oldukça etkili bir akarisittir ancak lipofilik özelliğinin arı kovanlarında ve arı ürünlerinde birikme gibi bazı olumsuz etkileri vardır. Bununla birlikte, kronik flumetrin maruziyetinin ardından bal arılarının hayatta kalma stresi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu soruyu cevaplamak için, bal arısı (*Apis mellifera*) işçilerinin larvalardan yetişkinlere kadar flumetrinin ölümcül olmayan konsantrasyonlarına kronik olarak maruz kalmasıyla oluşan stres üzerine bir çalışma yapılmıştır. Üç flumetrin tedavi grubu (1, 0,1, 0,01 mg/L) ve bir kontrol grubu (flumetrin eklenmemiş) oluşturulmuş ve işçi larvaları dört gruba ayrılmıştır. Daha sonra, 2 günlük larvalardan başlayarak, dört grubun larvaları ve müteakip ortaya çıkan işçi arıları, sırasıyla tüm yetişkin işçi arılar ölene kadar karşılık gelen konsantrasyonlarda flumetrin ile oral olarak beslenmiştir.

- Konsantrasyon 0,01 mg/L flumetrin olduğuunda, yetişkin işçi arıların ömrü kısalmış ve 1 günlük pupalarda detoksifikasyonla ilgili genlerin (CYP450,GSTS) aşağı regölasyonu başlatılmıştır.
- Konsantrasyon 0,1 mg/L flumethrin'de olduğuunda, yetişkin işçi arıların ömrü tekrar kısalmış ve 1 günlük pupalarda bellekle ilgili genlerin (GluRA1, Nmdar1, Tyr1) ve 1 günde Tyr1 geninin aşağı regölasyonu -yaşlı işçi arılar, 1 günlük pupalarda detoksifikasyonla ilgili genler (CYP450,GSTS) ve 7 günlük işçi arılarda bağışıklık genleri (Defensin1, Hymenoptaecin) gözlenmiştir.
- Konsantrasyon 1 mg/L flumetrin olduğuunda, yeni çıkan bal arısının daha hafif doğum ağırlığı ve 7 günlük işçi arılarda koku öğrenme ve hafızada eksiklikler gözlenmiştir. Hafızayla ilgili genler (GluRA1, Nmdar1, Tyr1) 1 günlük pupalarda ve genler (Nmdar1,Tyr1) 1 günlük işçi arılarda olduğu gibi, detoksifikasyonla ilgili genler (CYP450,GSTS) de aşağı regölö edilmiştir.

Bu veriler, arı kovanları üzerindeki istenmeyen sonuçlar hakkında bilgi sağlamakla birlikte arı kovanlarındaki flumetrin kalıntılarının dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğinin altını çizmektedir (Li, 2022).

Bal arılarının (*Apis mellifera* L.) yıllık aşırı kaybı, tarımı ve biyoçeşitliliği etkileyen küresel bir sorundur. *Varroa destructor*, bu kayıpta önemli bir rol oynar. Yıllarca süren yoğun araştırmalara rağmen, *Varroa* – bal arısı etkileşiminin karmaşık mekanizmaları hala tam olarak tanımlanamamıştır. Bu nedenle, bu alışma *Varroa* akarlarının ve virüsler dahil doğal olarak ilişkili faktörlerin bal arıları üzerindeki etkisi hakkında yeni ayrıntıları ortaya çıkarmak için akar önleyici tedavi uygulanmadan yetiştirilen aynı koloni grubundan kışlamadan önce toplanan *Varroa* parazitli ve parazitsiz on günlük işçi arılar arasındaki farklara bakılmıştır. Standart anti-*Varroa* tedavisi uygulanmış kolonilerden toplanan bal arılarıyla ek karşılaştırma, bir piretroid flumetrin etkisine ilişkin daha fazla bilgi sağlayabilir. Akar parazitlenmesine maruz kalan bal arılarının analizi, bağışıklık, oksidatif stres, koku tanıma, sfingolipidlerin metabolizması ve RNA düzenleyici mekanizmalarla ilgili transkriptom ve proteomdaki değişiklikleri ortaya çıkarmıştır. Bağışıklık tepkisi ve sfingolipid metabolizması güçlü bir şekilde aktive olurken, koku alma tanıma ve oksidatif stres yolları parazitlenmemiş olanlara kıyasla *Varroa* parazitli bal arılarında inhibe edilmiştir. Ayrıca, metabolomik analiz, besinlerin ve enerji depolarının tükendiğini doğruladı, bu da parazitlenmiş işçilerde genel olarak bozulmuş bir metabolizmaya yol açmıştır. Kesinlikle parazitlenmiş arılar üzerinde gerçekleştirilen birleşik omik tabanlı analiz, *Varroa* sp.'nin

zararlı etkilerinin altında yatan temel moleküler bileşenleri ve mekanizmaları ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, biyolojik tehditlere bal arısı tepkisi ve Varroa akarına karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi hakkında daha fazla araştırma için teorik temel ve birbirine bağlı veri kümeleri sağlamıştır (Kunc, 2022).

Arı ürünleri, bal arıları tarafından kovana taşınabilen ve bala karışabilen pestisitlerle kirlenmiş bir ortamda üretilebilir. Bu nedenle, bal numunelerindeki pestisit kalıntılarını belirlemeye yönelik hızlı ve modern yöntemler, tüketicilerin sağlığını garanti altına almak için şarttır. Bu çalışmada, balda 116 pestisit miktarının belirlenmesi için basit bir UHPLC–MS/MS analizinin öncesinde değiştirilmiş bir QuEChERS prosedürünün kullanımını içermiştir. Yöntem, Avrupa Birliği SANCO/12571/2013 yönergelerine göre doğrulanmıştır. Brezilya'nın beş eyaletinden 100 bal örneğinin belirlenmesi için uygulandı. Genel olarak bal örnekleri pestisit kalıntıları açısından uygun kalite göstermiştir. Doğrulanmış yöntemin hızlı, verimli ve güvenilir olduğu ve baldaki pestisitlerin izlenmesinde kullanılabileceği ve Brezilya Ulusal Kalıntı ve Kirletici Planı'na (PNCRC) katılabileceği gösterilmiştir (Tette, 2016).

1.4. Analitik Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri

Analitik yöntem geçerlilik testleri (validasyon), analitik yöntemlerin oluşturulmasında ve bir laboratuvarda güvenilir analitik veriler elde edilmesi için yapılması gereken çok sayıda değerlendirme parametrelerinden oluşmaktadır. İstenilen çalışma koşullarında ve çalışması hedeflenen örnekler için doğru ve kesin analitik veriler elde edilmesi için yöntem validasyon testleri kilit bir unsurdur (Segneanu vd., 2013).

Bu tez çalışmasında flumetrin analizi için seçici, hassas, doğru ve kesin bir kromatografik analiz yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Kullanılacak sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin literatüre oranla daha düşük maliyetli ve daha hassas tayin limitlerine ulaşabilmesi için yeni nesil sıvı kromatografi sabit fazlarından faydalanılmıştır.

Daha düşük tayin limitlerine inmek için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha az çözücü harcanması, ekstraksiyon sonrasında geliştirilmiş olan kromatografik tekniklerin validasyon çalışmalarının yapılmasıyla da geliştirilen yöntemin uluslararası geçerlilikleri gösterilecektir.

HPLC alışmaları yapılırken yeni nesil kolonların kullanılmış ve analizlerin verimliliğinin arttırılması planlanmıştır. Yeni nesil kolonlarda farklı sıcaklık, pH gibi parametre denemeleri yapılarak analize olan etkisi incelenecek olup validasyon çalışmaları tamamlanacaktır. Validasyon alışmaları tamamlandıktan sonra uygun yöntem ve tayin metodu seçilecektir. Sahadan elde edilecek bal numuneleri kullanarak geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelerden analize imkan verip vermediği belirlenmeye çalışılacaktır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Flumetrinin Analitik Tayin Yöntemleri

Literatür çalışmalarında Flumetrin analizi için çeşitli analitik yöntemler mevcuttur. Bu tez kapsamında flumetrin analizi için seçici, hassas, doğru ve kesin bir kromatografik analiz yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Kullanılacak sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin literatüre oranla daha düşük maliyetli ve daha hassas tayin limitlerine ulaşabilmesi için yeni nesil sıvı kromatografisi sabit fazlarından faydalanılmıştır. Daha düşük tayin limitlerine inmek için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha az çözücü harcanması hedeflenmektedir. Ekstraksiyon sonrasında geliştirilmiş olan kromatografik tekniklerin validasyon çalışmaları yapılarak uluslararası geçerlilikleri de gösterilmiştir. HPLC çalışmaları yeni nesil kolonlar kullanılması planlanmıştır. Bu kolonlarda farklı sıcaklık ve pH gibi parametre denemeleri yapılarak analize olan etkisi incelenecek olup validasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

2.1.1. Sıvı Kromatografisi

Kromatografi; ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi amaçlar için kullanılan kimyasal bir tekniktir. Tüm kromatografik uygulamalarda birbiriyle karışmayan iki ortam, bir "sabit faz (kolon)" ve bir "hareketli faz" bulunur. Sabit fazın amacı maddeleri üzerinde tutarak alıkoymak, hareketli fazın amacı ise maddeleri sabit fazın üzerinde hareket ettirmektir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) organik, inorganik, fiziksel ve biyolojik birçok numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek için kullanılan bir tayin metodudur. HPLC bir karışım içindeki maddeler sabit faz ve hareketli faza ilgilerine göre etkileşimlere girmesi ve kolon içinde değişik hızlarda hareket etmeleri neticesinde bileşenlerin kolonu farklı zamanlarda terk ederek birbirlerinden ayrılması temel prensibine dayanmaktadır.

HPLC, durgun fazın tipine göre veya ayırma mekanizmasına göre sınıflandırılır. Bunlar arasında;

- sıvı-sıvı kromatografisi,
- katı-sıvı kromatografisi,

- iyon-değişim kromatografisi,
- boyut eleme kromatografisi,
- afinite kromatografisi sayılabilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) analizleri öncesinde örnekler için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE) ve olmak üzere farklı şekillerde yapılabilmektedir. Ekstrakte edilen örnekler, HPLC analizlerindeki hareketli faz akışlarında izokratik veya gradiyent olarak değişiklik yapılarak düşük tayin sınırlarına ulaşmak mümkündür. Ayrıca analiz süresi hazırlanacak hareketli fazın akışına ve kolon sıcaklığına göre azalmaktadır.

2.1.2. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC) için yaygın olarak kullanılan dedektör kütle spektrometridir (MS). Hareketli faz olarak kullanılan gaz inert olmalıdır. Azot, helyum ve hidrojen gibi gazlar bulunmaktadır. MS yardımıyla moleküllerin iyonlarına ayrıştırılması sonucu kütle tayini yapılmaktadır. GC-MS’de düşük örnek hacmi ile düşük tayin limitlerine hızlıca ulaşılabilir ancak analizi yapılan örnek uçucu olmalıdır. Bu nedenle ekstraksiyon için de organik çözücüler kullanılmaktadır. Numune uçucu değilse derivatizasyon (türevleme) işlemlerine tabi tutulur. Ancak türevleme basamağı çok fazla numunenin analizinin eş zamanlı yapılacağı durumlarda bir zaman kaybına sebep olmaktadır.

2.1.3. Diğer Analitik Yöntemler

Flumetrim analizi için literatürde kullanılan diğer tekniklerden olan, UV-Görünür (UV-Vis) Spektrofotometre kolay ve çevre dostu olması nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sensörler, fiziksel değişimleri elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Günümüz sensör sistemleri, çevre ortamdan gelen uyarıları ve sinyalleri algılayarak okunabilir bir sinyal ile cevap veren cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Sensörler, algılayıcı tabaka ve çevirici tabaka olmak üzere iki temel kısımdan oluşmaktadır. Algılayıcı kısım çevreden gelen uyarı veya sinyalleri algılayarak bunları bir enerji formuna dönüştürür. Çevirici ise bu enerjiyi kullanarak işlenebilir analitik sinyaller üretir. Elektrokimyasal sensörler farklı analitlerin ve moleküllerin tayini için kullanılan önemli bir yöntem haline gelmiştir. Pestisit analizlerinde kullanılmakla birlikte flumetrim analizine ait literatür bilgisi sınırlıdır.

2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez süresince kullanılacak olan malzemeler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan malzeme listesi

Malzeme	Marka
Asetonitril (HPLC Kalite)	Merck
Methanol (Kromatografik Kalite)	Isolab
Metil Tert Bütıl Eter (MTBE)	Sigma-Aldrich
Etil Asetat	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Sodyum Klorür	Merck
Asetik Asit	Merck
%80 Orto-fosforik Asit	Merck
Flumetrin	Sigma-Aldrich

2.3. Kullanılan Cihazlar

Tez süresince kullanılacak olan cihazlar marka ve modelleri ile birlikte Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan cihazların listesi

Cihaz İsmi	Markası
pH metre	Thermo Scientific Orion 3 Star
Hassas Terazı	Mettler Toledo XS204
HPLC	Agilent 1100
Manyetik Karıştırıcı	Mirak Thermolyne
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex TK 100 H
Çoklu Vorteks	Biosan Multi Vortex V-32
Santrifüj	Heraeus Labofuge 200
Ultra Saf Su Cihazı	Human Up 900 Scholar-UV
Saf Su Cihazı	Nüve ND8
2-20 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
20-200 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
100-1000 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	Brand
Vakum Pompası	Knf Neuberger D 79112
Azot Evaporatörü (ND-200-2)	Miulab
Vorteks	Velp Scientifica Classic

2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez süresince kullanılan sarf malzemelerin listesi Çizelge 2.3’te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan sarf malzemelerin listesi

Sarf Malzeme İsmi	Markası
200 µL Mikropipet Ucu	Jet Biofil
1000 µL Mikropipet Ucu	Jet Biofil
2 mL N9 HPLC vial	Isolab
2 mL N9 HPLC vial kapağı	Isolab
300 µL İnsert	Isolab
1000 mL Borosilikat Cam Şişe	Isolab
500 mL Borosilikat Cam Şişe	Isolab
Selüloz Asetat Membran Filtre (0,45µm)	Isolab
3 mL Pastör Pipeti	Süber Cam
Vakum Filtre Seti (1000 mL)	Isolab
Cam Tartım Küveti	Süber Cam
10 mL Balon joje	İldam Cam
50 mL Balon joje	İldam Cam
1000 mL Mezür	İldam Cam
Parafilm	Isolab
Metal Spatül	Isolab
Polipropilen Deney Tüpü (16x100 mm)	Isolab
Polietilen Tıpa (15/16 mm)	Isolab
Cam Deney Tüpü (12x75mm)	Süber Cam

2.5. Kullanılan Analitik Kolonlar

Tez süresince kullanılan analitik kolonlar Çizelge 2.4’de listelenmiştir.

Çizelge 2.4. Kullanılan analitik kolonların listesi

Kolon İsmi	Markası	Kolon Özellikleri
Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi
Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm)	Phenomenex	Core-Shell Teknolojisi

2.6. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Bu tez kapsamında, tüm analitik standartlar aynı hazırlama yöntemi ve aynı konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan tüm kimyasal maddeler katı formda olduğundan, hassas terazi kullanılarak cam tartım küveti üzerine her bir analit için 10 mg tartılmış ve 10 mL balon joje içerisinde asetonyril ile çözülerek hazırlık işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılmak üzere ana stok kullanılarak 1 µg/mL, 5 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere 3 adet ara stok hazırlanmıştır. Ara stok hazırlama tablosu Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Analitik standartların ara stok konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri

Ara Stok Konsantrasyonları	Hazırlama Yöntemi
50 µg/mL	1 mg/mL ana stoktan 500 µL alınmış, asetonyril ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
5 µg/mL	50 µg/mL ara stoktan 1 mL alınmış, asetonyril ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
1 µg/mL	5 µg/mL ara stoktan 2 mL alınmış, asetonyril ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.7. Flumetrin için Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Flumetrin doğrusal aralığını belirlemek için 7 farklı derişim noktaları belirlenerek sırasıyla 0,05-10 µg/mL içeren saf standart ve bal ortamları hazırlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonları elde etmek için 1 µg/mL, 5 µg/mL ve 50 µg/mL ara stokları kullanılmıştır.

2.8. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

2.8.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

Her gün taze olarak hazırlanan hareketli faz kullanılmıştır. Sulu faz optimizasyon çalışmaları için %0,1 ortofosforik asit veya %0,5 asetik asit içeren çözeltiler kullanılmıştır. Çözelti pH'sı 5 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Organik faz olarak kullanılacak solventler asetonyril ve metanol tercih edilmiştir. Seçilen organik solvent, sulu hareketli fazın hazırlanışı sırasında 20 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir.

2.8.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu

Hareketli fazın pH'si analitlerin sabit faz ile etkileşimini ve ayırma gücünü etkileyebilir. Bu nedenle flumetrin tayinine yönelik uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla öncelikle % 0,1 orto-fosforik asit kullanılarak pH 2,5 ve pH 6 noktaları seçilerek asidik koşullarda denemeler yapılmıştır. Daha sonra % 0,5 asetik asit (pH 2,7) kullanılarak sulu fazdaki değişimin analize etkisi incelenmiştir. Organik faz çifti olarak asetonyitril ve metanol kullanılmıştır.

Çizelge 2.6. Hareketli faz pH denemeleri için kullanılan analitik parametreler

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	%0,5 asetik asit:Asetonyitril 20:80 (h/h)
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	200 nm

2.8.3. HPLC Kolon Denemeleri

Tez boyunca yeni nesil analitik kolonların flumetrin tayinine etkisinin belirlenmesi amacıyla 2 adet farklı kolon denemesi yapılmıştır. Kolon isimleri Çizelge 2.4'te verilmiştir. Kinetex EVO C18 geleneksel kolonlara göre asidik ve bazik geniş pH aralıklarında ve %100 sulu çözeltilerle çalışma imkânı sağlaması yönüyle diğerlerinden ayrılmaktadır. Kinetex C18 serisi geleneksel gözenekli partiküllere kıyasla daha fazla verimlilik ve geliştirilmiş performans sağlamak üzere tasarlanmıştır.

2.8.4. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu

Sıcaklık moleküllerin hareketine etki eden bir parametredir. Buna bağlı olarak flumetrin analizine yönelik sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla 25°C, 30°C, 35 °C ve 40°C 'de denemeler yapılmıştır. Bu çalışma için analizin yapıldığı kromatografik koşullar Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,1 orto-fosforik asit (pH:2,5) ve Asetonitril 20:80(h/h)
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	200 nm

2.8.5. HPLC Hareketli Faz Akış Hızı Optimizasyonu

Hareketli fazın hızı analitik dedektörden aldığı yanıtı doğrudan etkileyen bir parametredir. Flumetrinin analizine yönelik uygun kromatografik koşulun belirlenmesi amacıyla 1mL/dk, 1,25mL/dk ve 1,5mL/dk akış hızı denemeleri yapılmıştır. Bu çalışma için analizin yapıldığı kromatografik koşullar Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. HPLC kolon sıcaklık denemeleri için kullanılan analitik yöntem parametreleri

Parametreler	Özellikleri
Kolon İsmi	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,5 Asetik Asit (ph:2,7) ve Asetonitril 20:80(h/h)
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dedektör	267 nm

2.8.6. UV Dalga Boyu Optimizasyonu

Analitlerin UV dedektörden alınan absorbansının dalga boyuna etkisi, moleküler yapı ve kimyasal bağların doğasına bağlıdır. Analitler belirli dalga boylarında daha fazla veya daha az ışık absorpsiyonu yapabilirler. Bu özellik, moleküler yapıdaki çift bağların varlığı, aromatik halkaların varlığı, fonksiyonel grupların tipleri gibi faktörlere bağlıdır. Farklı dalga boylarının flumetrin analizine etkisini belirlemek amacıyla 200 nm ve 267 nm dalga boylarında denemeler yapılmıştır. Analizin yapıldığı kromatografik koşullar Çizelge 2.7 ve 2.8’de verilmiştir.

2.9. HPLC Analizi için Yöntem Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntem validasyon parametreleri Uluslararası Uyum Konseyi (ICH), Avrupa İlaç Konseyi (EMA), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi Dairesi (FDA) tarafından yapılması ve dikkat edilmesi önerilen testleri içermektedir. Bu bağlamda incelenen parametreler aşağıda sunulmuştur.

2.9.1. Seçicilik

Sıvı kromatografi yöntemlerinde seçicilik parametresi, yöntemin güvenilirliği için oldukça önemlidir. Örnek matrisindeki bileşenlerin hedef analitle girişim yapmadığı ve analitin doğru ve spesifik olarak ölçülebildiği yöntem seçici olarak tanımlanabilir. Analitik standartları içeren 10 µg/mL analitik standart içeren ve içermeyen bal ve ticari plazma örnekleri ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogramlarda ticari plazma ve bal matrislerinde hedef analitlerin matristeki herhangi bir bileşen (safsızlık) ile girişim yapıp yapmadığı elde edilen kromatogramlar sonucunda kontrol edilmiştir.

2.9.2. Doğruluk

Doğruluk, yöntem validasyon çalışmaları için en önemli kriterlerden biridir. Ölçülen değerlerin gerçek değerlere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak doğruluk geri kazanım çalışmaları (%) olarak da ifade edilir.

Geliştirilen yöntem kullanılarak 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 80 µg/mL konsantrasyonlarda analitik standartları içeren 3 farklı kalite kontrol (QC) noktası seçilmiştir. HPLC analizi sonrası % geri kazanım Şekil 2.1'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan Konsantrasyon Sonucu}}{\text{Gerçek Konsantrasyon}} \times 100$$

Şekil 2.1. Geri kazanım hesaplama denklemi

2.9.3. Kesinlik

Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin çalışma koşullarında bireysel örneklerin analizi sonucu elde edilen verilerin birbiri arasındaki uyumluluk, tekrar edilebilirliğinin bir göstergesidir. Sonuçların birbirine yakınlığı standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma

(BSS) olarak ifade edilir. Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi uygulanarak matris üzerine 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 80 n µg/mL konsantrasyonlarda analitik standartları içeren 3 farklı kalite kontrol noktası (QC) 3 farklı gün ayrı ayrı hazırlanmış olup en az 3 tekrarlı analiz yapılarak SS ve % BSS olarak Şekil 2.2'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% BSS = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Şekil 2.2. Bağlı standart sapma hesaplama denklemi

2.9.4. Doğrusallık

Kantitatif olarak konsantrasyon hesabının belirlendiği çalışmalarda doğrusallık geliştirilen metodun güvenilirliği için oldukça önemlidir. En az 5 farklı derişimde hazırlanan hedef analit konsantrasyonlarının ölçülen analitik cihazlarda aldığı sinyallerin grafiksel ortamda yorumlanmasıyla değerlendirilir. Bu tez çalışmasında 7 adet farklı derişim noktası seçilmiştir. Hazırlanan ara stoklar kullanılarak seçilen matriste son konsantrasyonu sırasıyla 0,05-10 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve HPLC-UV 'de analiz edilmiştir. Oluşturulan grafikte regresyon denkleminin başarısını belirlemek amacıyla eğim (m), kesişim (n) ve belirleme katsayısı (R²) parametreleri incelenmiştir.

2.9.5. Çalışma Aralığı

Yöntemin çalışma aralığı doğrusallığın bir göstergesidir ve en iyi çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin %50'si ile % 150'si arasında en iyi performansı veren aralık olarak tanımlanmaktadır.(Gumustas ve Ozkan, 2011) Geliştirilen yöntemin çalışma aralığı doğrusallık çalışması için belirlenen konsantrasyon değerleri arasında olacaktır ve genellikle çalışma aralığının en alt değeri LOQ değeri olarak tanımlanmaktadır.

2.9.6. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Teşhis sınırı (LOD), cihazın algıladığı ve kromatogramda görünen ancak herhangi bir miktar tayininin yapılamadığı en küçük derişim olarak tanımlanmaktadır. Tayin sınırı (LOQ) ise analiz sonrasında cihazın algılayabildiği ve kromatogramda ölçülebilen en düşük konsantrasyondur. Genellikle LOD ve LOQ hesaplamaları için kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için herhangi bir analit içermeyen kör örnek ile en

düşük analit konsantrasyonu bilinen örnekler karşılaştırılır. LOD için sinyal/gürültü oranı 3 olmalıdır. LOQ için ise sinyal/gürültü oranı 10'dur. Teorik olarak LOD ve LOQ hesaplama denklemleri şekil 2.3'te gösterilmiştir.

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{m} \quad LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m}$$

Şekil 2.3. Teorik olarak teşhis ve tayin sınırı hesaplama denklemi

2.9.7. Sağlamlık

Sağlamlık testi yöntem validasyonunun önemli bir parçasıdır. USP'de bir analitik yöntemin sağlamlığı aynı numunenin farklı laboratuvarlar, analistler ve farklı cihazlar gibi çeşitli pek çok farklı koşullarda yapılan analizlerin sonuçlarının tekrar elde edilebilmesi olarak tanımlanmaktadır. Oluşturulan metodun sağlamlığı test edilmiştir.

2.10. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntemi

Analiz için 5 mL bal örneği tartılarak 50 mL ultra saf suda çözülmüştür. 1mL bal çözeltisinden eklenmiştir. Ekstraksiyon pH'si 11 olarak belirlenmiş olup ortamı bazik hale getirmek için 30 µL NaOH (0,1 M) eklenmiş ve iyonik şiddeti arttırmak için yaklaşık 75 mg NaCl eklenmiştir. Daha sonra ekstraksiyon çözeltisine 2 mL hekzan eklenmiş, 5 dk. vorteks yapılmıştır. Vorteks sonrasında 5000 RPM'de 2 dk santrifüj edilerek organik solvent yeni polipropilen tüpe alınmıştır. Ardından 40 °C de azot altında uçurulmuştur. 100 µL asetonitril ile kuruyan örnek çözülmüş ve 20 µL doğrudan HPLC'ye enjekte edilmiştir.

2.11. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu

2.11.1. Ekstraksiyon Solventi Seçimi

Ekstraksiyona hazırlık aşamalarından sonra bal örneği için uygun ekstraksiyon solventinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla hekzan, etil asetat, metil tert bütıl eter kullanılmıştır.

2.11.2. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu

Kullanılan ekstraksiyon solvent hacminin ekstraksiyon verimine etkisinin belirlemek amacıyla sırasıyla 1 mL, ve 2 mL ve hekzan kullanılmıştır.

2.11.3. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu

Geliştirilen ekstraksiyon yönteminde flumetrin sulu ortamda bazik özelliğe sahip olması nedeniyle ortamın bazik hale dönüştürülmesi hedeflenmiştir.

Ekstraksiyon verimliliğine etkisinin ölçülmesi amacıyla öncelikle bazik ortam oluşturmak için 0,1 M NaOH kullanılarak bal örneğine 30 µL eklenmiştir. Daha sonrasında elde edilen ortamın pH'sı 11 olup ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir.

2.11.4. İyonik Şiddet Optimizasyonu

pH optimizasyonu sonrasında iyonik şiddet optimizasyonu yapılmıştır. İyonik şiddetin ekstraksiyon verimine etkisinin belirlenmesi için farklı kütlelerde sırasıyla 30mg, 75mg ve 100mg NaCl kullanılmıştır.

2.11.5. Ekstraksiyon Süresi Optimizasyonu

Ekstraksiyon süresi denemeleri sırasıyla 5, 10 ve 15 dakika olarak belirlenmiştir. Bu süre aralıkları, ekstraksiyon verimliliğini değerlendirmek ve en uygun süreyi belirlemek amacıyla seçilmiştir.

2.12. Matris Etkisi

Matris, analiz edilecek örnek içinde bulunan analitten başka diğer bulunan her bileşen diye tanımlanabilir. Yöntem validasyon çalışmalarında analiz yönteminin özgün olması hedef analiti matriste bulunabileceği değerlendirilen diğer bileşenlerin olduğunda doğru ve özgün olarak tanınması ve ölçüm yapmasıdır.

Her bir analit ve iç standart için matris etkisi, matris varlığındaki pik alanının (kör matrisin analit katıldıktan sonra ekstaksiyonu yapıp ölçülen pik alanı), matris yokluğundaki

pik alanına (söz konusu analitin saf çözeltisinin pik alanı) oranıyla gerçekleştirilir. Hedef analit ve diğer bileşenlerin HPLC kromatogramındaki piklerin etiketlenmesi ve çözünürlüklerinin incelenmesiyle analiz edilir.

Matrisin etkisinin belirlenmesi amacıyla 1 ppm flumetrinin hem baldan hem de sudan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2.13. Belirlenen En Uygun HPLC Koşulu

Optimizasyon çalışması sonrasında belirlenen en uygun HPLC yöntemi Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. En uygun HPLC-UV analitik yöntem koşulları

Parametreler	Özellikleri
Kolon	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm id., 5 µm)
Hareketli faz	% 0,5 AsetikAsit (pH:2.7) ve Asetonitril 20:80 (h/h)
Akış Hızı	1 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	40 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
UV dalga boyu	267 nm

2.14. Yerel Bal Üreticilerinden Elde Edilen Bal Numunelerinin Analizi

Sürdürülebilir bir yaşam için birim alandan elde edilebilecek verimin artırılması amacıyla kullanılan kimsayal mücadelen dünyada olduğu gibi ülkemizde de tercih sebebi halini geldiği bilinmektedir. Varroa destructor kovanlara bulaşması neticesinde ise arı zararlıları ile mücadelede insektisit amaçla sentetik akarisitler kullanılmaya başlanılmıştır. Bu sentetik akarazitlerin yanlış kullanımı arılarda arı toksisitesi beraberinde getirmiş ve arı ürünlerinde kalıntı bırakabildiği gözlemlenmiştir.

Bu sebeple ÷lkemizin çeşitli b÷lgelerinde yerel bal üreticileri tarafından üretilen ballarda flumetrin tayini için;

- Doğu Anadolu Bölgesinde iki farklı ilden temin edilen (Ardahan, Hakkari) toplam 7 farklı yerel bal üreticisi tarafından üretilen bal örneği,
- Ege Bölgesinde bir ilden (Aydın) temin edilen toplam 2 farklı bal üreticisi tarafından üretilen bal örneği,
- İç Anadolu Bölgesinde bir ilden (Ankara) temin edilen 1 yerel bal üreticisi tarafından üretilen bal örneği Çizelge 2.9.'da belirtilen uygun HPLC-UV analitik yöntem koşulları doğrultusunda analiz edilmiştir.

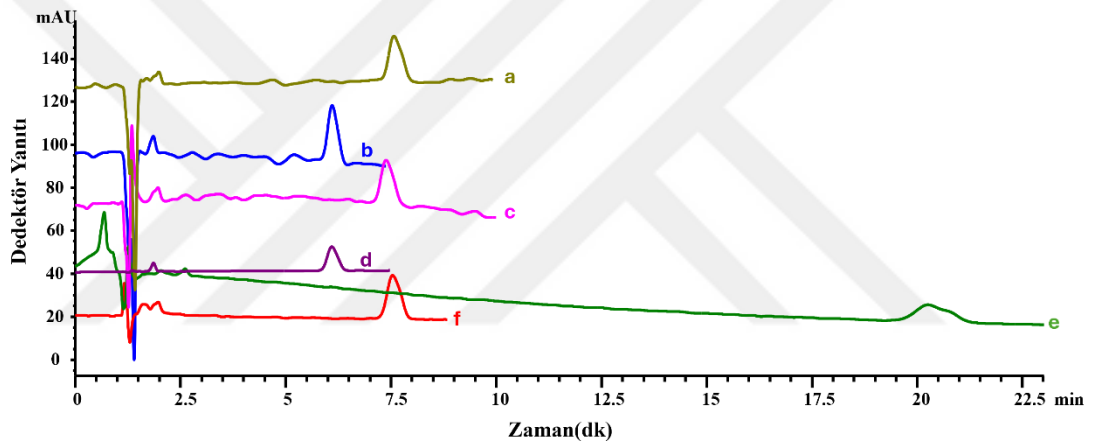


3. BULGULAR

3.1. HPLC Analizi için Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

3.1.1. Hareketli Faz Optimizasyonu

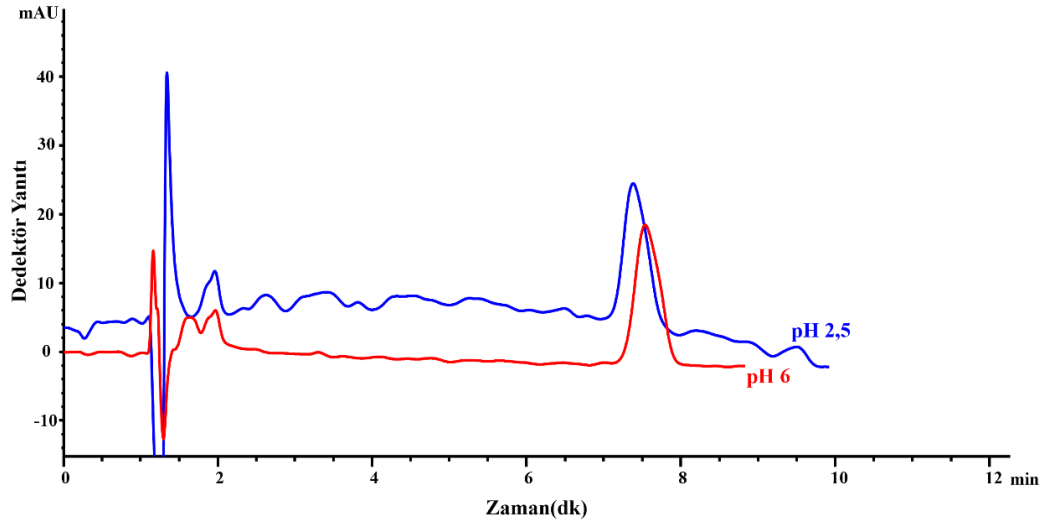
Hareketli faz optimizasyon için belirlenen organik fazlar deneme öncesinde en az 20 dakika degaze edilmiştir. Sulu faz için % 0,1 H₃PO₄ ve % 0,5 asetik asit çözeltileri her gün taze olarak hazırlanmıştır. Flumetrinin fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde hidrofobik yapısı nedeniyle organik faz oranının yüksek olduğu optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Belirlenen koşullar ve kromatogramları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Hareketli faz çiflerinin optimizasyon kromatogramları; **a)** %0,5 asetik asit:MeOH 30:70 h/h, **b)** %0,5 asetik asit:ACN 20:80 h/h, **c)** %0,1 H₃PO₄(pH:2,5):ACN 20:80 h/h, **d)** %0,5 asetik asit:MeOH 20:80 h/h, **e)** %0,1 H₃PO₄(pH:2,5):MeOH 30:70 h/h, **f)** %0,1 H₃PO₄(pH:6):ACN 20:80 h/h

3.1.2. Hareketli Faz pH Optimizasyonu

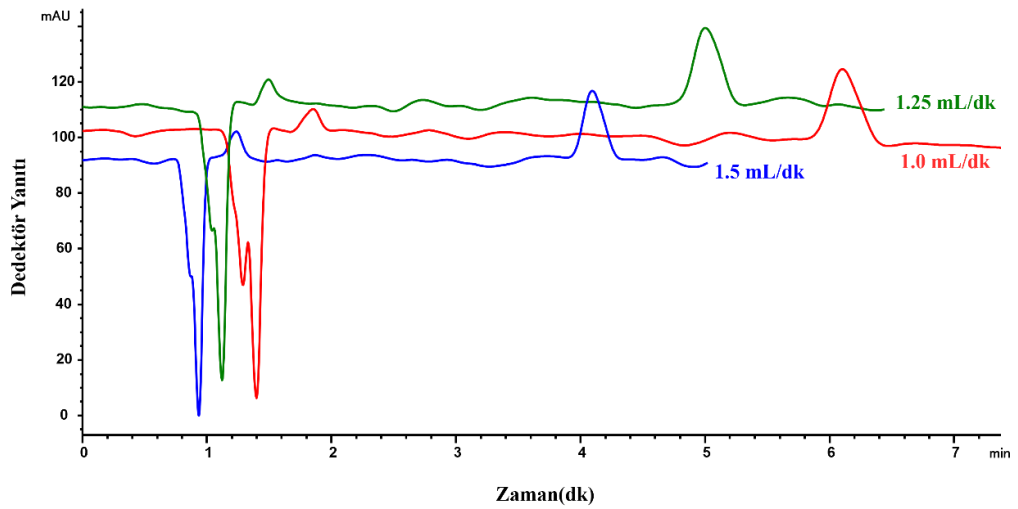
Seçilen hareketli fazın pH denemeleri kolon kararlılığının devam edebilmesi için yüksek asidik ve bazik koşullarda dayanıklılığı sebebiyle Kinetex EVO C18 serisi ile yapılmıştır. Aynı analitik koşullar altında yapılan denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Hareketli faz pH denemelerine ait kromatogramlar

3.1.3. Hareketli Faz Akış Hızı Optimizasyonu

Uygun kromatografik koşulun belirlenmesi amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları için hareketli faz sistemlerin hacimsel oranlarındaki değişiminin analitik standartların ayırımına olan etkisi incelenmiştir. Hareketli fazın hızı analitik dedektörden aldığı yanıtı doğrudan etkileyen bir parametredir. Flumetrinin analizine yönelik uygun kromatografik koşulun belirlenmesi amacıyla 1mL/dk, 1.25mL/dk ve 1.5mL/dk akış hızı denemeleri yapılmıştır. (Şekil 3.3).



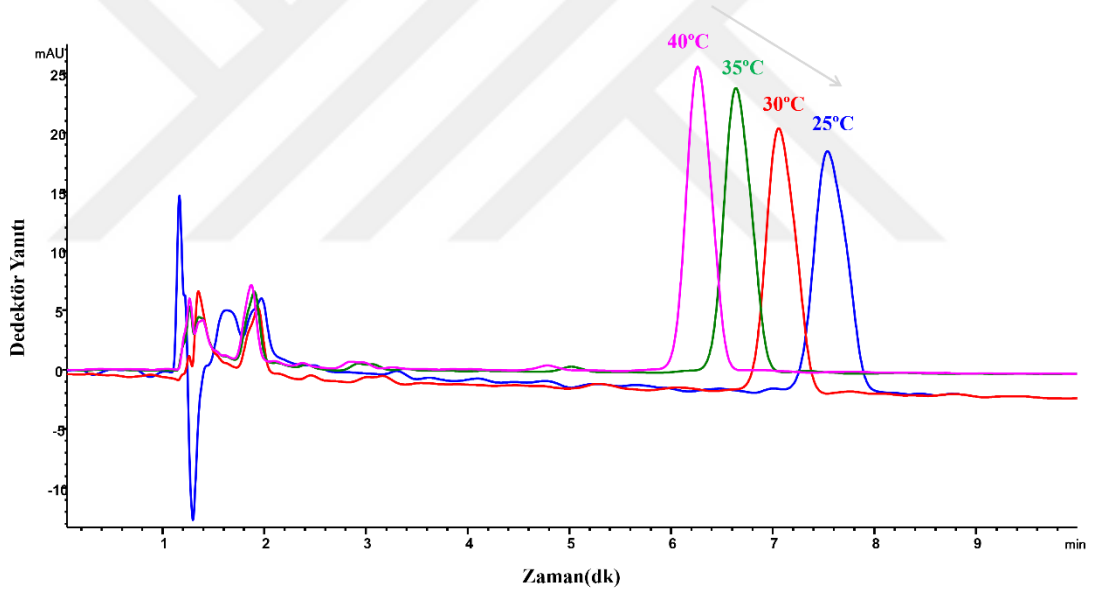
Şekil 3.3. Farklı hareketli faz bileşimleri ile yapılan analizlere ait kromatogramlar

3.1.4. HPLC Kolon Denemeleri

Farklı partikül boyutuna ve dolgu materyaline sahip 2 adet farklı sıvı kromatografik kolon incelenmiştir. Her iki kolon da core-shell teknolojisine sahiptir. Yapılan çalışmalarda EVO C18 serisinin yüksek asidik ve bazik koşullarda çalışma uyumluluğu farklı pH'lerde çalışma imkânı sağlamıştır. EVO C18 analitik kolon diğer kolonlara kıyasla hedef analitin matsiten ayırım gücünün en yüksek olduğu kolon olmuştur.

3.1.5. HPLC Kolon Sıcaklık Optimizasyonu

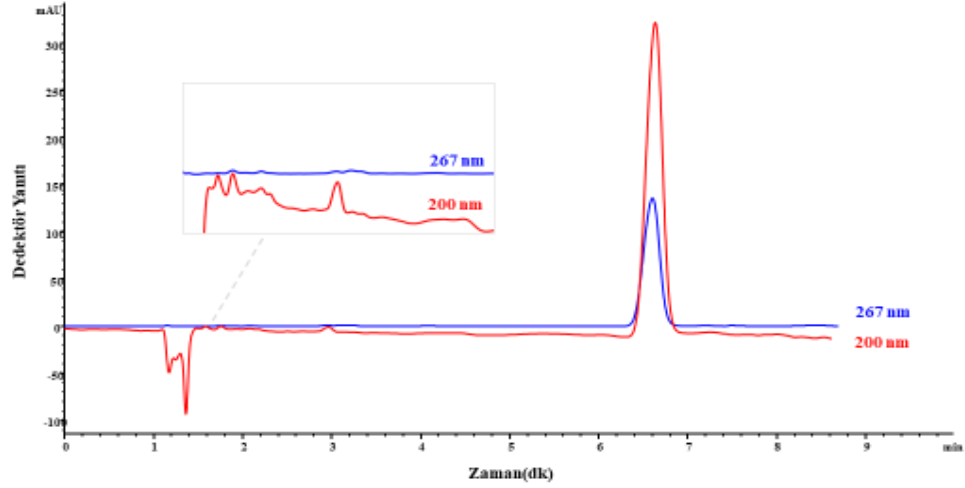
Geliştirilen HPLC yöntemi için uygun sıcaklık koşullarının bulunması amacıyla Çizelge 2.7'deki kromatografik koşullar kullanılmış olup 25°C, 30°C, 35°C, ve 40°C, değerleri için elde edilen kromatogramlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Kolon sıcaklık denemelerine ait kromatogramlar

3.1.6. UV Dalga Boyu Optimizasyonu

Analitlerin UV dedektörden alınan absorbansının dalga boyuna etkisi, moleküler yapı ve kimyasal bağların doğasına bağlıdır. Farklı dalga boylarının flumetrim analizine etkisini belirlemek amacıyla 200 nm ve 267 nm dalga boylarında denemeler yapılmıştır. Şekil 3.5'te verilmiştir.

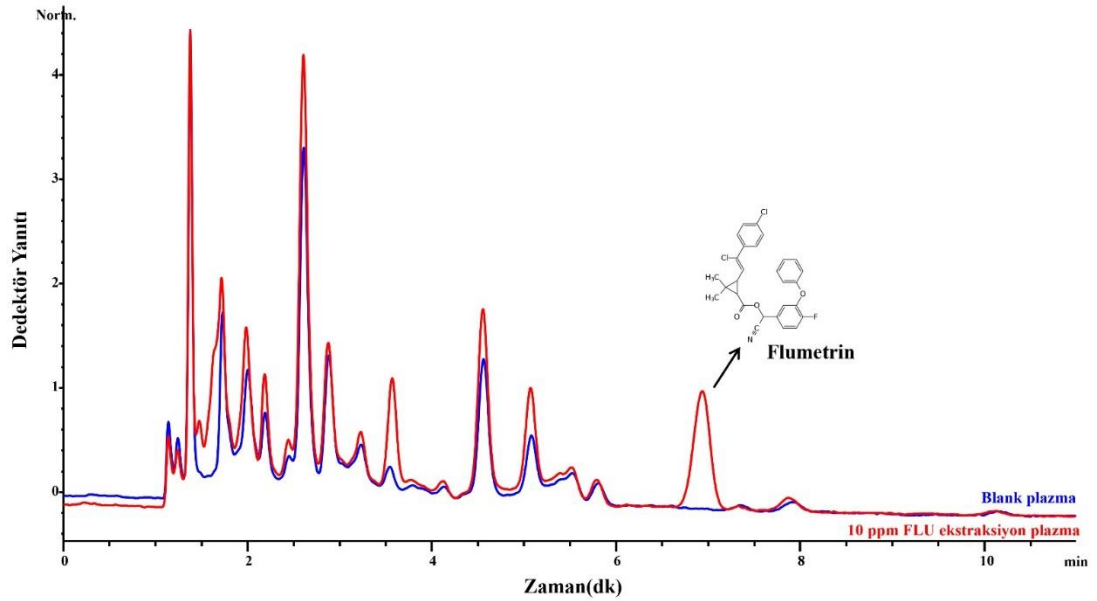


Şekil 3.5. UV Dalga Boyu Optimizasyonu sonrası elde edilen kromatogramlar

3.2. HPLC için Analitik Yöntem Validasyon Çalışmaları

3.2.1. Seçicilik

Geliştirilen ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan flumetrin için belirlenen kalite kontrol noktaları herhangi farmakolojik bir bileşen içermeyen ticari plazma ile karşılaştırılmıştır. Analitlerin alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim bulunmamaktadır (Şekil 3.6). Ticari plazmadan gelen bileşenler kendi içerisinde tekrar edilebilir.



3.2.2. Doğruluk

Üç farklı QC noktası 0,3 µg/mL, 3 µg/mL ve 9 µg/mL analitik standartları içeren konsantrasyonlarda hazırlanmış ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Bulunan sonuçlar Şekil 2.1'deki gibi hesaplanarak Çizelge 3.2'de raporlanmıştır.

3.2.3. Kesinlik

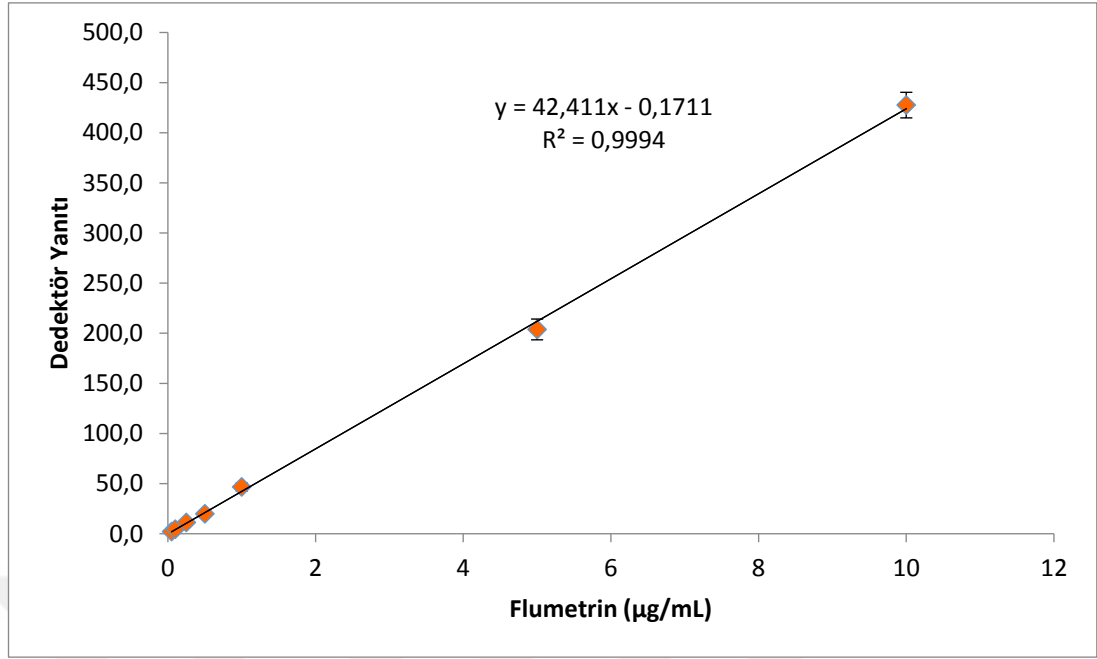
Kalite kontrol noktaları belirlenen konsantrasyonlarda en az 3 tekrarlı olacak şekilde Şekil 2.1'deki koşullarda analiz edilmiş olup kesinlik hesaplamaları için analiz sonuçları Şekil 2.2'de belirtilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. Flumetrin için kesinlik ve doğruluk verileri

	Kalite Kontrol Noktaları(µg/mL)	Gün içi			Günler arası		
		%BSS	% Geri kazanım	Bias	%BSS	% Geri kazanım	Bias
Flumetrin	0,3	3,07	110,20	-10,20	3,92	111,11	-11,11
	3	2,44	108,75	-8,75	2,96	110,29	-10,29
	9	1,63	107,49	-7,49	4,34	110,15	-10,15

3.2.4. Doğrusallık

Bu tez çalışmasında miktar tayini çalışmaları için HPLC-UV kullanılarak dedektör cevabına göre flumetrin için şekil 3.8'de 7 farklı derişim noktası ile kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Flumetrin için 0,05-10 µg/mL derişimleri arasında doğrusallık saptanmıştır.



Şekil 3.8. Flumetrin kalibrasyon grafiği

3.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Kalibrasyon eğrisi için belirlenen konsantrasyonların en az 3 tekrarlı analizi sonrasında elde edilen veriler ve sinyal gürültü oranına göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.3'te raporlanmıştır.

Çizelge 3.3. Flumetrin kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler

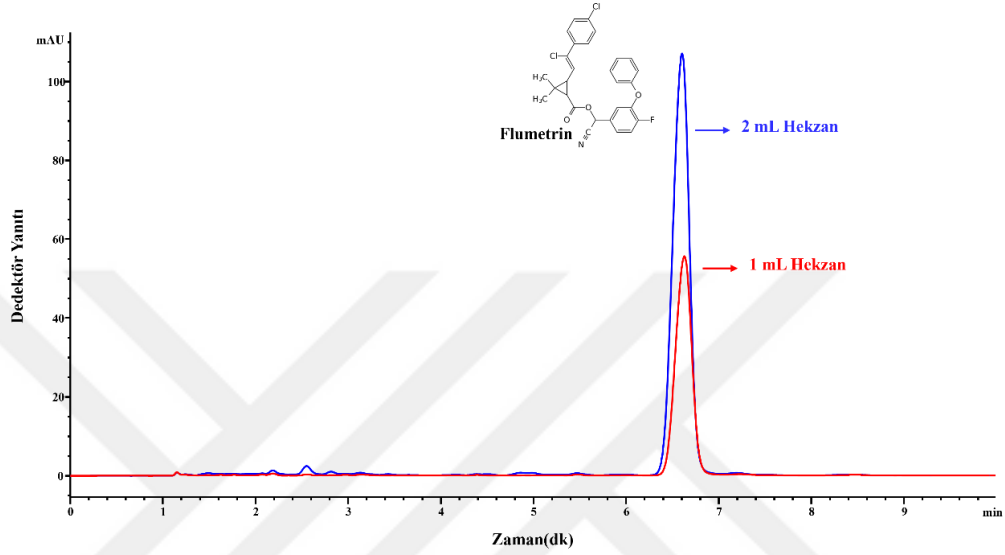
Parametreler	Flumetrin(n=5)
Doğrusallık (mg/mL)	0.05-10
Eğim (m)	41,411
Kesişim (n)	-0,1711
Belirleme katsayısı (R ²)	0,9994
LOD (µg/mL)	0,02
LOQ (µg/mL)	0,05

3.3. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon (LLE) Yöntem Parametrelerinin Optimizasyonu

Ekstraksiyon solventi olarak sırasıyla metil tert-bütül eter (MTBE), etil asetat ve n-hekzan denenmiştir. Ekstraksiyon solventinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi Şekil 3.9'da verilmiştir.

3.3.1. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu

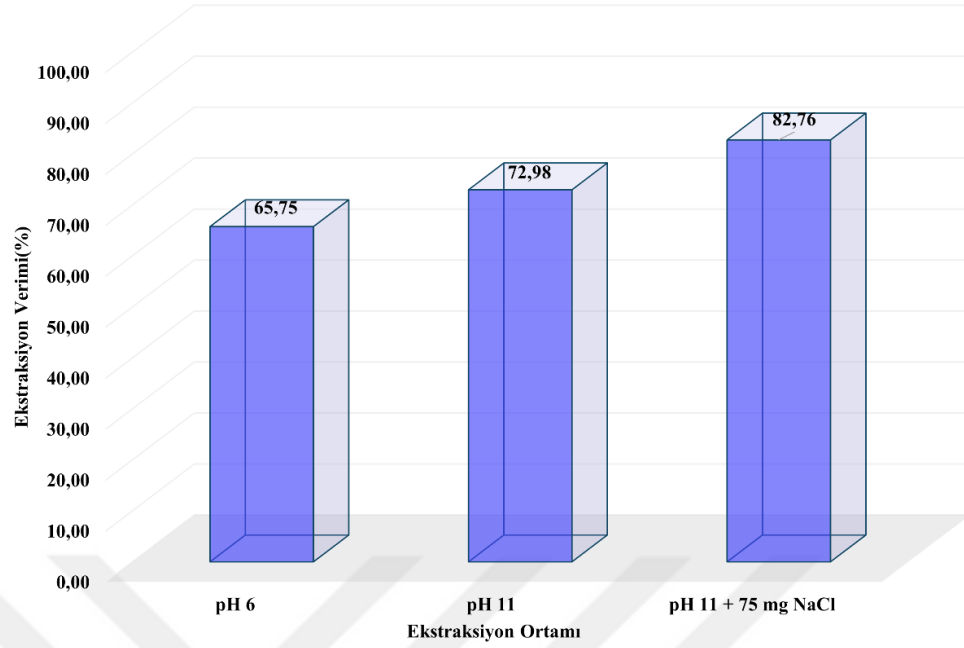
Ekstraksiyon solventi hekzan olarak seçildikten sonra hekzan hacminin optimizasyonu sırasıyla 1 mL, 2 mL olarak yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11. Ekstraksiyon Solvent Hacmi Optimizasyonu

3.3.2. Ekstraksiyon pH Optimizasyonu

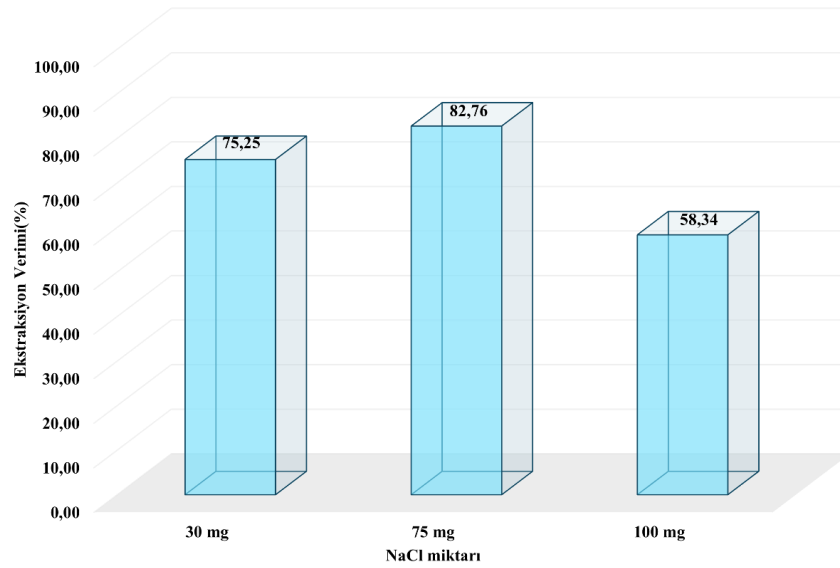
Flumetrinin sulu ortamda bazik özelliğe sahip olması nedeniyle ortamın bazik hale dönüştürmek hedeflenmektedir. Bazik ortam oluşturmak için 0.1 M NaOH kullanılarak bal örneğine 30µL eklenmiştir. pH 11 ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiş, yapılan optimizasyon sonrası elde edilen kromatogramlar Şekil 3.12’de verilmiştir



Şekil 3.12. Ekstraksiyon pH'sının ekstraksiyon verimine etkisi

3.3.3. İyonik Şiddet Optimizasyonu

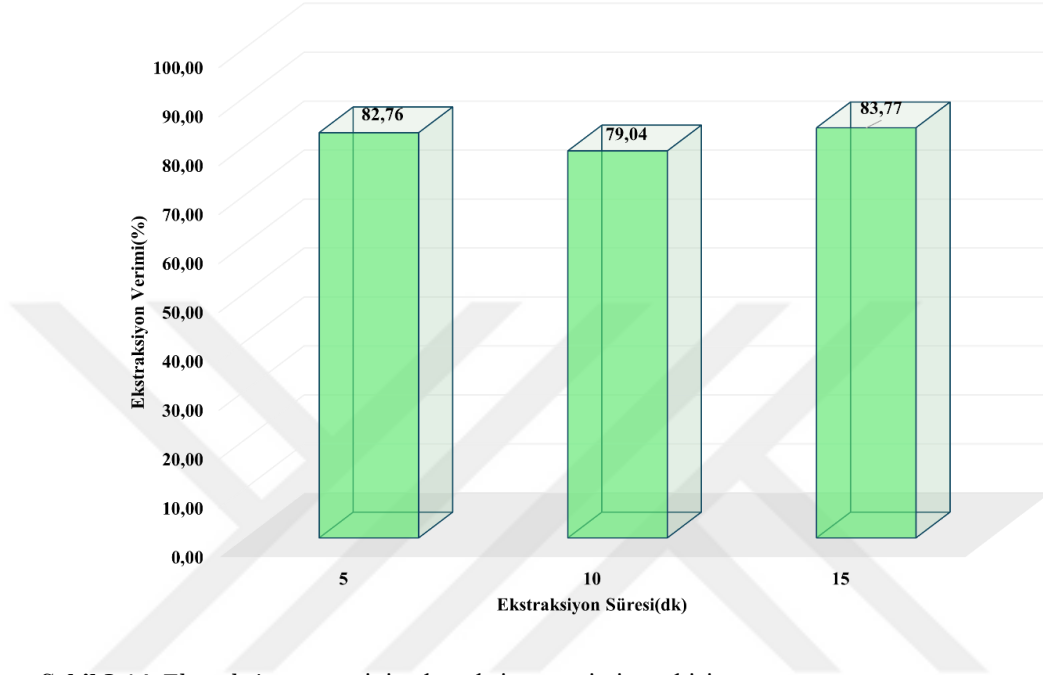
İyonik şiddetin ekstraksiyon verimine etkisinin belirlenmesi için farklı kütlelerde sırasıyla 30 mg, 75 mg ve 100 mg NaCl kullanılmıştır. Optimizasyon sonrası elde edilen kromatogramlar Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13. İyonik Şiddet Optimizasyonu

3.3.4. Ekstraksiyon Süresi

Ekstraksiyon süreleri 5, 10, 15 dk olarak üç farklı zaman dikkate alınarak çalışılmış ve ekstraksiyon sürelerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi Şekil 3.14'te verilmiştir.

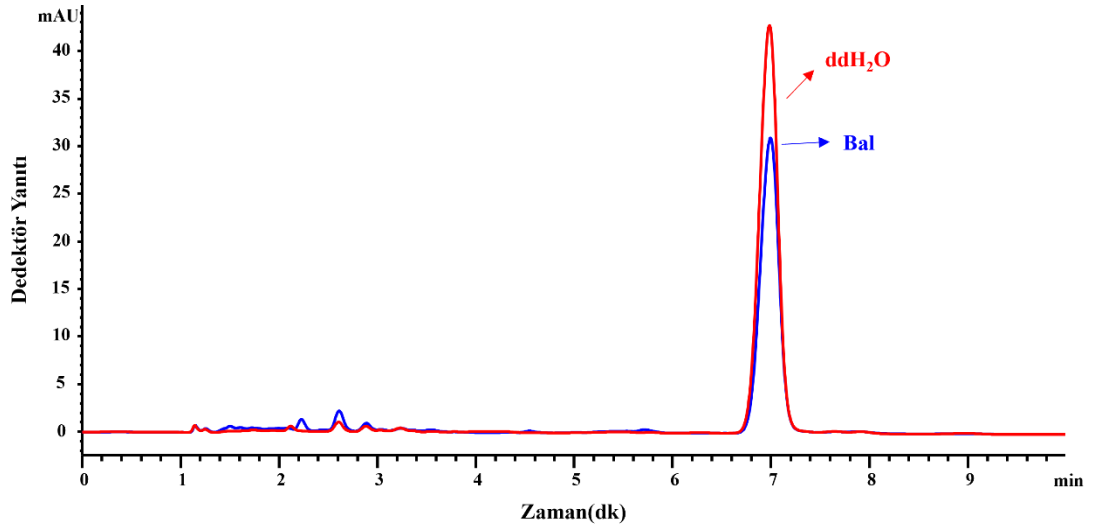


Şekil 3.14. Ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi

3.3.5. Matris Etkisi

Proses verimliliği ve matris etkileri analitik kimyada, özellikle numune hazırlama ve analizlerinde yakından bağlantılıdır. Proses verimliliği, bir analitik prosedürün bir numuneden hedef analiti ne kadar etkili bir şekilde çıkardığını ve ölçtüğünü ifade eder. Matris etkileri sinyalin azalmaya veya artmaya neden olabilir ve analitik yanıt etkileyebilen ölçümlerle sonuçlanabilir.

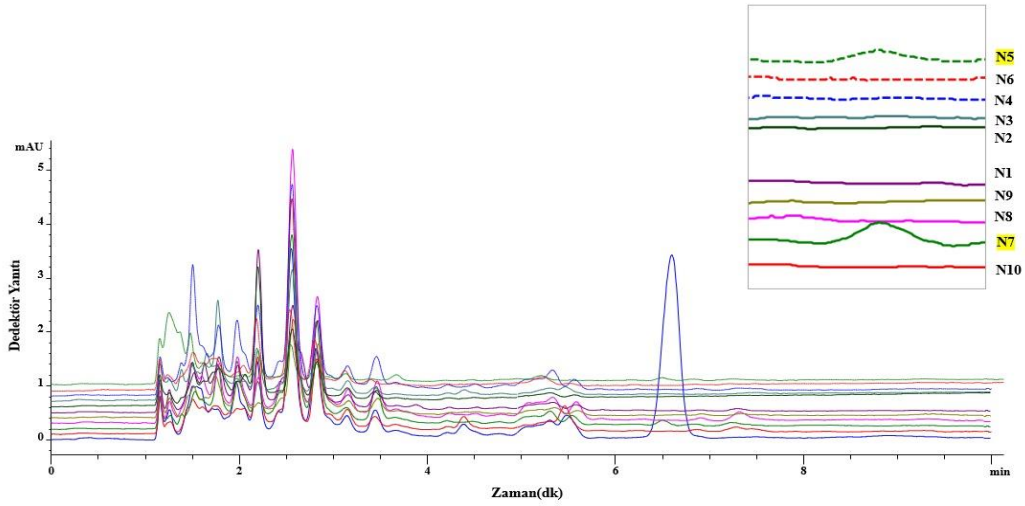
Şekil 3.15'te görüldüğü üzere bal matrisi flumetrin analitinin sinyalinde azalmaya neden olmaktadır. Ekstraksiyon verimleri kıyaslandığında en uygun ekstraksiyon parametreleri uygulanarak sudan %90,98 ve baldan %82,76 verimlilikte flumetrin elde edilmiştir. Yöntemin matris etkisi %12,15'tir. Proses verimliliği ise %94,91'dir.



Şekil 3.15. Bal ve sudan flumetrinin (1 mg/mL) ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar

3.4. Yerel Bal Üreticilerinden Elde Edilen Bal Numunelerinin Analizi Sonucu

Ülkemizin farklı bölgelerdeki yerel bal üreticilerinden elde edilen bal numunelerinde flumetrin analizi sonucu Şekil 3.16’da ve Çizelge 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.16. Bal örneklerinde flumetrin tayini için (mg/mL) ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.4. Bal örneklerinde yapılan flumetrin analizinden elde edilen veriler

Numune Alınan Şehir	Kod	Flumetrin Konsantrasyonu (µg/mL)
Ankara	N1	<LOD
Ardahan	N2	<LOD
Ardahan	N3	<LOD
Ardahan	N4	<LOD
Aydın	N5	LOD
Aydın	N6	<LOD
Hakkâri	N7	LOD
Hakkâri	N8	<LOD
Hakkâri	N9	<LOD
Hakkâri	N10	<LOD

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında flumetrin için miktar tayini yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin analitik validasyon çalışması ICH kılavuzuna göre tamamlanmıştır.

Flumetrin analizi için literatürde yapılan çalışmalarda miktar tayin ve safsızlık analizleri için yöntemler bulunmaktadır. Safsızlıkların varlığı düşük limitlerde analiz metotlarına gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları Bölüm 2.8’de detaylı olarak incelenmiştir. Belirlenen yöntemin validasyonu ise başarıyla tamamlanmış, sağlam doğru ve kararlı bir validasyon yöntemi olduğu, düşük düzeylerde analize imkan veren ve sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak düşük tayin limitlerine inilerek daha az çözücü harcanmıştır. Böylelikle ekstraksiyon sürecinde ön hazırlık aşamasının kolaylaştırılmış olması ve buna ilave olarak organik çözücü tüketiminin azaltılması toksisitesi yüksek bir ürünün mümkün olan en az düzeyde kullanımı ile green chemistry (yeşil kimya) pratiklerine imkân vererek çevre kirliliğinin azaltılmasına imkan sağlayan bir HPLC yönteminin gerçekleştirilmesi bakımından literatüre katkı sağlamaktadır.

Tez boyunca yeni nesil analitik kolonların flumetrin tayinine etkisinin belirlenmesi amacıyla 2 adet farklı kolon denemesi yapılmıştır. Kolon isimleri Çizelge 2.4’te verilmiştir. Kinetex EVO C18 geleneksel kolonlara göre asidik ve bazik geniş pH aralıklarında ve % 100 sulu çözeltilerle çalışma imkânı sağlaması yönüyle diğerlerinden ayrılmaktadır. Kinetex C18 serisi geleneksel gözenekli partiküllere kıyasla daha fazla verimlilik ve geliştirilmiş performans sağlamak üzere tasarlanmıştır. Analiz yöntemi geliştirme sırasında yeni nesil kolonlar denenmiş olup kolon sıcaklığı, hareketli faz sistemleri, hareketli faz pH ve akış hızı yöntem optimizasyonları yapılmıştır. Kinetex EVO C18 (150 mm x 4,6 mm id., 5 µm) küçük partikül boyutu ve keskin pik şekilleri (sivri ve dar) kolondan giriş çıkış hızının yüksek olması yani hızlı analiz olanağı sağlaması sebebiyle tercih edilerek yöntemine uygun olarak seçilmiştir.

Sıcaklık moleküllerin hareketine etki eden bir parametredir. Buna bağlı olarak flumetrin analizine yönelik sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla 25°C, 30°C, 35 °C ve 40°C ‘de denemeler yapılmıştır. Kolon sıcaklığı optimizasyon sonuçlarına bakıldığında sıcaklık arttıkça piklerin ayırma gücünün arttığı tespit edilmiştir. Kolon sıcaklığı arttıkça analiz süresinin kısalmakta olduğu da gözlemlenmiştir. Çünkü sıcaklık arttıkça

moleküllerin hareketleri de artmakta buna bağlı olarak kolondan çıkış hızı artmaktadır. Bu da hızlı bir analiz imkanı sağlamaktadır. Ayrıca sıcaklık artışına bağlı olarak piklerde yükseklik ve keskinlik olduğu için 40°C, yöntemine uygun seçilmiştir.

Hareketli fazın pH'sı analitlerin sabit faz ile etkileşimini ve ayırma gücünü etkileyebilmektedir. Bu nedenle flumetrin tayinine yönelik uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla öncelikle % 0,1 orto-fosforik asit kullanılarak pH 2,5 ve pH 6 noktaları seçilerek asidik koşullarda denemeler yapılmıştır. Daha sonra %0,5 asetik asit (pH 2,7) kullanılarak sulu fazdaki değişimin analize etkisi incelenmiştir. Organik faz çifti olarak asetonitril ve metanol kullanılmıştır. Hareketli faz pH'si üzerinde yapılan denemeler sonucunda Şekil 3.1'de görüldüğü gibi pH arttıkça ayırma gücünün arttığı ancak yapılan pH:6 ve pH:2,5 ile yapılan denemelerde analitik standartın alıkonma sürelerinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Hareketli faz çiftlerine ilave olarak herhangi bir iyonlaştırıcı tuz ilavesi yapılmamıştır. Ayrıca hareketli faz içerisinde uzun süreli tuz kullanımı kolon ömrünü azalttığı için tercih sebebi değildir.

İzokratik akış çalışmasında farklı kimyalardaki core-shell kolonlarda analitik standartların ayırma hakkında ön bilgi edinilmiştir. İzokratik analizler ile ayırma sağlandığı için gradiyent ayırma gerek duyulmamıştır. Bu nedenle farklı oranlarda izokratik akış denemeleri yapılmıştır. En uygun hareketli faz sistemi olarak % 0,5 asetik asit ve asetonitril 20:80 (h/h) seçilmiştir

Analitik yöntem validasyonu sırasında seçicilik, doğruluk, kesinlik, doğrusalılık, yöntemin LOD ve LOQ verileri ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Yöntemde flumetrin herhangi bir girişim olmadan analiz edilebilmektedir. Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi analitlerin gün içi ve günler arası olmak üzere yapılan analizler sonrası tüm kalite kontrol noktalarının %BSS'ı % 5'in altındadır. Yöntemin % geri kazanım, standart sapma (SS) değerleri ve diğer parametreler incelendiğinde yöntem validasyonu tamamlandığı ve doğru, kesin ve seçici bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Ekstraksiyon verimleri kıyaslandığında flumetrin için Şekil 3.6 'da verildiği gibi MTBE ile ekstraksiyonu sonucu % 48,37, etil asetat ile ekstraksiyonu sonucu ise % 59,42 ve n-hekzan ile ekstraksiyonu sonucu %65,75 dir. Yapılan optimizasyon sonrasında ekstraksiyon solventi hekzan seçilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde flumetrin balda herhangi bir endojen bileşik ile birleşmemekte ve herhangi bir girişimi bulunmadığı ve bu doğrultuda

yapılan çalışmalar neticesinde seçilen analitik yöntem plazma için de uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir.

Ekstraksiyon solventi olarak hekzan, etil asetat, metil tert bütül eter olmak üzere 3 adet farklı solvent ayrı ayrı denenmiştir. Kullanılan ekstraksiyon solvent hacminin ekstraksiyon verimine etkisinin belirlemek amacıyla 1 mL ve 2 mL hekzan kullanılmıştır. Yapılan solvent hacmi denemelerinde 2 mL 1 mL'ye oranla daha yüksek ekstraksiyon verimi sağladığı için ekstraksiyon solvent hacmi 2 mL olarak belirlenmiştir.

Ekstraksiyon koşullarına karar verildikten sonra ortamın bazik ve asidik koşulları için optimizasyonlar yapılmıştır. Flumetrinin sulu ortamda bazik özelliğe sahip olması nedeniyle ortamın bazik hale dönüştürmek hedeflenmektedir. Bazik ortam oluşturmak için 0,1 M NaOH kullanılarak bal örneğine 30µL eklenmiştir. Ortamının optimizasyon sonrası elde edilen kromatogramlar şekil 3.8'de verilmiştir.

Ayrıca bu tez çalışmasında ekstraksiyon süreleri 5, 10, 15 dk olarak üç farklı zaman dikkate alınarak çalışılmış, ancak, ekstraksiyon sürelerinin ekstraksiyon verimi üzerine anlamlı bir fark bulunmadığı şekil 3.9'da verilmiştir. Bu nedenle en kısa ve en hızlı analiz için ekstraksiyon süresi 5 dk. olarak tayin edilmiştir.

Geliştirilen LLE yöntemi kullanılarak LOQ 0,05 µg/mL, LOD 0,02 µg/mL bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırıldığında düşük dedeksiyon limitlerine ulaşması, HPLC kullanılarak yapılan çalışmalara göre geliştirilen yöntemin üstünlüğü belirlenmiştir.

Analitlerin UV dedektörden alınan absorbansının dalga boyuna etkisi, moleküler yapı ve kimyasal bağların doğasına bağlıdır. Analitler belirli dalga boylarında daha fazla veya daha az ışık absorpsiyonu yapabilirler. Bu özellik, moleküler yapıdaki çift bağların varlığı, aromatik halkaların varlığı, fonksiyonel grupların tipleri gibi faktörlere bağlıdır. Farklı dalga boylarının flumetrin analizine etkisini belirlemek amacıyla 200nm ve 267 nm dalga boylarında denemeler yapılmıştır. Analizin yapıldığı kromatografik koşullar çizelge 2.7 ve çizelge 2.8'de'de verilmiştir. Her iki dalga boyu için UV Dalga Boyu Optimizasyonlarına bakıldığında (şekil 3.5) 200nm'lik dalga boyunda ayırım gücü yüksek pik elde edilmesine rağmen safsızlık oranının düşük olması ve düşük ng'larda yapılacak analizlerde safsızlığın düşük olmasına bağlı ayırt edici bir pikin gözlemlenemeyeceği,

sinyal/gürültü oranının 267 nm'ye oranla fazla olması sebebiyle tercih sebebi değildir. Çünkü analizde etkili bir ayırma ve minimum girişim nedeniyle 267 nm'lik bir dalga boyu tercih edilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bal arıları ekosistem için oldukça önemlidir. Yüksek sıcaklık gibi çevresel koşullardaki değişiklikler ve zirai ilaç kullanımındaki artışa bağlı olarak arılarda pek çok hastalık gelişmektedir. Bu arı hastalıkları ile mücadelede kullanılan akaristler oldukça sınırlıdır. Gezginci arıcıkla birlikte ülkemize giren ve neredeyse bütün kovanlara bulaşan Varroa enfestasyonu ciddi bir viral arı hastalığıdır. Bu arı zararlısı ile yapılan mücadelede flumetrin kontrolsüz kullanılmaktadır.

Flumetrin lipofilik özelliğinden dolayı arı ve arı ürünlerinde birikmektedir. Bu bilinçsiz mücadele sonucunda hem arılarda hem de arı ürünlerinde toksisiteye neden olmaktadır. Kontrolsüz kullanım arılarda genetik bozukluklara, popülasyonlarında azalmaya, insanlarda ise; hafif cilt tahrişinden doğum kusurlarına, tümörlere, genetik değişikliklere, kan ve sinir bozukluklarına, endokrin bozulmasına ve hatta komaya veya ölüme kadar sebebiyet verebilir. Bu toksisitenin önüne geçilmesi için flumetrinin kantitatif olarak belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında flumetrin analizi için seçici, hassas, doğru ve kesin bir kromatografik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Kullanılan sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin literatüre oranla daha düşük maliyetli ve daha hassas tayin limitlerine ulaşabilmesi için yeni nesil sıvı kromatografi sabit fazlarından faydalanılmıştır.

Daha düşük tayin limitlerine inmek için sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak daha az çözücü harcanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında geliştirilmiş olan kromatografik tekniklerin validasyon çalışmaları yapılarak uluslararası geçerlilikleri de gösterilmiştir.

Flumetrin analizine ait literatür bilgisi sınırlıdır. Bu sebeple miktar tayini için HPLC yöntemi kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilmiş olan bu yöntem; hassas, doğru, sağlam ve kararlı bir validasyon yöntemi olup bu anlamda literatüre de katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P., Fernandez, M.C., Martinez M.A., Fernandez-Cruz M.L., 1995, Effects of flumethrin on hepatic drug-metabolizing enzymes and antipyrine disposition in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 132, 14-8. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1081>
- Altıkat A., vd. 'Türkiye'de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri' Atatürk Üniv. Ziraat Fak.Derg. 40 (2), 87-92, 2009 ISSN : 1300 - 9036
- Al-Waili, N., et al., Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *ScientificWorldJournal*, 2012. 2012: p. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>.
- Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot A.T., Vale. J.A., 2005. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.*, 24 (2): 93-106. <https://doi.org/10.2165/00139709-200524020-00003>.
- Casida, J.E., 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.*, 34: 189-202. <https://doi.org/10.1289/ehp.8034189>
- Ceren Mutlu, Mustafa Erbaş, Sultan Arslan Tontul, 'Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri' *Akademik Gıda* 15(1) (2017) 75-83 <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.306074>
- Costa, L.G., 2015. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handb. Clin. Neurol.*, 131: 135-148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00009-3>
- CSA (Council on Scientific Affairs, American Medical Association), 1997. Educational and Informational Strategies to Reduce Pesticide Risks. *Preventive Medicine*, 26(2): 191- 200. <https://doi.org/10.1006/pmed.1996.0122>
- Daş, Y.K.K., Sezai, *TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN BALLARDA BAZI SENTETİK PIRETROID INSEKTİSİT KALINTILARININ İNCELENMESİ*. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergis, 2004.
- De Paoli, M. and Barbina M.T., 1992, Solid-phase extraction and gas chromatographic determination flumethrin residues in honey. *Pesticide science*, 34, 61-63. <https://doi.org/10.1002/ps.2780340109>
- Eser B. 'Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları' *Journal of Health Services and Education* 2018 <https://doi.org/10.26567/JOHSE.2018250150>
- EPA (Environmental Protection Agency), 2009. Types of Pesticides. Washington D.C., USA. (Online) <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm> (31 Aralık 2009).
- Ethem AKYOL , Ali KORKMAZ BAL ARISI (Apis mellifera) ZARARLISI Varroa destructor'un BİYOLOJİSİ Honeybee parasite, Varroa destructor Biology
- FAO, 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of Food and Agriculture* 2002. Rome, Italy.

- Gumustas m, ozkan s (2011). The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, **5(1)**: 21
<https://doi.org/10.2174/187406500115010001>
- Güntay O., ‘Sentetik Piretroidlere Genel Bakış’ Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2021
<https://doi.org/10.17097/ataunizfd.691417>
- Islam, A., Khalil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, A., Sulaiman, S.A., Gan, S.H., 2012. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12(1)**: 177.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-177>
- Kaneko, H. and Miyamoto. J., 2001, Pyrethroid Chemistry and Metabolism. *Handbook of Pesticide Toxicology: Principles and Agents* In: R. Krieger (ed.), 1263-1288. Academic press.
<https://doi.org/10.1016/B978-012426260-7/50061-6>
- Karabagias, I.K., Badeka, A.V., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G., 2014. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chemistry* **165**: 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.033>
- Lin, G. B., Lin, S. Q., & Ni, L. (2010). “Determination of bromopropylate, fluvalinate and flumethrin residues in honey by gas chromatography.” *Strait J. Prev. Med*, **16**, 13-16.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-297>
- Martin Kunc, Pavel Dobeš, Rachel Ward, Saetbyeol Lee, Radim Čegan, Silvie Dostálková, Kateřina Holušová, Jana Hurychová, Sara Eliáš, Eliška Pindáková, Eliška Čukanová, Jana Pročkalová, Marek Petřivalský, Jiří Daníhlík, Jaroslav Havlík, Roman Hobza, Kevin Kavanagh, Pavel Hyrš Omics-based analysis of honey bee (*Apis mellifera*) response to *Varroa* sp. parasitisation and associated factors reveals changes impairing winter bee generation
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103877>.
- Miller, G.T., 2002. *Living in the Environment* (12th Ed). Belmont: Wadsworth/Thomson Learning. ISBN 0-534-37697-5.
- Mishra, A., Dewangan, G., Mahajan, V., Mandal, T.K., 2012b, Effect of Flumethrin on Tissue Biochemistry Following Oral Administration in Wistar Albino Rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **3**, 191-200.
- Moniruzzaman, M., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R., Sulaiman, S., Gan, S., 2014. Assessment of gas chromatography time-of-flight accurate mass spectrometry for identification of volatile and semivolatile compounds in honey. *Talanta*, **129**: 505-515
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.019>
- Muhammad Jamal, Muhammad Asif Aziz, Muhammad Naeem, Zahid Iqbal, Azeem Khalid, Farva Siddique, Khalid Ali Khan, Hamed A. Ghramh, Detection of flumethrin acaricide residues from honey and beeswax using high performance liquid chromatography (HPLC) technique
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.035>

- Muyesaier Tudi, Huada Daniel Ruan, Li Wang, Jia Lyu, Ross Sadler, Des Connell, Cordia Chu, Dung Tri Phung. (2021) Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment nt J Environ Res Public Health, <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Nisbet, C., Güler, A., Yarım G.F., Cenesiz, S., Ardali, Y., 2013. Çevre ve flora kaynaklarının arı ürünlerinin mineral madde içerikleri ile ilişkisi. Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi, 38(4): 494-498.
- Özercan B., Özdem A. (2015). Kimyasal Mücadele. Tarımsal Araştırmalardan Bakış -2015/TEPGE. <https://doi.org/10.33724/zm.1120599>
- Özmen, N., Alkın, E., 2006. Balın antimikrobiyel özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Uludağ Arıcılık Dergisi 2006(4): 155-160.
- Patrícia Amaral Souza Tette a, Fabiano Aurélio da Silva Oliveira c, Elba Nathália Corrêa Pereira, Gilsara Silva, Maria Beatriz de Abreu Glória, Christian Fernandes Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.036>
- Perry, A.S., Yamamoto, I., Ishaaya I., Perry. R.Y., 1998. Insecticides in Agriculture and Environment Retrospects and Prospects. Springer, Berlin, 261 p.
- Schnitzerling, H. J., Nolan J., Hughes S. 1989, Toxicology and metabolism of isomers of flumethrin in larvae of pyrethroid-susceptible and resistant strains of the cattle tick Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol, 6, 47-54. <https://doi.org/10.1007/BF01193232>
- Scott, J.G., Matsumura. F., 1983. Evidence for two types of toxic actions of pyrethroids on susceptible and DDT-resistant german cockroaches. Pestic. Biochem. Physiol., 19 (2): 141-150. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(83\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(83)90133-5)
- Segneanu AE, Orbeci C, Lazau C, Sfirloaga P, Vlazan P, Bandas C, Grozescu I (2013). Methods validation. Web of science: 29-29.
- Smith, L.B., Kasai S., Scott. J.G., 2016. Pyrethroid resistance in Aedes aegypti and Aedes albopictus: Important mosquito vectors of human diseases. Pestic. Biochem. Physiol., 133: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>
- Soderlund, D.M., Bloomquist. J.R., 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annu. Rev. Entomol., 34 (1): 77-96. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.000453>
- Soderlund, D.M., 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Manag. Sci., 64 (6): 610-616. <https://doi.org/10.1002/ps.1574>
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology, 171:3–59. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00569-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00569-8)
- Soderlund, D.M., 2011. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch. Toxicol., 86 (2): 165-181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>

- Stanneck, D., Rass, J., Radeloff, I., Kruehwagen, E., Le Sueur, C., Hellmann, K., Krieger K., 2012b, Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto(R)) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasit Vectors*, 5, 66. . <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-66>
- Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I., Kassi, E., Karabournioti, S., Moutsatsou, P., 2014. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PloS One* 9(4): e94860. . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094860>
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz. S. (2010). Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26 (2): 154-169.
- Tutkun, E., *Arı Akarı (Varroa Destructor) Mücadelesinde Timol'ün Kullanılması*. Arıcılık Araştırma Dergisi, 2016. ISSN: 2146-2720
- Uygur, S.O.G., A. Onur, *BAL ARISI HASTALIK VE ZARARLILARI*. ULUDAĞ ARICILIK DERGİSİ, 2008
- Yu, S.J., 2014. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, 276 p. <http://dx.doi.org/10.1653/024.098.0344>
- West, T.F., 1959. The History of the African Pyrethrum Industry. *RSA Journal*, 107(5034):423-441
- Zhen Li, Heyan Yang, Longtao Yu, Chen Liu, Xiaobo Wu, The negative effect of flumethrin stress on honey bee (*Apis mellifera*) worker from larvae to adults <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105289>

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Nuray
Soyadı : KOÇAK
İletişim adresi ve telefonu :

II. Eğitimi:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Yüksek Lisans	Adli Kimya ve Adli Toksikoloji AD	Ankara Üniversitesi	2021-
Lisans	Kimya	Atatürk Üniversitesi	2003-2007

III. Ünvanları:

IV. Mesleki Deneyimleri:

Temmuz 2006-Eylül 2006 (İki Ay)
Stajyer, Lisans Türk Standartları Enstitüsü (TSE) (ANKARA)

2010-2012 (2 Yıl)
İzmir İl Emniyet Müdürlüğü (İZMİR)

2012-2016 (4 Yıl)
Diyarbakır İl Emniyet Müdürlüğü (DİYARBAKIR)

2016-2023 (7 Yıl)
Ankara Emniyet Müdürlüğü (ANKARA)

2023 Yılı itibariyle
Hakkari İl Emniyet Müdürlüğü (HAKKARİ)