



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ANKARA'DA SATIŞA SUNULAN BALLARDA BAZI
NEONİKOTİNOİDLERİN LC-MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI

Halil ERGÜN

VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ

ANKARA
2023

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA'DA SATIŞA SUNULAN BALLARDA BAZI
NEONİKOTİNOİDLERİN LC-MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI**

Halil ERGÜN

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Ankara’da Satışa Sunulan Ballarda Bazı Neonikotinoidlerin LC-MS/MS ile Araştırılması**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Halil ERGÜN

Tarih: 23.01.2023

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında
Halil ERGÜN tarafından hazırlanan
“**Ankara’da Satışa Sunulan Ballarda Bazı Neonikotinoidlerin Lc-Ms/Ms ile
Araştırılması**” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23.01.2023

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof.Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bal	1
1.1.1. Dünyada ve Ülkemizde Bal	10
1.1.2. Bal Çeşitleri	11
1.1.3. İnsan Sağlığı ve Beslenmesi Bakımından Balın Önemi	13
1.1.4. Balda Kalıntı ve Yasal Düzenlemeler	15
1.2. Pestisitler	17
1.2.1. Pestisitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması	17
1.2.1.1. Dünya’da Pestisit Kullanımı	18
1.2.1.2. Türkiye’de Pestisit Kullanımı	18
1.2.2. Neonikotinoidler	19
1.2.2.1. Neonikotinoidlerin Yapısı ve Özellikleri	20
1.2.2.2. Neonikotinoidlerin Kullanımı	23
1.2.2.3. Neonikotinoidlerin Etki Mekanizması	24
1.2.2.4. Arılarda Neonikotinoidlerin Metabolizması	25
1.2.2.5. Neonikotinoidlerin Arılar Üzerine Etkisi	25
1.2.2.6. Neonikotinoid Kullanımının Yasaklanması	26
1.3. Likit Kromatografi Kütle Spektrometri/Kütle Spektrometri	27
1.4. Metot Validasyonu ve İlgili Validasyon Parametreleri	29
1.4.1. Doğrusallık	29

1.4.2. Gerçeklik	30
1.4.3. Kesinlik	30
1.4.4. Spesifiklik	32
1.4.5. Geri Kazanım	32
1.4.6. Tespit ve Ölçüm Limitleri	32
1.4.7. Karar Limiti	32
1.4.8. Tespit Limiti-Tayin Yeterliliği	33
1.4.9. Sağlamlık	34
1.4.10. Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması	34
1.5. Çalışmanın Hipotezi, Amacı ve Önemi	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Bal Numunelerinin Toplanması	37
2.2. Standart ve Kimyasal Maddeler	38
2.3. Standart Çalışma Çözeltileri	39
2.4. Araçlar ve Cihazlar	40
2.5. Likit Kromatografi ve Kütle Spektrometri Şartları	40
2.6. Özütleme	41
2.7. Metot Validasyon	42
2.7.1. Doğrusallık	42
2.7.2. Spesifiklik	42
2.7.3. Geri Kazanım	43
2.7.4. Kesinlik	43
2.7.5. LOD ve LOQ	44
2.7.6. $CC\alpha$ ve $CC\beta$	44
2.7.7. Sağlamlık	44
2.7.8. Ölçüm Belirsizliği	45
3. BULGULAR	46
3.1. Lineer Ölçüm Aralığı	51
3.2. Geri Alım ve Yüzde Geri Alım Sonuçları	55
3.3. Spesifiklik	56

3.4. Kesinlik	57
3.5. LOD ve LOQ	69
3.6. CC α ve CC β	69
3.7. Sağlamlık	69
3.8. Ölçüm Belirsizliği	70
3.9. Bal Numunelerinde Neonikotinoid Varlığının Belirlenmesi	71
4. TARTIŞMA	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
ÖZET	94
SUMMARY	95
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	104

ÖNSÖZ

Neonikotinoidler; günümüzde dünya da en yaygın kullanılan pestisit grubunu oluşturur ve son yıllardaki bilimsel çalışmalar ile, insan sağlığı üzerine potansiyel risk oluşturabileceği de bildirilmiştir. Bu sebeple, insanlar tarafından tüketilen gıda ürünlerinde neonikotinoidlerin miktarını belirlemek önemlidir. Bu çalışma ile; Ankara’da satışa sunulan süzme bal numunelerinde, sık kullanılan bazı neonikotinoidlerin (asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid ve tiyametoksam) analizi için; 2002/657/EC sayılı Avrupa Komisyonu Kararına göre uygun yöntemin oluşturulması, oluşturulan bu yöntem ile baldaki kalıntı düzeylerinin LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamda bilimsel yardım ve katkılarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ olmak üzere; Tez İzleme Komitesinde yer alan Sayın Prof.Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN ve Doç.Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ARAL’a; Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Öğretim Elemanları ve çalışan prersoneler; Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne ve Toksikoloji Laboratuvarında görevli tüm mesai arkadaşlarıma; hayatımda önemli bir yeri olan Prof.Dr. Behiç SERPEK’e ve burada adlarını sayamadığım, maddi ve manevi katkısını esirgemeyen herkese teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca; beni bu yaşa kadar getiren aileme ve tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen değerli eşim Naile SEÇİLMİŞ ERGÜN, kızım Elif Miray ERGÜN ve oğlum Gökalp Eray ERGÜN’e teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece, Celsius
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AB	Avrupa Birliği
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin Estreraz Enzimi
CCα	Karar Limiti
CCβ	Tayin Yeterliliği
CVMP	Veteriner İlaç Ürünleri Komitesi
dk	Dakika
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	International Conference on Harmonization
IS	İnternal Standart
LC-MS	Likit Kromatografi Kütle Spektrometri
LC-MS/MS	Likit Kromatografi Kütle Spektrometri/Kütle Spektrometri
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
MRL	Maksimum Rezidü Limiti
pH	Hidrojen iyonlaşmasının aktivitesi
ppb	Per part billion (milyarda bir)
ppm	Per part million (milyonda bir)
Rpm	Dakika da devir sayısı
RSD	Relatif Standart Sapma
TGK	Türk Gıda Kodeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Neonikotinoidlerin kimyasal yapısı	22
Şekil 1.2. LC-MS cihazının ana unsurları	28
Şekil 1.3. Tandem Kütle Spektrometrisi	29
Şekil 3.1. Asetamiprid yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	47
Şekil 3.2. Tiyametoksam yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	47
Şekil 3.3. İmidakloprid yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	47
Şekil 3.4. Tiyakloprid yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	48
Şekil 3.5. Klotiyanidin yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	48
Şekil 3.6. Trifenilfosfat (IS) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı	48
Şekil 3.7. Asetamiprid standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	49
Şekil 3.8. Tiyametoksam standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	49
Şekil 3.9. İmidakloprid standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	49
Şekil 3.10. Tiyakloprid 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	50
Şekil 3.11. Klotiyanidin standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	50
Şekil 3.12. Trifenilfosfat (IS) 100 ppb LC-MS/MS kromatogram görüntüsü	50
Şekil 3.13. A) 1.000.000x'de analitlerin 1 MRL baldaki kromatogram görüntüsü. B) 100.0x'de analitlerin 1 MRL bal daki kromatogram görüntüsü	51
Şekil 3.14. Asetamiprid kalibrasyon doğrusu	53
Şekil 3.15. İmidakloprid kalibrasyon doğrusu	53
Şekil 3.16. Klotiyanodin kalibrasyon doğrusu	54
Şekil 3.17. Tiyametoksam kalibrasyon doğrusu	54
Şekil 3.18. Tiyakloprid kalibrasyon doğrusu	54
Şekil 3.19. Çiçek Balı ait kromatogram görüntüsü	71
Şekil 3.20. Çam Balı ait kromatogram görüntüsü	72
Şekil 3.21. Kestane Balı ait kromatogram görüntüsü	72

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Türk Gıda Kodeksine göre balların genel özellikleri	7
Çizelge 1.2. Dünya da arıcılık verileri	10
Çizelge 1.3. Türkiye de arıcılık verileri	11
Çizelge 1.4. Balın içermiş olduğu besin değerleri	14
Çizelge 1.5. Neonikotinoidlerin balda maksimum rezidü limitleri	16
Çizelge 1.6. Türkiye de tarımsal ilaç kullanımı	19
Çizelge 1.7. Neonikotinoidlerin fiziksel ve kimyasal parametreleri	22
Çizelge 1.8. Neonikotinoidlerin topraktaki yarı ömrü	23
Çizelge 2.1. Toplanan bal numuneleri	37
Çizelge 2.2. Kullanılan standartlar, kimyasallar ve satın alınan firmalar	38
Çizelge 2.3. Kullanılan cihazlar ve araçlar	40
Çizelge 2.4. 10 gram bal örneğine katılan standart miktarlar	42
Çizelge 3.1. Neonikotinoidlerin MRM değerleri	46
Çizelge 3.2. Kalibrasyon bilgileri/ Linearite bilgileri	52
Çizelge 3.3. Neonikotinoidlerin CVkritik değerleri	56
Çizelge 3.4. Asetamiprid 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	57
Çizelge 3.5. Asetamiprid 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	58
Çizelge 3.6. Asetamiprid 7.5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	58
Çizelge 3.7. İmidakloprid 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	59
Çizelge 3.8. İmidakloprid 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	60
Çizelge 3.9. İmidakloprid 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	60
Çizelge 3.10. Klotiyanidin 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	62

Çizelge 3.11. Klotiyanidin 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	62
Çizelge 3.12. Klotiyanidin 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	63
Çizelge 3.13. Tiyaetoksam 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	64
Çizelge 3.14. Tiyaetoksam 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	64
Çizelge 3.15. Tiyaetoksam 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	65
Çizelge 3.16. Tiyaklopid 10 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	66
Çizelge 3.17. Tiyaklopid 20 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	67
Çizelge 3.18. Tiyaklopid 30 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı	67
Çizelge 3.19. Analitlerin CCAİfa (CC α) ve CCBeta (CC β) değerleri	69
Çizelge 3.20. Asetamiprid 'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	70
Çizelge 3.21. İmidaklopid'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	70
Çizelge 3.22. Klotiyanidin'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	70
Çizelge 3.23. Tiyaetoksam'ın ölçüm belirsizliği hesaplamaları	70
Çizelge 3.24. Tiyaklopid'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları	71
Çizelge 3.25. İmidaklopid 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları	73
Çizelge 3.26. Asetamiprid 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları	74
Çizelge 3.27. Klotiyanidin 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları	75
Çizelge 3.28. Tiyaetoksam 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları	76
Çizelge 3.29. Tiyaklopid 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları	77

Çizelge 3.30. Neonikotinoidlerin doğruluk, standart sapma ve % cv değerleri	78
Çizelge 3.31. Neonikotinoidlerin tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik, ortalama geri alım, R (%) ort, RSDr (%), RSDR (%)	79
Çizelge 3.32. Anova tek etkene göre, tekrarlanabilirlik standart sapması (sr), gruplar arasındaki standart sapma (sb) ve tekrar üretilebilirlik standart sapması (sr) sonuçları	80
Çizelge 3.33. ISO 5725-2:2019 göre tekrarlanabilirlik sonuçları	81
Çizelge 3.34. Neonikotinoidlerin sağlamlık, LOD, LOQ ve spesifikklik değerleri	82
Çizelge 3.35. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları ve sonuçları	83

1. GİRİŞ

1.1. Bal

Bal, arılar tarafından işlenen doğal bir üründür ve dünya da çok eski bir geçmişe sahiptir. Bal, önemli bir gıda maddesi ve tedavi edici değerleri nedeniyle eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Bal, arılar tarafından farklı bitkilerin nektarlarından ve salgılardan toplanarak ürettiği ve peteklerinde biriktirdiği şifalı bir besin maddesidir. Arılar sahip olduğu invertaz enzimi sayesinde topladıkları nektarları sabit şekerlere dönüştürürler (Çubuk, 2008; Tuzen ve ark., 2007 ve Yücel ve Sultanoğlu, 2013).

2001/110/EC sayılı Avrupa Konseyi Direktifi'ne göre bal; arılar tarafından, bitki nektarı ile bitkinin canlı kısımlarının ürettiği salgılardan, bitki emen böcekler tarafından bitkinin canlı kısımlarında üretilen salgılarının ürettiği veya topladığı, kendilerine has maddelerle birleştirerek dönüştürdükleri, biriktirdikleri, kuruttukları, depoladıkları, peteklerde olgunlaştırdıkları ve olgunlaşması için peteklere bıraktıkları doğal tatlı madde olarak tanımlanır (Anonim, 2001).

Türk Gıda Kodeksi 2020/07 sayılı Bal Tebliği'ne göre bal, “bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının, bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle, birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı, doğası gereği kristalleşebilen doğal ürün” şeklinde tanımlanır (Bal Tebliği, 2020).

Türk Standartlarına göre ise bal, “bitkilerin çiçeklerinde veya diğer canlı kısımlarında bulunan nektar bezlerinden salgılanan nektarın ve bitki üzerinde yaşayan bazı böceklerin, bitkilerin canlı kısımlarından yararlanarak salgıladığı maddelerin, bal arıları tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine

depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir üründür” şeklinde tanımlanır (Anonim 2002).

Arılar tarafından üretilen bal, besleyici özelliğine sahip olmasının yanı sıra hem doğal hem de sağlıklı bir gıda maddesidir. Tatlandırıcı özelliğinin yanı sıra içermiş olduğu proteinler, enzimler, vitaminler ve mineraller bakımından zengin olan bal, eşi benzeri olmayan bu özelliğinden dolayı hem değerli bir besin maddesi hem de organoleptiktir. Bal, monofloral veya polifloral olabilir. Belirlenmiş bitki nektarı ve polen muhtevası daha önceden tanımlanmış oranlara sahip ise monofloral, tanımlanmamış farklı nektar ve polen karışımına sahip ise polifloraldır. Çevresel, coğrafi ve iklimsel koşullar nedeniyle balın polen içeriği ve bağıl nemi değişiklik gösterebilir. Bal beş kıtada üretilmekte olup, tüketimi ise kültürel sebeplere ve beslenme alışkanlıkları göre ülkeden ülkeye değişir (FAO, 2019).

İnsan sağlığını korumak, geliştirmek ve yaşam kalitesini artırmak için bedenın ihtiyaç duyulan temel bir besin ögesi ve enerji kaynağı olarak bal kullanılır. Bal, hastalıklara karşı ve sağlıklı fertlerin gelişmesinde ihtiva ettiğı mineraller, vitaminler ve enzimlerin yanı sıra; anti-mikrobiyal, anti-viral ve anti-paraziter özelliğe de sahiptir (TKDK, 2016).

Bal; şekerler (monosakkaritler ve oligosakkaritler), organik asitler, amino asitler, enzimler, hormonlar, flavanoidler, vitaminler, uçucu yağlar, steroller ve fosfolipitler gibi 300’den fazla farklı kimyasal gruptan bileşik içeren karmaşık bir matrikstir (Gawel ve ark., 2019).

Bal, genel olarak % 79’u farklı şekerlerden (%38 fruktoz, %31 glikoz, % 8 disakkaritler ve % 2 diğer şekerler), % 17’si ise sudan oluşur. Balın geriye kalan %4’lük kısmı ise daha çok enzimler, vitaminler, mineraller ve amino asitler gibi farklı maddelerden oluşur (FAO, 2019).

Balların biyokimyasal bileşimi, rengi ve aroması balın türüne bağılı olarak büyük ölçüde üretiminde yer alan çiçeklere, bölgesel ve iklim koşullarına göre değişir. Ayrıca

balın bileşimi işleme, saklama koşulları, paketlenme ve depolama sürelerinden de etkilenir. Bal, depolanma sırasında bileşimin de birçok değişikliğe uğrayan bir besindir. Bunlar genellikle fermantasyon, oskidasyon ve ısı işlem dahil olmak üzere farklı kimyasal reaksiyonlardır (Da Silva ve ark., 2016).

Baldaki nem içeriği, balın üretildiği bölge, iklim koşulu ve hasat zamanı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişir. Bal sıcak ve kuru bölgeler de üretiliyorsa nem içeriği % 16-19; yağışlı ve serin bölgelerde üretiliyorsa % 17-20 oranında değişir. Nem içeriği yüksek olan ballar da bazı mayalar (ozmofilik maya) yaşamını sürdürebilir ve bu mayalar balın bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Fermantasyon ve kristalizasyon bakımından balın nem içeriği önemli olan bir ölçüttür. Bal da bulunan glikoz, balda ki su oranı azaldıkça, bir molekül su elde ederek glikoz hidrat şekline dönüşür. Oluşan glikoz hidrat çökelti oluşturarak balın kristalleşmesini sağlamaktadır. Kristalize olmuş bal donuk bir görünüme sahiptir. 2020/07 sayılı Bal Tebliği'nde, salgı ve çiçek ballarındaki nem içeriği en fazla %20'ye kadar, püren ve funda balların da ise en fazla % 23'e kadar nem içerebileceği belirtilmiştir (Bal Tebliği, 2020 ve Doğan, 2014).

Kül içeriği, balda bulunan minerali değerlendiren bir kalite ölçüsüdür. Ayrıca, balların besin değerini değerlendirmek için de bir parametre olarak kullanılır. Balın elektriksel iletkenliği, balın kül ve asit içeriği, iyonlar, organik asitler ve proteinlerin varlığıyla yakından ilişkilidir. Elektriksel iletkenlik, balın üretildiği bitkinin orijininin belirlenmesinin yanı sıra, çiçek ve salgı ballarının ayırımında da kullanan bir parametredir. Salgı ballarında elektriksel iletkenlik, çiçek ballarına nazaran daha yüksektir. Elektriksel iletkenlik, hem balın asitliği hem de kül içeriği ile doğru orantılıdır (Da Silva ve ark., 2016; Yıldız ve ark., 2016 ve Yücel ve ark., 2013).

Balda bulunan şekerlerin % 75'i monosakkaritler, %10-15'i disakkaritler ve az miktarı da diğer şekerlerden oluşur. Balda mevcut şekerler, viskozite, enerji değeri, higroskopiklik ve granülasyon gibi özelliklerden mesuldur. Bal arılarının doğal besin kaynağı olan karbonhidratlar, genellikle enerji üretiminde kullanılır (Seraglio ve ark., 2021).

Balın en büyük ikinci bileşeni sudur. Bu içerik balın botanik kökenine, kovanda oluşan olgunluk düzeyine, işleme tekniklerine ve saklama koşullarına bağlı olarak 15 ile 20 g 100 g⁻¹ arasında değişebilir (Yücel ve ark., 2013).

Balın protein içeriği balın türüne göre değişir. Baldaki proteinler ve amino asitlerin ana kaynağı polendir. Ancak, bal arılarının tükürük bezleri ve farenksinin sıvıları ile nektar salgıları da dahil olmak üzere hem hayvansal hem de bitkisel kaynaklardan da elde edilir. Amino asitler balın % 1'ini oluşturur. Balda ve polende en çok bulunan amino asit, prolindir. Prolinin birlikte balda ayrıca, glutamik asit, glutamin, aspartik asit, alanin, histidin, fenilalanin, trozin gibi amino asitler de bulunur. Bal arıları, topladıkları nektarları bala dönüştürmesi sırasında prolini tükürük salgılarından sağlar. Baldaki prolin, tüm amino asidin % 50-85'ini oluşturur (Da Silva ve ark., 2016 ve Nikhat ve ark., 2021).

Balın ihtiva ettiği proteinlerin az bir kısmı α - ve β - glukosidaz, invertaz, glukoz oksidaz, diastaz, asit fosfataz ve katalaz gibi enzimler oluşturur. Diastaz, α - ve β -amilazları içeren bir grup amilolitik enzimdir. Balda bulunan diğer bir enzim ise glikoz oksidazdır. Glikozu, glikonik aside hidrolize olan δ -glukononlaktone dönüştür. Glikoz oksidaz, ayrıca bakterisidal etkiye sahip hidrojen peroksit üretir (Nikhat ve ark., 2021 ve Seraglio ve ark., 2021).

Balın içerdiği mineral madde miktarı % 0,1- %1 arasındadır. Balın içeriğin de en fazla bulunan metal potasyumdur. Ayrıca sülfür, klor, kalsiyum, sodyum fosfor ve magnezyum gibi metallerin yanı sıra az miktarda bakır, demir, manganez ve çinko da içerir. Balın mineral madde içeriği, balda bulunan bitkinin, büyüdüğü su ve toprak, polen ve nektar içeriğine bağlı olarak değişir (Alqarni ve ark., 2012 ve Yücel ve ark., 2013).

Balların pH değeri, içermiş olduğu organik asitlere bağlı olarak 3,5 ile 5,5 arasında değişir. Balın asitliği; özellikle balı oluşturan bileşiklerin % 0,5'den daha az miktarını meydana getiren organik asitlerin yanı sıra içermiş olduğu fosfat, glikonik asit ve klorür gibi organik olmayan iyonların bulunmasına bağlıdır. Çiçek ballarının

içermiş olduğu asitlik düzeyi, salgı balı olan çam balına göre daha yüksektir (Karadal ve ark., 2012 ve Yıldız ve ark., 2016).

Hidroksimetil furfural (HMF) ve diastaz sayısı, uzun süredir balın kalitesini belirlemek için kullanılan kimyasal kalite ölçüleridir. HMF düzeyi balın bozulmasının göstergesi olarak sunulur. Bal herhangibi bir ısı kaynağı ile ısıtıldığında veya tüketimden önce uzun süre depolandığında, monosakkaritlerin ayrışması veya bir çeşit esmerleşme (Maillard) reaksiyonu oluşur. Uygulanan ısı işlem düzeyine veya depolanma süresi uzamasına bağlı olarak, HMF oranı da büyük ölçüde artar. Ayrıca baldaki şeker profili, pH, organik asit varlığı, nem içeriği ve floral kaynağa bağlı diğer faktörler de HMF seviyesini etkileyebilir. HMF oranı yalnızca fazla ısınma veya uygun olmayan saklama koşullarının bir göstergesidir. Balın içeriğinde diastaz (α - ve β -amilazlar) enzimleri bulunur. Diastaz sayısı; 38-40 °C’de, amilaz enzimlerin 100 gram balda, 60 dakika içerisinde parçalamış oldukları nişasta düzeyini gösterir. HMF’ye benzer şekilde, diastatik aktivite, sıcaklık artışının ve depolanma süresinin uzunluğun bir göstergesi olarak kabul edilir. Çünkü balların depolanma sırasında veya ürün 60 °C’nin üzerinde ısıya maruz kaldığında diastatik aktivite azalır (Ahmed ve ark., 2013 ve Yücel ve ark., 2013).

Bal, özellikle polenden gelen B vitamini kompleksi (B1, B2, B3, B5, B6, B8 ve B9) ve vitamin C içerir. Balda bulunan bu vitaminler balın düşük pH’sı nedeniyle korunur. C vitamini bal türlerinin hepsinde bulunur ve esas olarak antioksidan etkisi ile değerlendirilir (Bonté ve ark., 2013).

Fenolik bileşikler, temel kimyasal yapılarına göre farklı sınıflara ayrılır. Bunlar, flavonoidler (flovonlar, flovanoller ve flavanonlar gibi) ve flavonid (fenolik asit) olmayanlar şeklinde ikiye ayrılır. Bu bileşikler yapılarında bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip aromatik bir halkaya sahiptir. Balın temel fonksiyonel bileşenleri flavonoidlerdir. Flavonoidler, balın antioksidan etkisine mühim ölçüde katkıda bulunmasının yanı sıra insan sağlığı için de faydalıdır (Andersen ve ark., 2006 ve Alvarez-Suarez ve ark., 2012).

Renk, balın en çekici özelliğidir. Balın rengi balın ticarileştirilmesi için önem taşımaktadır. Tüketicilerin balı kabul etmesi ve tercihi için önemli bir kalite parametresidir. Balın rengi açık tonlardan başlayarak koyu kehribar tonlarına kadar değişir. Renk, en çok değişen parametrelerden biridir. Balın üretildiği botanik kökeninin yanı sıra, kül içeriğine, balın kovanda kaldığı sıcaklığa ve depolama süresine bağlı olarak balın renginde değişiklikler olabilir (Gámbaro, 2007).

Türk Gıda Kodeksine göre balların genel özellikleri Çizelge 1.1.'de verilmiştir.



Çizelge 1.1. Türk Gıda Kodeksine göre balların genel özellikleri (Bal Tebliği, 2020).

Bileşim ögesi	Çiçek balı	Salgı balı	Çiçek ve Salgı balı karışımı	Fırıncılık balı
Nem (en yüksek)	% 20 % 23 Püren (<i>Calluna</i>) ballarında	% 20	% 20	% 23 % 25 Püren (<i>Calluna</i>) orjinli fırıncılık ballarında
Sakkaroz (en yüksek)	5 g/100g 10 g/100g (<i>Robinapsedoacacia-</i> Yalancı akasya, <i>Medicago sativa-</i> adi yonca, çiçek balı- <i>Banksia</i> <i>meziesii</i> , <i>Hedysarum</i> -tatlı yonca, <i>Eucalyptus camadulensis</i> -kırmızı okaliptüs, <i>Eucryphia lucida</i> - mesin ağacı, <i>Eucyrphia milliganii</i> - narenciye ballarında) 15 g/100g (<i>Lavandula spp.</i> , Lavanta çiçeği ve <i>Boraga officinalis</i> ballarında)	5 g/100g	5 g/100g	5 g/100g
Fruktoz +Glukoz (en düşük)	100 g'da 60 gram	100 g'da 45 gram	100 g'da 45 gram	-
Fruktoz / Glukoz	0,9 – 1,4 arasında, 1,0 – 1,85 (<i>Castanea sativa</i> , Kestane) 1,2 – 1,85 (<i>Robinia Pseudoacacia</i> , Akasya) 1,0 – 1,65 (<i>Thymus spp</i> , Kekik)	1,0 – 1,4 arasında,	1,0 – 1,4 arasında, 1,0 – 1,4 arasında,	-

Çizelge 1.1. Devam. Türk Gıda Kodeksine göre balların genel özellikleri (Bal Tebliği, 2020).

Bileşim ögesi	Çiçek balı	Salgı balı	Çiçek ve Salgı balı karışımı	Fırıncılık balı
Suda çözünmeyen madde (en yüksek)*	0,1 g/100g	0,1 g/100g	0,1 g/100g	0,1 g/100g
Serbest asitlik (en yüksek)	50 meq/kg	50 meq/kg	50 meq/kg	80 meq/kg
Elektrik iletkenliği	En yüksek 0,8 ms/cm (Kocayemis- <i>Arbutus unedo</i> , çan otu- <i>Erica</i> , okaliptüs, ıhlamur- <i>Tilia spp.</i> , süpürge çalı- <i>Calluna vulgaris</i> , okyanus mersini- <i>Leptospermum</i> ve çay ağacı- <i>Melaleuca spp'</i> den elde edilenler hariç olmak üzere) En düşük 0,8 mS/cm (Kestane balında)	En düşük 0,8 mS/cm	En yüksek 0,8 mS/cm En düşük 0,8 mS/cm (salgı balı ve kestane balı karışımlarında)	En yüksek 0,8 mS/cm
Diyastaz sayısı (en düşük)	8	8	8	-
3				
(Narenciye balı gibi yapısında doğal olarak az miktarda enzim bulunan ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan yüksek olmayan balda)				
HMF (en yüksek)**	40 mg/kg	40 mg/kg	40 mg/kg	-

Çizelge 1.1. Devam. Türk Gıda Kodeksine göre balların genel özelliklikleri (Bal Tebliği, 2020).

Bileşim ögesi	Çiçek balı	Salgı balı	Çiçek ve Salgı balı karışımı	Fırıncılık balı
Balda protein ve ham bal delta	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif
Cl3 değerleri arasındaki fark		Çam balında bu ölçüt aranmaz		
Balda protein ve ham bal delta	%7	%7	%7	%7
Cl3 değerlerinden hesaplanan				
C4 şekerleri oranı (en yüksek)		Çam balında bu ölçüt aranmaz		
Prolin miktarı (en düşük)	300 mg/kg	300 mg/kg	300 mg/kg	180 mg/kg
	180 mg/kg Kanola, narenciye, lavanta, ıhlamur, okaliptüs ballarında			
	120 mg/kg Biberiye, akasya ballarında			
	500 mg/kg Kestane ballarında			
Naftalin miktarı (en yüksek)***	10 ppb	10 ppb	10 ppb	10 ppb

* Pres ballarında suda çözünmeyen madde miktarı 0,5 g/100g'ı yüksek olamaz.

** Üretildiği bölge etiketinde belirtilmek kaydı ile tropikal iklim bölgeleri orjinli ballarda HMF miktarı en yüksek 80 mg/kg olmalıdır.

*** Balmumunda naftalin ölçüsü en fazla 10 ppb olabilir.

1.1.1. Dünyada ve Ülkemizde Bal

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2019 yılı dünya bal üretimi raporuna göre; Çin 444 bin tonluk üretim ile birinci sırada, Türkiye 109 bin tonluk üretim ile ikinci sırada ve 80 bin tonluk üretim ile de Kanada üçüncü sırada yer alır. Çin, dünyadaki bal üretiminin yaklaşık % 24'ünü karşılar. Avrupa Birliği (AB) ülkeleri ise bal üretiminde yaklaşık % 23'lük bir paya sahiptir. Kovan sayısı bakımından ele alındığında; ilk sırada Hindistan yer alırken, onu sırasıyla Çin ve Türkiye takip eder. Çizelge 1.2'de Dünyada arıcılık verilerinin yıllara göre değişimi verilmiştir (FAO, 2019 ve Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021).

Çizelge 1.2. Dünyada arıcılık verileri (1000 Ton) (FAO, 2019; Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021).

	2015	2016	2017	2018	2019	Değişim (%)
Bal Üretimi	1,877	1,926	1,926	1,882	1,853	-1,6
Bal mumu Üretimi	67	69	69	65	66	1,0
Verim (Kg/Kovan)	21,0	21,4	21,2	21,0	20,6	-2,2
Kovan Adeti (Bin)	89,228	90,133	90,971	89,557	90,116	0,6
İhracat	650	638	684	672	639	19,7
İthalat	658	644	712	690	677	1,6

Trande Map, dünya bal ticareti göstergelerine göre 2020 yılı bal ihracatında, 2019 yılına göre, % 9,6 artış ile Çin ilk sırada; Ukrayna % 45,1 ikinci sırada ve % 9,5 oranlarında artış ile Arjantin'de meydana gelmiştir. 2020 yılında küresel bal ihracatı 2019 yılına göre yaklaşık % 15,6 yükselerek 2,3 milyar dolar hacme ulaşmıştır. 2020 yılı bal ithalatında, 2019 yılına göre, ABD % 4,1 artış ile ilk sırada yer alırken, Almanya % 7,1 ile ikinci sırada ve Japonya ise % 10,2 ile üçüncü sırada yer almıştır. Küresel bal ithalatı 2020 yılında % 10,1'lik bir yükseliş ile 2,25 milyar dolarlık miktara ulaşmıştır (Trande Map, 2021).

Dünyada bal üretiminde ikinci sırada olan Türkiye, ihracatta ise yirmi ikinci sırada yer alır. Bal, petek ve süzme bal olarak iki şekilde ihracat edilir. Bal ihracatının yaklaşık %70'lik kısmı süzme bal olarak yapılır. 2020 yılı bal ihracatı, 2019 yılına göre % 8'den fazla artarak 6.001 ton olarak gerçekleşmiştir. Türkiyede bal üretimine bakıldığı zaman Ordu ili birinci, Adana ili ikinci ve Muğla ili ise üçüncü sırada yer alır. Bölgesel olarak bal üretimine bakıldığı zaman %22,5'lik payla Doğu Karadeniz Bölgesi birinci sırada yer alırken, Akdeniz Bölgesi %19,2'lik payla ikinci sırada bulunur (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Ülkemizdeki arıcılık verilerine ilişkin bilgiler Çizelge 1.3'de verilmiştir (TÜİK, 2021).

Çizelge 1.3. Türkiye'de arıcılık verileri (TÜİK, 2021).

	2016	2017	2018	2019	2020	Değişim (%)
Bal Üretim (Ton)	105,727	114,471	107,920	109,330	104,077	-4,8
Verim (Kg/Kovan)	13,4	14,3	13,3	13,5	12,7	-5,4
Kovan Adeti (Bin)	7 900	7 991	8 108	8 128	8 179	0,6
İşletme Adeti	84 047	83 210	81 830	80 675	82 862	2,7
İhracat (ton)	3 623	6 448	6 413	5 543	6 011	8,4
İthalat (ton)	1	0,3	22,3	31,5	16,2	-48,5

1.1.2. Bal Çeşitleri

Dünya da 300'den fazla keline has bir tada sahip veya başka bir özelliği ile öne çıkan monofloral (akasya balı, yonca balı, okaliptüs balı, portakal çiçeği balı, çam balı vb.) bal çeşidi bulunur (FAO, 2019).

Türkiye, coğrafi konumu, iklim koşulları ve yılın üç mevsiminin bal üretimine uygun olması gibi özellikleri nedeniyle bal üretimi ve çeşidi açısından dünyanın en zengin bölgelerindendir. Türkiye yaklaşık 10000 farklı bitki türü mevcudiyet ile

Avrupa'nın en varlıklı bitki florasına sahip ülkelerden olması yanı sıra, dünyada tespit edilmiş arıcılık için önem arz eden nektarlı bitki türlerinin ise yaklaşık % 75'ine sahiptir. Türkiye sahip olduğu bu özelliklerden dolayı hem monofloral hem de polifloral birçok nektar ve polen bitki türüne ev sahipliği yapar (Can ve ark., 2015 ve Toptancı, 2013).

2020/07 sayılı Bal Tebliği'ne göre Türk Gıda Kodeksi tarafından bal; bal çeşidi/kökeni ve üretim/pazara sunuluşuna göre sınıflandırmıştır. Kökenine göre ballar; bitki nektarlarından erişilen ballar (çiçek balı) ve bitkinin canlı bölümünden salgısından veya bitkinin canlı bölümü üzerinde yaşayan bitki emici böcek salgısından erişilen ballar (salgı balı) diye ikiye bölümlendirilir. İhlamur, kekik, yonca ve pamuk balı gibi ballar çiçek balları içerisinde yer alır. Çam, köknar, meşe, yaprak balı gibi olanlarsa salgı balı sınıfında yer alır. Üretim/pazara sunuluşlarına göre ise; petekli, doğal petekli, süzme, petekli süzme, kara kovan, sızma, filtre edilmiş ve pres balı şeklinde isimlendirilirler (Bal Tebliği, 2020 ve Ölmez, 2009).

Türkiye'de salgı balı olarak, çam balı üretilirken; çiçek balı olarak ise daha çok kestane, kekik, ihlamur, narenciye, orman gülü (deli bal), ayçiçeği ve pamuk balları üretilir. Bal ihracatında büyük bir orana sahip olan çam balı ve kestane balı üretiminin tamamı ormanlardan sağlanırken, yayla ve kekik ballarının önemli bir kısmı da ormanlardan elde edilir. Ülkemizde üretilen balların % 85'i orman ve ormana yakın alanlardan üretilmekte iken, geri kalan %15'lik kısım ise tarım alanlarından elde edilir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021b).

Çiçek balı, genel olarak çiçeklerin nektarı kullanılarak üretilen ballara verilen bir isimdir. Günlük yaşamda en çok tüketilen bal olmakla birlikte, dünyada üretilen balların da büyük bir kısmını oluşturur. Açık kehribar renge ve keskin tatlı bir haza sahiptir. Arının nektar topladığı çiçeğe göre tadı ve kalitesi değişir (Rahman ve ark., 2014).

Kestane balı, kestane ağaçlarının çiçeklenme dönemi olan Mayıs ve Haziran aylarında arıların bu ağaçların çiçeklerinin nektarlarından elde etmiş olduğu bir monofloral bal çeşitlidir. Kestane (*Castanea Sativa* Mill.) ağaçları, Orta ve Güney

Avrupa'nın yanı sıra, Akdeniz havzası çevresinde bol bulunur. Kestane çiçekleri, yaz başında bal arıları için en iyi nektar ve polen kaynaklarından biridir. Türkiye'nin kuzeyinde özellikle Karadeniz, Marmara ve Ege bölgesinde yetişir. Yoğun kahve rengine, acı, kestaneye has bir tadı ve aromasıyla kestane balı, çiçek ballarından önemli bir ölçüde farklıdır (Kolaylı ve ark., 2016).

2020/07 sayılı Bal Tebliği'nde, Türk Gıda Kodeksi, çam balını, "bazı çam ağaçları (*Pinus brutia*, *P. nigra*, *P. pinea*) üzerinde yaşayan *Marchalina hellenica* (koşnil)'in gelişim döneminde bu ağaçların karbonhidratça zengin tatlı öz suyundan oluşturduğu bal çiğinin, bal arıları tarafından toplanıp değişikliğe uğratarak ürettiği salgı balı" şeklinde tanımlamıştır. Çam balı, arıların çiçeklerden nektar toplayarak değil; halk arasında basra böceği/koşnil (*Marchalina hellenica*) olarak bilinen ve bazı çam türlerinin gövdesinde yaşamını sürdüren bir böceğin salgısını kullanarak üretmiş olduğu bir baldır. Çam balının üretilmesi için bu böceğe ihtiyaç vardır. Yalnızca kızılçam (*P. brutia*), karaçam (*P. nigra*) ve halep çamında (*P. halpeensis*) yaşayan bu böcek, çamın öz suyunu emerek beslenir. Beslenmesinden sonra artan öz suyu şekerli salgı halinde dışarıya atar. Basra böceği tarafından salgılanan bu sıvı arılar tarafından toplanarak bala dönüştürülür (Bal Tebliği, 2020 ve Çınar, 2010).

Dünyada çam balı sadece ülkemizde ve Yunanistan'da üretilir ve ülkemizdeki en önemli salgı balı türüdür. Türkiye çam balı üretiminde dünyada % 92 oran ile ilk sırada yer alırken, Yunanistan ise çam balı üretiminin % 8'ini karşılar. Muğla ilinde bulunan kızılçam ormanlarında ülkemizdeki çam balı üretimin yaklaşık % 80'i gerçekleşir (Arslan ve ark., 2021 ve Tananaki ve ark., 2007).

1.1.3. İnsan Sağlığı ve Beslenmesi Bakımından Balın Önemi

Eski çağlardan beri insanoğlu hayatını sürdürmek için beslenme ihtiyaçlarına gereksinim duyar. Bal, ilk çağlardan beri gıda ve tıbbi ürün olarak kullanılmaktadır. İnsanoğlu tarafından uzun süre önemli bir karbonhidrat kaynağı ve yaygın bir şekilde

kullanılan yegane tatlandırıcı olan bal, 1800’lerde endüstriyel şeker üretiminin başlamasına kadar bu özelliğini sürdürmüştür (Alvarez-Suarez ve ark., 2009).

Bal, içermiş olduğu makro ve mikro bileşiklerle önemli bir besin maddesidir. Bal, hızlı karbonhidrat emilimi nedeniyle, kolayca sindirilen ve vücudun enerji ihtiyacı için kullanılan, her yaştan insan için uygun bir gıda maddesidir. Bal içermiş olduğu karbonhidratların yanı sıra vitaminler, mineraller, enzimler ve antioksidanlar gibi maddeleri de içerir. Balın içermiş olduğu besin değerleri Çizelge 1.4’de verilmiştir. Bal sadece bir enerji kaynağı olarak değil, aynı zamanda anti-inflamatuvar, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-oksidan etkileri için de kullanılır (İlia ve ark., 2021).

Çizelge 1.4. Balın içermiş olduğu besin değerleri (100 g balda) (FAO, 2019).

Vitaminler (mg)	Mineraller (mg)	Enerji
Filokinon 0,025	Sodyum 1,6 – 17	Karbonhidrat 300 kcal.
Tiamin 0,01	Kalsiyum 3 – 31	Proteinler 0,5 g.
Riboflavin 0,01 – 0,02	Potasyum 40 – 3500	Yağlar 0 g.
Piridoksim 0,01 – 0,32	Magnezyum 0,7 – 13	
Niasin 0,10 – 0,20	Fosfor 2 - 15	
Pantotenik asit 0,02 – 0,11	Çinko 0,05 - 2	
Askorbik asit 2,2 – 2,5	Bakır 0,02 – 0,06	
	Demir 0,03 – 4	
	Manganez 0,02 – 2	
	Krom 0,01 – 0,3	
	Selenyum 0,002 – 0,01	

Bal, çok çeşitli etkilere sahip güçlü bir anti-mikrobiyal ajandır. Balın mikroorganizmalara karşı etkinliği, botanik kökenine, arının sağlığına ve işleme yöntemine bağlı olarak üretilen balın türüne göre değişir. Ozmolarite, hidrojen peroksit üretimi, düşük pH, fenolik asit seviyesi ve flovonoidler balın antibakteriyel aktivitesi için önemlidir. Bal, yüzeysel yaraların, yanıkların ve iltihaplanmanın tedavisinde kullanılmıştır. Antibiyotiklerle birlikte uygulandığında, sinerjik bir etkiye sahiptir. Balın tıbbi ortamlarda kullanılması, geleneksel tedavilere kıyasla doğrudan maliyetleri düşürerek daha az antibiyotik kullanımına, daha hızlı iyileşmeye ve daha az hastanede kalış süresi sağlayarak ekonomik faydalar sağladığı bildirilmiştir. Bal,

akut, kronik, travmatik, ameliyat sonrası yaraların yanı sıra ülser, yanık, göz hastalıkları, ağız mukozası sorunları ve nekrotik alanların tedavisinde de yaygın olarak kullanılır (Almasaudi, 2021).

Bir antioksidan kaynağı olan bal, gıdaların ısı ve metaller sonucu bozulan oksidasyonunu önlemede önemli bir rol oynar. Balın farklı *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dupliniensis*) türlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bal, kanserin farklı aşamaları (başlama, çoğalma ve ilerleme) üzerinde de etki eder (Cianciosi ve ark., 2018 ve Mutlu ve ark., 2017).

1.1.4. Balda Kalıntı ve Yasal Düzenlemeler

İnsan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri bilinen, günümüzde en önemli sorunlardan biri olan gıdadaki kalıntıların azaltılması için yasal düzenlemeler gün geçtikçe artmaktadır. Bu kapsamda Avrupa Birliği İlaç Değerlendirme ve Danışma Merkezi (EMA) kurulmuştur. EMA kuruluşunun bünyesinde bulunan Veteriner İlaç Ürünleri Komitesi (CVMP)'nce Maksimum Kalıntı Limitleri (MKL) tayin edilmiştir. Avrupa Birliği 2377/90 nolu yönetmelik gereğince, veteriner tıbbi ürünlerin kullanıma sunulmasına izin verilmeden önce toksikoloji çalışmaları ile maksimum kalıntı limitlerinin tayin edilmesini mecburi tutmuştur (Bağcı, 2019).

Ülkemizde 29899 sayılı Resmi Gazetede ve 25.11.2016 tarih ile yayınlanan Türk Gıda Kodeksi (TGK) Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Yönetmeliği ve 30000 sayılı Resmi Gazetede ve 07.03.2017 tarih ile yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'nde balda kalıntı bulunmayacağı belirtilmiştir (Resmi Gazete, 2017).

Arı ve bal ürünlerinin sağlıklı, doğal ve kirleticilerden arındırılmış bir imajı vardır. Ancak üretildiği yerlerin birçoğu farklı kaynaklar tarafından kirletilmiş çevredir. Pestisitler, günümüzde kirleticilerin en önemlisidir. Pestisitlerin yaygın

kullanımı ve çevreye direnci, bala bulaşma ihtimallerinin oldukça yüksek olmasına neden olur. Arı yetiştiriciliğinde doğrudan bir bulaş ihtimali yanında, çevre kaynaklı olarak doğrudan veya dolaylı bulaşlar da olabilir. Gıdalarda olabilecek pestisit kalıntısı, çeşitli halk sağlığı sorunlarına ve genetik mutasyonlar ile hücresel bozulmaya da yol açabilir (Shendy ve ark., 2016).

Pestisitlerin fazla miktarda kullanılması; tarımsal zararlı mikroorganizmaların zararını minimize etmek, verimliliği artırmak ve masrafların azaltılmasını sağlamak içindir. Pestisitlerin amaçları dışında yanlış ve sürekli kullanımına bağlı olarak toprak, hava, su ve bitkilerin kontaminasyona sebep olmakta kalmayıp, ayrıca faydalı canlıların zarar görmesine, böylelikle hem farklı zararlıların oluşması hem de kendilerine karşı direnç gelişmesine yol açar (Oliviera ve ark., 2016).

En önemli arı ürünü olan bal, arı kovanlarında uygulanan tedaviden veya tarım alanlarında kullanılan pestisitlerden kaynaklanan pestisit ve/veya antibiyotik kalıntıları ile kontamine olabilir. Avrupa Birliği (AB), tüketicilerin sağlığını korumak için balda, farklı neonikotinoidlerin maksimum rezidü limitlerini (MRL) belirlemiştir. Çizelge 1.5’de neonikotinoidlerin balda maksimum rezidü limitleri verilmiştir (Hau ve ark., 2019 ve Tanner ve ark., 2011).

Çizelge 1.5. Neonikotinoidlerin balda maksimum rezidü limitleri (MRL) (Hau ve ark., 2019 ve Tanner ve ark., 2011).

Neonikotinoid	Maksimum Rezidü Limitleri (MRL) (ng/g)
Asetamiprit	50
Klotiyanidin	50
Dinotefuran	10
İmidakloprit	50
Tiyakloprit	200
Tiyametoksam	50

1.2. Pestisitler

1.2.1. Pestisitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Pestisit kısaca pest (Haşarat) ismi verilen canlıları öldürmek için kullanılan genel bir terimdir (Kaya ve ark., 2014). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından pestisitler; *“Böcekler, kemirgenler, mantarlar ve istenmeyen bitkiler (yabani otlar) dâhil zararlı böcekleri öldürmek için kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Pestisitler, doğası gereği, insanlar dâhil diğer organizmalar için potansiyel olarak toksiktir ve güvenli bir şekilde kullanılmaları ve uygun şekilde atılmaları gerekir”* şeklinde tanımlanmıştır (WHO, 2019).

Pestisitler birkaç farklı şekilde sınıflandırılabilir. Bu bakımdan pestisitler kimyasal yapı ve kaynaklarına, etkidikleri parazit türlerine, etki hızına, uygulandıkları çevrede kalıcılıklarına, zehirliliklerine, etki şekillerine ve formülasyona göre sınıflandırılır (Daş ve ark., 2016).

Kimyasal yapı ve kaynaklarına göre pestisitler; sentetik organik maddeler (OK, OF, karbamatlar), inorganik maddeler (arsenik, kurşun), bitkisel maddeler ve sentetik türevleri (piretroidler), sinerjistler (piperonilbutoksit), mikrobiyal bileşenler (avermektinler), bitki ve böcek gelişim düzenleyicileri, fumigatlar (dazomet) olarak sınıflandırılır. Pestisitler hedef aldıkları canlı türüne göre; böceklere karşı kullanılan maddeler (insektisidler), kemiricilere karşı kullanılan maddeler (rodendisitler), bakterilere karşı kullanılan maddeler (bakterisitler), kenelere karşı kullanılan maddeler (mitisitler), larvalara karşı kullanılan maddeler (larvasitler), solucanlara karşı kullanılan maddeler (nematositler), örümceklere karşı kullanılan maddeler (akarisitler), salyangozlara karşı kullanılan maddeler (mollusitler), yabancı otlara karşı kullanılan maddeler (herbisitler), mantarlara karşı kullanılan maddeler (fungisitler), böceklerin gelişimini olumsuz etkileyen böcek gelişme düzenleyicileri, kaçırıcı olarak karşı kullanılan maddeler (repellent) ve pestisitlerle birlikte kullanılarak pestisitlerin

etkilerin artırıcı maddeler (sinejistikler) olarak sınıflandırılır (Daş ve ark., 2016 ve Kaya ve ark., 2014).

1.2.1.1. Dünya’da Pestisit Kullanımı

Dünyada tarımsal amaçlı pestisit kullanımı yıllık 3,8 milyon ton olup, pestisitlerin satış tutarından elde edilen kazanç 2018 yılı sonu itibariyle yaklaşık olarak 58 milyar dolardır. Pestisit kullanımının Avrupa ülkeleri %45’ini, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) %25’ini ve öteki ülkelerin %25’ini oluşturduğu bildirilmiştir. 1990’lı yılların başlarında organik fosforlar (%43), piretroidler (%18) ve karbamat grubu pestisitler (%16) daha ziyade kullanılırken; günümüzde yaklaşık %80’lik bir oranla neonikotinoidler ilk tercih konumundadır. Bu grubu; yaklaşık %8’erlik oranlar ile karbamatlar ve fibroniller, %3 ile organik fosforlar ve %2 ile de piretroidler izler (Kartal, 2019; Yalçın ve ark., 2016 ve ZMO, 2019).

Avrupa ülkelerinin bazılarında tarım alanlarına hektar başına (kg/ha) kullanılan pestisit etken maddesi miktarları; Almanya ve Fransa 4,5, Belçika 11, Danimarka 2,2, İngiltere 3,7, Hollanda 18, İspanya 2,8, İtalya 7,6 ve Yunanistan 6,0’dır (Arslan ve ark., 2018).

1.2.1.2. Türkiye’de Pestisit Kullanımı

Türkiye’de kullanılan tarımsal ilaç miktarı 2018 yılsonu itibariyle 59 000 ton olup, tarımsal ilaçların satış tutarından elde edilen gelir yaklaşık olarak 2,5 milyar TL’dir. Türkiye’de tarımsal ilaç uygulamaları gelişmiş ülkelere göre oldukça düşük olup; tarımsal ilaç kullanımının yıllara göre değişimi Çizelge 1.6’da verilmiştir. Türkiye’de dünya ortalaması olan 2,0 kg/ha’nın altında ilaç kullanılır; ancak çok ürünli tarım yapıldığı Adana, Antalya, Mersin ve Şanlıurfa gibi illerde bu oran 3,0 kg/ha kadar çıkmaktadır (ZMO, 2019).

Çizelge 1.6. Türkiye’de tarımsal ilaç kullanımı (Ton) (ZMO, 2019).

Yıl	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Toplam	37,651	38,555	39,534	42,611	39,440	39,723	39,026	50,054	54,098	59,00

Türkiye’de pestisitlerin kullanım oranları; % 41 fungusitler, % 22 herbisitler, % 21 insektisitler, % 5 akarisitler ve % 11 diğerleri şeklindedir. Bölgelere göre pestisit kullanım oranları ise; % 29 Akdeniz, %19 Güney Doğu Anadolu, %18 İç Anadolu, %16 Marmara, % 14 Ege ve % 4 Karadeniz Bölgesi şeklinde sıralanır (Arslan ve ark., 2018 ve ZMO, 2019).

1.2.2. Neonikotinoidler

Neonikotinoidlerin gelişimi 1990’larda Bayer firması tarafından başlatılmıştır. Bayer şirketi ilk kez ticari bir neoniotinoid olan imidakloprid geliştirmiş ve 2000’li yılların başlarında iki yeni neonikotinoid olan klothianidin ve tiyametoksam kullanılmak üzere genel pazara sunulmuştur. Son yıllarda, neonikotinoid insektisitler, modern bitki koruma da en hızlı büyüyen insektisit sınıfı olmuştur. Günümüzde neonikotinoidler sentetik pretroidlerden bu yana küresel pazara sunulan insektisitlerin en önemli kimyasal sınıfıdır. Neonikotinoidler küresel olarak 120’den fazla ülkede, 140’dan fazla ürün ile, yaprak bitleri ve bitki zararlıları gibi, böcek haşerelerinin kontrolü için kullanılan en etkili insektisitler arasındadır (Jeschke ve ark., 2011).

Zamanla, diğer bitki koruyucu ürünlerin yanı sıra pestisitlerin üretiminde de önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Neonikotinoidler, daha önce kullanılan ajanların aksine daha düşük dozlarda kullanılabilme avantajına sahiptir. Örneğin, DDT ve diğer klorlular için hektar başına 1,5 kg; organanofosfatlı insektisitler için bu dozun yarısının kullanılması gerekirken; neonikotinoid içeren ürünler için hektar başına 20 g’ın altındaki dozlar yeterli olmaktadır (Reynoso ve ark., 2019 ve Wood ve ark., 2017).

Kimyasal olarak neonikotinoidler nikotin ile ilişkilidir. Nikotin böcek öldürücü etkiye sahiptir. Geçmişte bazı haşere türlerini ortadan kaldırmak için infüzyonlar olarak uzun yıllar kullanılmıştır. Başta nikotin sülfat olarak kullanılan nikotin yakılarak, sera fumigasyonu yapılarak yaprak bitleri ve çeşitli sera mahsulü zararlılarının kontrolünde iyi sonuçlar elde edildi. Nikotin memeliler içinde zehirlidir. Bu nedenle bitkilerin korunmasında kullanılması durdurulmuştur. Nikotin tarımda sadece sülfat şeklinde değil, aynı zamanda çoğu böcek türünü kontrol etmede çok etkili olan formlarda kullanılmıştır. Tarımsal amaçlar için nikotin (nikotin sülfat) yasağı, insanlar üzerindeki toksisitesinden değil, böceklerin bu maddeye karşı geliştirdiği dirençten kaynaklanır (Hayes, 1982).

Neonikotinoidlerin ticarileştirilmesi onları üreten şirketler için tütün yapraklarından daha düşük maliyetle kolayca ekstrakte edilen nikotine göre daha karlıdır. Neonikotinoidler, suda kolay çözünürler ve toprakta yavaş yavaş parçalanırlar. Bu nedenle bitkiler tarafından kolayca emilirler ve bitki büyümesi sırasında koruma sağlarlar. Bu özelliklerinden dolayı neonikotinoidler artan bir popüleriteye sahiptir (Frederickson ve ark., 2016).

1.2.2.1. Neonikotinoidlerin Yapısı ve Özellikleri

Kimyasal yapılarına göre neonikotinoidler farklı sınıflandırmalar uygulanır. Son zamanlarda oluşturulan neonikotinoidlerin kimyasal yapılarında dört ortak unsur vardır. Bunlar (1) aromatik heterosiklik grup, (2) elastik bağlar, (3) hidroheterosiklik veya guanidin/amidin grupları ve (4) elektron çeken gruptur. Ayrıca, siyano veya nitroguanidin/amidin grubunun, yerine bir sülfonamid fonksiyonel grubu (sülfoksikfor gibi), yapıları değiştirilerek sürekli olarak yeni neonikotinoid türevleri oluşturulur (Yang ve ark., 2014). Bu alt sınıfların daha basit bir şekilde nitroguanidin ve siyano amidin gibi iki gruba ayrılabilir. Nitroguanidin tipi neonikotinoidler, yapıları içerisinde oksijen atomu içeren N-nitro grubu içerdiği için daha fazla polar ve reaktif özellik gösteriler. Bu grup neonikotinoidler, imidakloprid, tiyametoksam ve klotianidindir. Klotianidin yapısı gereği bal arıları için en zehirli maddeler arasında sayılabilir (Pisa

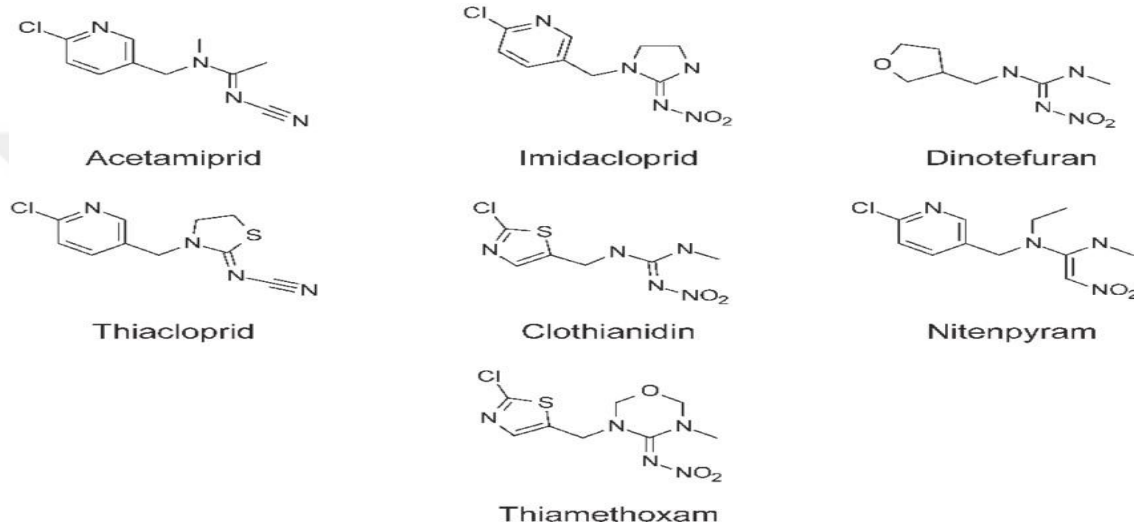
ve ark., 2015). Siyano amidin tipi neonikotinoidler N-nitro yerine oksijen atomu içermeyen siyannoamidin grubu içerirler. Bu nedenle daha az polar ve daha az reaktiflerdir. Bu tür maddeler arasında asetamiprid ve tiyakloprid bulunur. Arılar için asetamiprid toksisitesi, organizmalarında kolayca metabolize edildiğinden düşüktür (Iwasa ve ark., 2014).

Ana neonikotinoidler imidakloprid (IMI), nitenpyram (NIT), tiyametoksam (TMX), asetamiprid (ACE), klotiyanidin (CLO), dinotefuran (DIN), sulfox (SUL), tiyakloprid (THI) ve benzerleridir. Bunlar arasında imidakloprid, neonikotinoid insektisitlerin “birinci neslinin” tipik bir temsilcisidir. İmidakloprid, dünyada en yaygın kullanılan ve en fazla üretilen pestisittir. Çin, neonikotinoidlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca Çin, en büyük imidakloprid üreten ve ihraç eden ülkedir. Neonikotinoid insektisitlerin “ikinci nesil” tipik bir temsilcisi olan tiyametoksam; iyi temas, gastrik toksisite ve inhalasyon aktivitelerine sahiptir. İmidakloprid ile karşılaştırıldığında, tiyametoksam daha güvenlidir, daha geniş bir böcek öldürücü spektruma, daha hızlı etki hızına ve daha uzun bir etki süresine sahiptir. Şu anda satışlarda imidakloprid'ten sonra tiyametoksam ikinci bir böcek ilacı sınıfı haline gelmiştir. Dinotefuran, neonikotinoid insektisitlerin tek "üçüncü neslidir". Japonya'da Mitsui Company tarafından geliştirilmiştir, klor atomları ve aromatik halkalar içermez. Diğer neonikotinoidlerden farklı bir kloropiridin veya klorotiyazol halkalı bir tetrahidrofuran grubu sağlar ve neonikotinoidlerin temel yapısal elemanı olarak kabul edilir. Şekil 1.1.'de neonikotinoidlerin kimyasal yapıları verilmiştir. Kısacası, neonikotinoid insektisitlerin "ilk nesli": imidakloprid (IMI), nitenpyram (NIT), tiyakloprid (THI) ve asetamiprid (ACE)'dir. Neonikotinoid insektisitlerin "ikinci nesli": tiyametoksam (TMX) ve klotiyanidin (CLO)'dir. Neonikotinoid insektisitlerin üçüncü nesli: dinotefuran (DIN)'dur. Dördüncü nesil neonikotinoid insektisit ise sulfoxafor (SUL)'dur (Xu ve ark., 2022).

Neonikotinoidler kimyasal yapılarına göre ayırt edilebilirler; ancak etki mekanizmaları aynıdır. Çünkü hepsi aynı aktif kısma sahip oldukları için asetilkolinin nikotin reseptörleri üzerindeki (nAChR'ler) agonistleri olarak hareket ederler (Moffat ve ark., 2016). Neonikotinoidlerin kimyasal özellikleri ve belirli fizikokimyasal

parametreleri Çizelge 1.7.'de verilmiştir (Bontamin ve ark., 2015). Neonikotinidler, toprakta ayrışma özellikleri, böcek organizmasındaki metabolizmaları ve arılar üzerindeki etkileri sahip oldukları tek bir kimyasal yapıya bağlı değildir. Örneğin siyano grubu içeren bileşikler, diğer neonikotinidlere göre arılar için daha düşük toksisiteye sahiptir. Ayrıca siyano grubu içeren bileşikler suda yaşayan böcekler için nitroguanidin neonikotinidleri kadar zehirlidir (Morrissey ve ark., 2015).

Şekil 1.1. Neonikotinoidlerin kimyasal yapısı (Tanner ve ark., 2011).



Çizelge 1.7. Neonikotinoidlerin fiziksel ve kimyasal parametreleri (Bontamin ve ark., 2015).

Neonikotinoid	Moleküler Formülasyon	Suda Çözünürlükleri 20 °C [mg l ⁻¹]	Kaynama Noktaları [°C]	Oktanöl-su dağılım kat sayısı pH 7, 20 °C (log P _{ow})	Ayrışma sabiti 25 °C (pKa)	Toksikolojik sınıflandırma	Moleküler Ağırlıkları (g/mol)
Asetamiprit	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	2950	98,9	0,8	Güçlü asit	Orta	222,67
Klotiyamidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	340	176,8	0,9	Güçlü baz	Yüksek	249,7
Dinotefuran	C ₇ H ₁₄ N ₄ O ₃	39,830	107,5	-0,5	Çok zayıf asit	Yüksek	202,21
İmidakloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	610	144,0	0,6	-	Yüksek	255,7
Nitenpyram	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₄ O ₂	590,000	82	-0,66	-	-	270,72
Tiyakloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	184	136	1,26	-	Orta	252,72
Tiyametoksam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	4100	139,1	-0,1	-	Yüksek	291,71

1.2.2.2. Neonikotinoidlerin Kullanımı

Son yıllarda neonikotinoidlerin, emici böcekler, toprak böcekleri ve tahıl bitkileri, baklagiller, çim, pamuk, patates ve diğer sebzeler ile beslenen haşereler gibi hedef zararlılar karşı sıklıkla kullanılan böcek öldürücülerdir. Ayrıca evcil hayvanlarda pireleri öldürmek için de kullanılır. Neonikotinoidler, sistemik insektisitlerdir. Sistemik insektisit olan neonikotinoidler, bitkinin yüzeyinde kalmazlar, bitkinin damar doku sistemine girerler ve tüm organizma boyunca taşınırlar. Bu nedenle bu ürünlerin bir kısmı ekim zamanında, bitkinin çimlenmeye veya tamamen büyümesine kadar, zararlılara karşı koruma sağlamak için bitki tohumların içinde kullanılır. Neonikotinoidler uzun süre aktif kalarak bitkileri zararlılara karşı uzun vadeli korurlar. Bitkilerin sapları vasıtasıyla çiçeklere oradan nektar ve polene, bitki stomalarından salgılanan su damlacıklarına geçer (Bredeson ve ark., 2018 ve Buszewski ve ark., 2019).

Neonikotinoidlerin, sulama sistemlerinde ve toprakta uzun süre kaldığı bildirilmiştir. Çizelge 1.8.'de neonikotinoidlerin topraktaki yarı ömürleri verilmiştir. Tohumların neonikotinoidlerle muamele edilmesinden 2 yıl sonra bile toprakta hala düşük seviyelerde bulunduğu da bildirilmiştir (Schaafsma ve ark., 2015).

Çizelge 1.8. Neonikotinoidlerin topraktaki yarı ömrü.

Neonikotinoid	Topraktaki Yarı Ömrü
Asetamiprit	1-8 Gün
Klotiyanidin	148-1155 Gün
Dinotefuran	138 Gün
İmidakloprit	40-997 Gün
Tiyakloprit	1-27 Gün
Tiyametoksam	25-100 Gün

1.2.2.3. Neonikotinoidlerin Etki Mekanizması

Neonikotinoidler, böceklerin merkezi sinir sistemin de sinaptik iletimde çok önemli bir rol oynayan asetilkolinin (nAChR'ler) nikotin reseptörleri üzerinde seçici olarak etki eder. Bu maddeler, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin nikotin agonistleri gibidir. Bu reseptörler memelilerde merkezi ve periferik sinir sistemlerinde bulunurken, böceklerde merkezi sinir sistemine yerleşirler. Neonikotinoidlerin çoğu, istenmeyen böceklerin organizmalarında nörotoksik aktivite gösterir. Ayrıca bu maddeler, böceklerin nöroreseptörlerine memelilerinkinden çok daha güçlü bağlanır (Chen ve ark., 2014 ve Kimura-Kuroda ve ark., 2012).

Sinir sistemi olan tüm hayvanlarda asetilkolinin (nAChR'ler) nikotin reseptörler ve neonikler, bu reseptörü oluşturan $\alpha 4\beta 2$ 'nin (Alfa-4 Beta-2 nikotinik reseptörü) agonistleridir. Böcekler ve omurgalılar arasındaki fark, böceklerde tüm nikotinik asetilkolinin (nAChR'ler) reseptörleri bu alt birimleri içerirken, omurgalılarda nAChR'leri yalnızca yaklaşık % 8-10'unda bu alt birimler bulunur. Bu nedenle omurgalıların neonikotinoidlere duyarlılığı böceklerinkinden çok daha azdır (Buszewski ve ark., 2019).

Neonikotinoidler, nikotik asetilkolin (nAChR'ler) reseptörlerine bağlanarak ve sinaptik iletimini etkileyerek etki gösterirler. nAChR'ler reseptörleri genellikle asetilkolin (ACh) olarak bilinen nörotransmittere bağlanarak aktivite edilir. ACh, asetilkolin esterase enzimi (AChE) tarafından parçalandıktan sonra asetat ve kolin oluşturularak inaktivite olur. ACh'e benzer şekilde, neonikotinoidler nAChR'ler reseptörlerine bağlanabilir ve nAChR'ler reseptörlerini aktivite edebilir. Ancak ACh'nin aksine AChE tarafından de aktivasyona neden olmazlar. Bu sinir sisteminin aşırı uyarılmasına ve nihayetinde hücre ölümüne yol açar. Neonikotinoidlerin, nAChR'ye bağlanma yerleri elektronegatifdir, bu da böceklerde toksisitelerine katkıda bulunur. Neonikotinoid insektisitlerin etkisinin bu seçiciliği nedeniyle, memeliler için daha az toksik olarak kabul edilirler (Chang ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014 ve Kimura-Kuroda ve ark., 2012).

1.2.2.4. Arılarda Neonikotinoidlerin Metabolizması

Bal arıları çiçekten çiçeğe polen taşıyarak çok sayıda bitki türünün gelişme döngüsünde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, geniş alanlarda yiyecek arama faaliyetleri onların pestisitler de dahil olmak üzere çeşitli kirleticiler temasa geçmesine neden olduğu için çevresel kalitenin belirlenmesinde iyi bir biyogöstergedir. Neonikotinoidlerin yaygın kullanımı nedeniyle bal arılarının bu pestisitlere temas etme sıklığını artırır (Paradis ve ark., 2014 ve Tanner ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada, 50 ppm nikotin içeren şekerli suyla beslenen arıların sadece 3,2 ppm nikotinli bal ürettikleri gösterildiğinden, arıların henüz bilinmeyen bir mekanizma ile nektardaki nikotini detoksifiye edebildikleri bildirilmiştir (Singaravelan ve ark., 2005).

Asetamipridin, bal arısı (*Apis Mellifera*)'nda invivo metabolizması araştırılmış ve asetamipridin ile metabolitlerinin dağılımı 6 biyolojik bölmede (baş, göğüs, karın, hemolenf, orta bağırsak ve rektum) 72 saatlik bir süre boyunca incelenmiştir. Arıların asetamipride ağız (oral) yoluyla maruz kaldıkları 25 dk için metabolitlerine dönüştüğü, 24 saat içinde ise metabolize edilmeye başladığı ve 72 saat sonra % 50'sinden fazlasının metabolize edilerek vücuttan uzaklaştırıldığı bildirilmiştir. Bu hızlı dönüşümün; arılarda bulunan sitokrom P450 enzimleri tarafından neonikotinoidlerin daha hızlı detoksifiye edilebilmelerine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Brunet ve ark., 2005).

1.2.2.5. Neonikotinoidlerin Arılar Üzerine Etkisi

Başlangıçta neonikotinoidler, bitkileri zararlılardan koruyan, birçok faydalı böceğe karşı düşük toksisite gösteren maddeler olarak kabul edilmiştir. Ancak tüm dünyadaki arı popülasyonunun maruz kaldığı büyük kayıplar nedeniyle bu görüş tartışılır hale gelmiştir (Buszewski ve ark., 2019 ve Wood ve ark., 2018).

Araştırmalar, tarımda kullanılan eser miktarda neonikotinoidlerin genellikle arıları doğrudan öldürmediği, ancak arıların insektisit zehirlenmesinin tüm semptomlarını (koordinasyonsuz hareketler, titreme ve kasılma) göstermesi nedeniyle, dolaylı etkiye sahip olduğunu ortaya koyduğu bildirilmiştir. Ayrıca neonikotinoidler, arıların durumu ve onların yiyecek arama, öğrenme, çiçek konumlarını hatırlama, koloni, kovan veya sürüye geri dönüş yolunu bulma kapasitelerini, bal arısı kolonisinin büyümesini ve kraliçe arının doğurganlığını da olumsuz etkileyebilir. Bu böceklerin ani ölümüne yol açmasalar da; sağlıklarını önemli ölçüde kötüleştirir, beslenme süreçlerini bozar, koku alma duyusu ve gezinme yeteneklerini bozarak arıların daha erken ve sık ölmesine neden olurlar (Friedli ve ark., 2020; Laycock ve ark., 2012; Schneider ve ark., 2012 ve Yang ve ark., 2014).

Arılar neonikotinoidlerin tadını hissetmezler, bu da kontamine nektarları yedikten sonra zehirlenme riskini artırır. Neonikotinoidler, beyin bölgeleri arasındaki iletişim dahil olmak üzere böceklerin sinir sisteminin işleyişini bozarak felç ve ölümlere neden olabilirler. Bitki koruma kimyasalları, arılar ve çeşitli tozlayıcılar dahil olmak üzere böceklerin hastalıklara ve parazitlere karşı direncini azaltabilirler (Fairbrother ve ark., 2014; Sánchez-Bayo ve ark., 2016 ve Schneider ve ark., 2012).

1.2.2.6. Neonikotinoid Kullanımının Yasaklanması

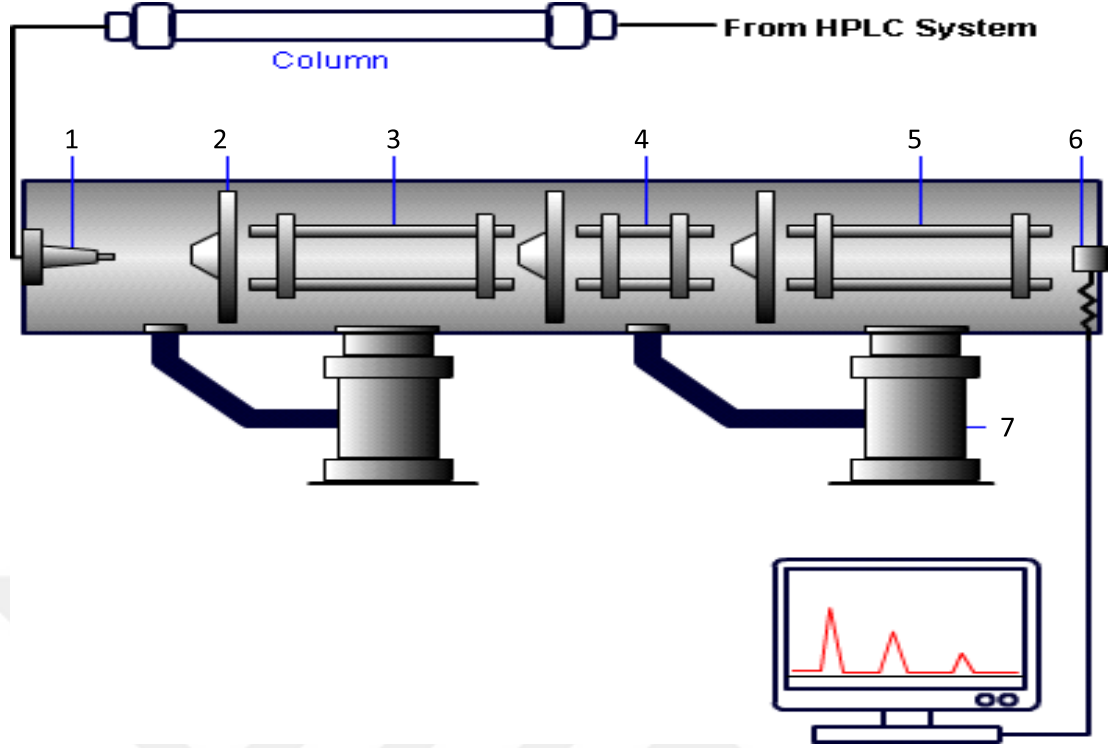
Tozlayıcı böcekler çevrenin önemli bir bölümünü oluşturur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda neonikotinoidlerin, toksik ve nörotoksik özellikleri nedeniyle bal arıları ve tozlayıcılar için ölümcül olduğu kanıtlanmıştır. Neonikotinoid pestisit kullanımı bal arısı popülasyonlarının azalmasının ana sebeplerinden biri olarak tanımlanmıştır. Arılar üzerine olan zehirli etkilerinden dolayı dünyanın birçok ülkesinde neonikotinoidlerin kullanımı yasaklanmıştır. İmidakloprit Fransa’da 2004 yılında, klotiyonidin, imidakloprid ve tiyametoksamın mısır tohumunda kullanımı İtalya’da 2008 yılında ve 2013 yılında da AB’nde yasaklanmıştır (Oruç ve ark., 2019 ve Sánchez-Bayo, 2018).

Ülkemizde Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından klotiyonidin, imidakloprid ve tiyametoksam kullanımı 19 Aralık 2018 tarihinde yasaklanmıştır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2019).

1.3. Likit Kromatografi Kütle Spektrometri/Kütle Spektrometri (LC-MS/MS)

Günümüzde çoklu reaksiyon izleme (MRM) modlu likit kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) neonikotinoid insektisit kalıntılarının miktarının belirlenmesi için birçok matrikste en yaygın kullanılan ve kabul gören bir teknik haline gelmiştir (Hou ve ark., 2019).

LC/MS, Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) ayırma gücü ile kütle spektrometresinin algılama gücünü birleştiren bir tekniktir. Kütle spektrometresi, yüklü türlerin üretilmesi, ardından ayrılmasını ve tanımlanmasını içeren geniş kapsamlı analitik bir tekniktir. Kütle spektrometresi, gaz iyonlarını kütle/yük (m/z) değerlerine göre ayırmak için tasarlanmış bir cihazdır. Kütle spektrometresi, LC/MS’de çeşitli iyonizasyon yöntemi ile üretilen yüklü türlerin ayrılmasını içerir. Bunlar; (1) Elektrosprey iyonizasyon (EI), (2) Atmosfer basıncı kimyasal iyonizasyon (APCI). Her iki durumda da, yüklü türler, atmosferik basınç koşulları altında gaz fazı iyonları olarak üretilirler. Gaz fazı iyonlarının ayrılması, iyonları ayır etmek için elektrik ve/veya manyetik alanlar kullanılarak, kütle spektrometresi içinde gerçekleşir. Kütle spektrometresi, analizöre ek olarak ayrıca bir atmosferik iyonizasyon odası, bir vakum sistemi bir de detektör içerir (Kruve ve ark., 2015). LC-MS cihazının ana unsurları Şekil 1.2.’de verilmiştir (Chromacademy, 2021)



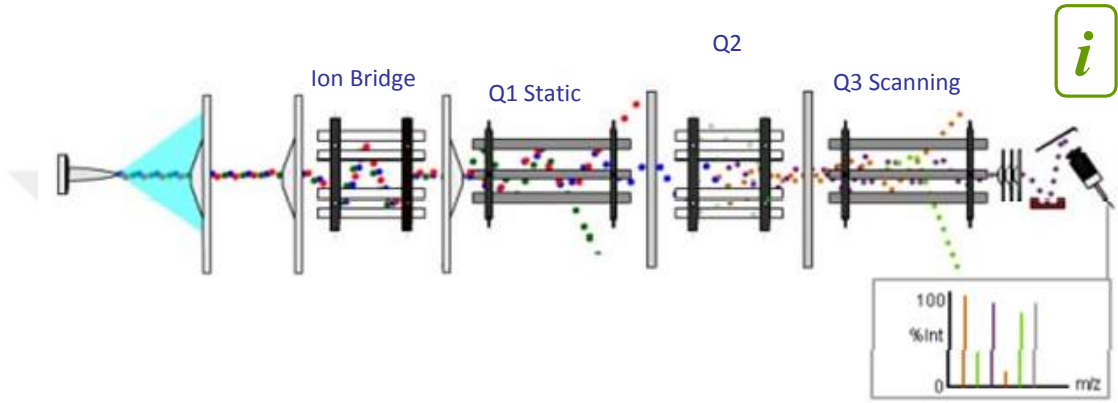
Şekil 1.2. LC-MS cihazının ana unsurları (Chromacademy, 2021).

- (1) İyon kaynağı (ion source), HPLC eluenti, atmosferik basınç bölgesine püskürtülür.
- (2) Skimmer konisi (Skimmer Cone); tercihen faz fazı örneklerini iyonlarını örneklemek ve kütle analiz cihazının vakum sistemine giren gaz yükünü azaltmak için çapı küçültülmüş bir örnekleme ağzına sahip bir koni.
- (3) Kuadrupol (Quadrupole); İyonları, birbirine paralel dört eşit mesafeli çubuğun merkezi eksenini boyunca geçerken kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırmak için elektrik alanlarını kullanan cihazdır.
- (4) Çarpışma hücresi (Collision Cell); İlk kütle analizöründen çıkan iyonlar bir potansiyel farkı kullanılarak hızlandırılır ve H_2 , N_2 veya Ar gibi nötr gaz molekülleri ile çarpışarak analitin parçalanmasına neden olur.
- (5) Kuadrupol (Quadrupole); İyonları, birbirine paralel dört eşit mesafeli çubuğun merkezi eksenini boyunca geçerken kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırmak için elektrik alanlarını kullanan cihazdır.
- (6) Detektör (Detector); üretildikten ve ayrıldıktan sonra iyonların algılanması ve kullanılabilir bir sinyale dönüştürülmesi gerekir. Elektron çoğaltıcı, dinod ve fotodiyot gibi detektörler modern kütle spektrometre sistemlerin çoğunda yaygın olarak kullanılmaktadır.
- (7) Vakum sistemi (Vacuum system): kütle analizörleri, öngörülebilir ve verimli bir şekilde çalışmak için yüksek düzeyde vakum gerekir. Birçok modern Lc/ms sisteminin vakum sistemleri, üreticisine bağlı olarak, farklı tasarımlı bölmeler veya 2 ya da daha fazla delikli plaklar ile ayrılmış, farklı pompalanan vakum odalarından oluşmaktadır.

LC-MS’de kütle analizörleri kuadrupol ile birlikte iyon tuzaklı (Ion Trap; IT) ve uçuş zamanlı (time of Flight, TOF) kütle analizörleri yaygın olarak kullanılır (Chromacademy, 2021).

Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS): MS/MS, iki ya da daha fazla kütle spektrometresinin birleşimidir. İlk deney sırasında izole edilen iyonları parçalayarak

yapısal bilgi elde etmek veya hem birinci hem de ikinci analizörler kullanılarak temsili iyon geçişlerini seçerek nicel analiz için daha iyi seçicilik ve hassasiyet elde etmek amacıyla kullanılır. MS/MS analizi, çoklu analizlerin birleştirilmesi ile (aynı veya farklı türden) veya bir iyon tuzağı ile yakalanan iyonların ardışık parçalanmasıyla gerçekleştirilebilir (Kruve ve ark., 2015). Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS) Şekil 1.3.'de verilmiştir (Chromacademy, 2021).



Şekil 1.3. Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS) (Chromacademy, 2021).

1.4. Metot Validasyonu ve İlgili Validasyon Parametreleri

Avrupa Birliği (AB) 2002/657/EC sayılı Komisyon kararına göre, gıdalardaki kalıntıların belirlenmesinde kullanılan LC-MS/MS analizlerinin de doğru sonuçların elde edilmesi için; doğrusalılık (linearity), geri kazanım (recovery), kesinlik (precision), spesifiklik (specificity), tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), karar limiti (CC α), tayin yeterliliği (CC β) ve sağlamlık parametrelerinin belirlenmesi gereklidir (European Commission, 2002 ve ICH, 2006).

1.4.1. Doğrusallık (Linearity)

Doğruluk; test sonucu ile kabul edilen referans değer arasındaki anlaşmanın yakınlığı şeklinde tanımlanır. Başka bir ifade ile; ölçüm cihazı ya da yöntemi ile elde

edilen sonucun, gerçek değere olan yakınlığı olarak da tanımlanır. Gerçekliği ve kesinliği belirterek belirlenir (European Commission, 2002).

1.4.2. Gerçeklik

Gerçeklik, büyük bir dizi test sonuçlarından elde edilen yaklaşık değer ile kabul edilen bir referans değeri arasındaki anlaşmanın yakınlığı demektir. Gerçeklik genelde eğilim olarak ifade edilir. Eğilim, test sonucu beklentisi ile kabul edilen referans değeri arasındaki fark şeklinde tanımlanır (European Commission, 2002).

1.4.3. Kesinlik

Kesinlik; bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığını ifade eder ve genellikle ölçümü, kesin olmama terimleri ile tanımlanır. Hesaplanması, analiz sonuçlarının standart sapması alınarak yapılır. Kesinlik azaldıkça, standart sapma büyür. Yöntemin kesinliği, aynı koşullar altında birden fazla sayıdaki ölçüm sonuçlarının birbirine olan benzerlik derecesidir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak kesinlik iki bileşene ayrılır. Tekrarlanabilirlik; analiz yapılan gün ve analizi yapan kişi, ölçüm cihazı ve metodu, laboratuvar şartları ve çalışma koşulları gibi parametrelerin aynı olduğu şartlarda yapılan bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanır. Tekrar üretilebilirlik ise; yukarıda belirtilen etkenlerden bir veya birkaçının değişmesi durumunda elde edilen bağımsız test sonuçları olarak tanımlanır. Laboratuvar içinde üretilebilirlik, doğrulanmış uzun zaman aralıkları boyunca öngörülmüş (önceden belirtilmiş) koşullar (örneğin, yöntem, test materyalleri, operatörler, çevre) altında aynı laboratuvar da elde edilen kesinlik demektir (European Commission, 2002).

Kesinlik değerleri (s_r ve s_R) aşağıdaki formüllerle hesaplanabilir:

Tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r) ‘Gruplar İçinde Kareler

Ortalamasının' kareköküne eşittir.

$$S_r = \sqrt{MSw}$$

Grublar arasındaki standart sapma (S_b) aşağıdaki eşitlikten hesaplanır. Negatif çıkması durumunda sıfır olarak alınır.

$$S_b = \sqrt{\frac{MSb-MSw}{n}}$$

Tekrar üretilebilirlik standart sapması (S_R) aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_b^2}$$

C : Geri kazanım

C1 : Spike edilen örneğin konsantrasyonu

C2 : Örnek konsantrasyonu

C3 : Standart konsantrasyonu

$$C = (C1-C2)/C3$$

Cort= Cort Ortalama Geri Alım = Geri Alım Değerlerinin Toplamı/n
(n: analiz tekrarı sayısı)

RSDr(%) :Tekrar edilebilirlik nisbi standart sapma yüzdesi

RSD_R(%): Laboratuar içi üretilebilirlik nisbi standart sapma yüzdesi

$$RSDr(\%) = (s_r * 100) / Cort$$

$$RSD_R(\%) = (S_R * 100) / Cort$$

1.4.4. Spesifiklik (Specificity)

Spesifiklik, ölçülen analit ve diğer maddeleri ayırt etme yönteminin yeteneği demektir. Başka bir ifade ile, Spesifiklik, analitik metodun aranan analitik numunede bulunan diğer bileşenlerden ayırma kabiliyetidir. Bu özellik, açıklanan ölçme tekniğinin ağır basan bir işlevidir, ancak bileşenin veya matrisin sınıfına göre değişebilir. Analitik metodlar için, analit ve yakından ilgili maddeler (metabolitler, izomerler, degradasyon ürünleri, endojen maddeler, matris bileşenleri, vs) arasındaki ayırım gücü önemlidir (European Commission, 2002).

1.4.5. Geri Kazanım

Geri kazanım, analitik yöntem esnasında geri kazanılan bir maddenin doğru konsantrasyonunun yüzdesi şeklinde tanımlanır ve kör numuneye standart madde eklenmesi, ardından aynı analiz işlemlerinin standart eklenmiş kör numuneye uygulanması ile gerçekleştirilir (European Commission, 2002).

1.4.6. Tespit (Limit of Dedection, LOD) ve Ölçüm (Limit of Quantification, LOQ) Limitleri

LOQ, analitin kabul edilebilir gerçeklik ve tekrarlanabilirlik kesinliğinde ölçülebilen, en düşük derişimdir. LOD ise, analitin analiz yöntemi uygulanarak makul bir kesinlikte tespit edilebilen en düşük derişimidir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018).

1.4.7. Karar Limiti ($CC\alpha$)

Karar limiti ($CC\alpha$), bir örneğin (α) 'nın hata olasılığı olan limitte veya bunun üstündeki limit demektir. Alfa (α) Hatası: Uygunsuz bir ölçüm (yanlış uygunsuz karar)

elde edilse bile test edilen örneğin uygunluğunun olasılığıdır (European Commission, 2002).

MRL düzeyinde laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışması yapılır. Buradan MRL düzeyinde elde edilen $S_{R(MRL)}$ ile $CC\alpha$ hesaplanır.

$$CC\alpha = C_{MRL} + 1,64 * S_{R(MRL)}$$

$$C_{MRL} = \text{Maddenin MRL Değeri,}$$

$$S_{R(MRL)} = \text{MRL Değerindeki Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı}$$

MRL'i olan maddeler için $CC\alpha$, matris başına MRL seviyesinde güçlendirilmiş 20 boş numuneyi analiz ederek belirlenebilir. Bu analizler, önemli derecede farklı zaman aralıklarında ve farklı boş örnekler ile en az üç farklı günde gerçekleştirilmelidir. Bu testte saptanan Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı değeri ile yukarıda verilen formülden $CC\alpha$ hesaplanır. MRL'i olan maddeler için doğrulama metodlarında (GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS vb. kullanılarak analiz edilen deney metotlarında) sonuçların değerlendirilmesinde; bulunan değer $CC\alpha$ değerinden büyükse sonuç pozitif olarak raporlanır (European Commission, 2002).

1.4.8. Tespit Limiti-Tayin Yeterliliği (Saptama) ($CC\beta$)

Beta hata olasılığın sahip bir örneğin saptanabilen, tanımlanabilen ve/veya miktarını belirleyebilen maddenin en küçük içeriğidir. Beta (β) Hatası: Uygunsuz bir ölçüm (yanlış uygunsuz karar) elde edilse bile test edilen numunenin gerçekten uyumsuz olma olasılığıdır. İzin verilen limit belli değil ise, $CC\beta$ bir metodun $1-\beta$ olasılığı ile kirletilmiş numuneyi tespit edebildiği en düşük konsantrasyondur. İzin verilen miktar belli ise, $CC\beta$ bir metodun $1-\beta$ olasılığı ile izin verilen limite tespit edebildiği konsantrasyondur (European Commission, 2002).

$CC\beta$ değeri $CC\alpha$ değeri üzerinden aşağıdaki formül ile hesaplanabilir;

$$CC\beta = CC\alpha + S_{R(MRL)} * 1,64$$

$S_{R(MRL)}$: MRL Değerindeki Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı

1.4.9. Sağlamlık

Bu çalışmalar, küçük makul çeşitlemelerin laboratuvar tarafından kasıtlı takdimini ve sonuçlarının gözlemini kullanırlar. Ölçüm sonuçlarını etkileyebilecek numune ön-işleme, temizleme ve analiz faktörlerini seçerek yapılmalıdır. Bu tür faktörler, analisti, belirteçlerin kaynağı ve yaşlarını, çözücüleri, standart ve numune ekstrelerini, ısınma hızı, sıcaklık, matriks, pH değeri ve laboratuvar ortamına çıkabilen diğer bir çok faktörü içerebilir. Youden yaklaşımını kullanarak sonuçları önemli ölçüde etkileyebilecek faktörü hafifçe değiştirerek ölçüm sonuçları üzerine olan etki belirlenir (European Commission, 2002).

1.4.10. Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması

2002/657/EC direktiflerin de sonuçların doğruluğunun kontrolünde, ölçüm belirsizliği yerine $CC\alpha$ ve $CC\beta$ terimleri kullanılmaktadır. Ancak belirlenen $CC\alpha$ değerinin uygunluğunun kontrolü için de ölçüm belirsizliği hesaplanabilir. Ölçüm Belirsizliği hesaplamalarında güncel kabul edilen prosedür veya direktiflerinden herhangi birisi kullanılabilir.

1.5. Çalışmanın Hipotezi, Amacı ve Önemi

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda neonikotinoidlerin insan sağlığı üzerine potansiyel risk oluşturabileceği bildirilmiştir. Bu sebeple, insanlar tarafından tüketilen gıda ürünlerinde neonikotinoidlerin miktarını belirlemek giderek önem kazanmıştır. Kimura-Kuroda ve ark. (2012), asetamiprid ve imidakloprid'in yenidoğan

sıçanlarından serebellar nöronlar üzerine nikotin benzeri etkilerini araştırmış ve insan sinir sistemi gelişmesi üzerinde asetamiprid ve imidaklopid'in potansiyel bir tehlikeye sahip olduğunu bildirmiştir. İnsan sağlığı üzerine olan direkt etkileri, Cimino ve ark. (2017)'nın yapmış olduğu sistemik derlemede; kronik maruziyetin fallot tetralojisi, anensephali, otizm, hafıza kaybı, tremor semptomlarını içeren gelişimsel ve nörolojik bozukluklar ilişkilendirilebileceği çalışmalarda tespit edildiği bildirmiştir.

İnsan sağlığı ve gıda güvenliği açısından pestisitlerin kalıntı miktarlarının belirlenmesinin önemi, her geçen gün artmaktadır. Dünyada neonikotinoidler üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, insan sağlığının yanı sıra çevresel kirlenmeye yol açmaları sebebiyle bu pestisitlerin diğer canlılar üzerinde de zararle etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Ballarda neonikotinoid grubu bazı pestisitlerin kalıntı problemini ortaya koymayı amaçlayan bu çalışmanın; ülkemizde neonikotinoid grubu pestisitlerin analizi için uygun modifiye bir yöntemin geliştirilerek laboratuvara uyarlanması, böylelikle öncelikle ballarda olmak üzere arı ürünlerindeki analizlerinin yapılabilir kılınması ve bu analizlerin sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından rutin uygulamalara model oluşturması hedeflenmiştir.

Bu kapsamda olacak şekilde planlanan bu tez çalışması ile; Ankara piyasasında satışa sunulan süzme ballarda neonikotinoid grubu bazı pestisitlerin (asetamiprid, klotiyanidin, imidaklopid, tiyaloprid ve tiametoksam) tespit edilmesi için hazır valide bir metod ile hızlı, hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir bir metodun uygulanması sağlanarak, toplanan bal numunelerinin bu metodla analizlerinin gerçekleştirilmesi ve örneklerdeki neonikotinoid pestisid varlığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yapılması planlanan tez çalışması; ülkemizde bu alanda hassas bir yöntem ile gerçekleştirilen ilk çalışma olması ve ballarda neoniotinoid grubu pestisitlerin analizi için hızlı, kolay, ucuz, güvenli ve tekrarlanabilir bir yöntem geliştirilmesi ve böylelikle de benzer çalışmalara da öncülük edecek olması yönleriyle özgün bir değere sahiptir.

Tez çalışmasının hipotezini ise; analizi gerçekleştirilen bal numunelerinde neonikotinoid kalıntısının bulunmaması varsayımı oluşturmaktadır. Varsayılan hipotezi test etmek için ise; toplanan bal numuneleri öncelikle QuEChERS (Ucuz, Etkili, Hızlı, Kolay, Sağlam ve Güvenli) yöntemi ile özütleme işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen özüt üzerinden de Mrzlikar ve ark. (2019)'nın kullandığı yöntem kısmen modifiye edilerek LC-MS/MS'de neonikotinoid grubu bazı pestisitlerin (asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid ve tiametoksam) varlığı araştırılmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bal Numunelerinin Toplanması

Bal numuneleri, Haziran-Aralık 2021 tarihleri arasında Ankara ili merkez ilçelerinde tüketime sunulan toptan, perakende ve yöresel ürün satış yerlerinden en az 25 g. ağırlıkda olacak şekilde (20'şer adet çam, çiçek ve kestane balı) 60 adet bal numunesi toplandı. Bal numuneleri ulusal kalıntı izleme planında belirtilen numune alma prosedürüne göre toplandı ve kalıntı izleme planına göre kodlanarak analize alındı (UKİP, 2018). Ayrıca aynı markaya ait olan bal numunelerinin farklı parti seri numaraları olmasına dikkat edildi. Toplanan bal numunelerine ait bilgiler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Toplanan bal numuneleri.

Numara	Çam Balı	Çiçek Balı	Kestane Balı
1	B.06.Kİ.Çam1	B.06.Kİ.Çik1	B.06.Kİ.Kes1
2	B.06.Kİ.Çam2	B.06.Kİ.Çik2	B.06.Kİ.Kes2
3	B.06.Kİ.Çam3	B.06.Kİ.Çik3	B.06.Kİ.Kes3
4	B.06.Kİ.Çam4	B.06.Kİ.Çik4	B.06.Kİ.Kes4
5	B.06.Kİ.Çam5	B.06.Kİ.Çik5	B.06.Kİ.Kes5
6	B.06.Kİ.Çam6	B.06.Kİ.Çik6	B.06.Kİ.Kes6
7	B.06.Kİ.Çam7	B.06.Kİ.Çik7	B.06.Kİ.Kes7
8	B.06.Kİ.Çam8	B.06.Kİ.Çik8	B.06.Kİ.Kes8
9	B.06.Kİ.Çam9	B.06.Kİ.Çik9	B.06.Kİ.Kes9
10	B.06.Kİ.Çam10	B.06.Kİ.Çik10	B.06.Kİ.Kes10
11	B.06.Kİ.Çam11	B.06.Kİ.Çik11	B.06.Kİ.Kes11
12	B.06.Kİ.Çam12	B.06.Kİ.Çik12	B.06.Kİ.Kes12

13	B.06.Kİ.Çam13	B.06.Kİ.Çik13	B.06.Kİ.Kes13
14	B.06.Kİ.Çam14	B.06.Kİ.Çik14	B.06.Kİ.Kes14
15	B.06.Kİ.Çam15	B.06.Kİ.Çik15	B.06.Kİ.Kes15
16	B.06.Kİ.Çam16	B.06.Kİ.Çik16	B.06.Kİ.Kes16
17	B.06.Kİ.Çam17	B.06.Kİ.Çik17	B.06.Kİ.Kes17
18	B.06.Kİ.Çam18	B.06.Kİ.Çik18	B.06.Kİ.Kes18
19	B.06.Kİ.Çam19	B.06.Kİ.Çik19	B.06.Kİ.Kes19
20	B.06.Kİ.Çam20	B.06.Kİ.Çik20	B.06.Kİ.Kes20

2.2. Standart ve Kimyasal Maddeler

Kullanılan standart ve kimyasallar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Standart ve kimyasallar.

Kullanılan Kimyasal ve Standartlar	Marka
Asetamiprid,(%99,8 Saflıkta,100 mg)	Sigma-Aldrich, Almanya
Klotiyanidin, (%99,8 Saflıkta,100 mg)	Sigma-Aldrich, Almanya
İmidakloprid, (%99,8 Saflıkta,100 mg)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tiyametoksam, (%99,8 Saflıkta,100 mg)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tiyaloprid, (%99,8 Saflıkta,100 mg)	Sigma-Aldrich, Almanya
Trifenilfosfat (IS),(%99,8 Saflıkta,0,25 g)	Dr. Ehrenstorfer, Almanya
Asetonitril- LC Saflıkta	İsolab, Almanya
Metanol-LC Saflıkta	İsolab, Almanya
Formik Asit	Merck, USA
Magnezyum Sülfat	Sigma-Aldrich, Japonya
Sodyum Klorür	Sigma-Aldrich, Danimarka
Amonyum Format	Sigma-Aldrich, Hindistan
Primer-Sekonder-Amin (PSA)	Agilent, USA
Sodyum sitrat Tribasik dihidrat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidrojen sitrat seksihidrat	Sigma-Aldrich, Belçika

2.3. Standart Çalışma Çözeltileri

Ana Standart Çözeltisi (1000 ppm): Çalışmada kullanılan toz halindeki asetamiprid standart maddesi için; hassas terazi de 0,0100 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılan standart madde koyu renkli bir şişeye konularak, üzerine 10 ml asetonitril (ACN) tamamlanarak 1000 ppm’lik ana standart çözeltisi hazırlandı.

Ara Standart Çözeltisi (1) (100 ppm): Ana standart çözeltisinden 1 ml alınarak üzerine 9 ml ACN ilave edilerek 10 ml tamamlandı. 100 ppm’lik ara standart (1) çözeltisi hazırlandı.

Ara Standart Çözeltisi (2) (10 ppm): Ara Standart çözeltisi (1) den 1ml alınarak üzerine 9 ml ACN ilave edilerek 10 ml tamamlandı. 10 ppm’lik ara standart çözeltisi (2) hazırlandı.

Ana standart çözeltisi, ara standart çözeltisi (1) ve ara standart çözeltisi (2) hazırlama aşamaları her bir standart klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid, tiametoksam, asetamiprid ve trifenilfosfat (IS) uygulandı. Tüm standartlar +4 C’de saklandı.

Çalışma Spike Çözeltisi Karışımı: Çalışılan standart maddelerini her biri baldaki maksimum kalıntı düzeylerine uygun olarak (bkz. Çizelge 2.3.) konsantrasyonları asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid ve tiametoksam 50 ng/g, tiyaloprid 200 ng/g düzeyinde olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla; asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid ve tiametoksam ait ara standart çözeltisi (1) den her bir standart için 1 ml alınarak üzerine 6 ml ACN ilave edilerek 10 ml tamamlandı. Tiyaloprid için ara standart çözeltisi (2) den 4 ml alındı. Üzerine 6 ml ACN ilave edilerek 10 ml tamamlandı.

İnternal Standart (IS) Çözelti: Trifenilfosfat için ara standart çözeltisi (1)(100 ppm) den 1ml alınarak üzerine 9 ml ACN ilave edildi. 10 ppm’lik ara standart çözeltisi

(2) hazırlandı. Hazırlanan 10 ppm’lik trifenilfosfat ara standart çözeltisi (2) çalışmada kullanıldı.

Mobil Faz A: Su (%0,1 Formik Asit), 1 litre distile su çam şişe içerisine doldurulur içerisinden 1 ml su alınır. Alınan su miktarı kadar (1 ml) Formik asit çözeltiye eklendi.

Mobil Faz B: Metanol (5 mM Amonyum Format), Amonyum format 0,3163 g/mol olacak şekilde hassas terazide tartıldı, 1 litre metanol olan çam şişe içerisine eklendi.

2.4. Araçlar ve Cihazlar

Kullanılan araç ve cihazlar Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Araç ve cihazlar.

Cihaz	Marka/Model
LC-MS/MS	Shimadzu, 80-40,Japonya
Santrifüj	Kubato, 5500
Vorteks	Heidolph Reax, Almanya
Hassas Terazi	Santorius
Ultra saf su Cihazı	Elga,6640
Yarı Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Azot altında Ucurma	Vlm Eva 1 Vis, Almanya

2.5. Likit Kromatografi ve Kütle Spektrometri Şartları (LC-MS/MS)

Çalışmada Shimadzu LC-MS/MS 8040 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresine bağlı Shimadzu HPLC kullanıldı. Akış hızı ise, 0,40 mL/dk dakika olarak ayarlandı. Enjeksiyon hacmi ise, 10 µL kullanıldı. Mobil faz A: Su (% 0,1 formik asit) ve Mobil faz B: Metanol (MEOH, 5mM amonyum format) kullanıldı. Analizler kantitatif ölçüm

için çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak ESI pozitif iyon modun da gerçekleşti. Gradyan programı; 0-1dakika (dk); %0-% 5 B; 1-6 dakika (dk); %5-% 95 B; 6-6,50 dakika (dk); %0-% 5 B olacak şekilde 7 dk program ayarlandı. Neonikotinoidlerin (asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid ve tiametoksam) herbiri 100 ppb olacak şekilde 6 tekrarlı cihaza enjeksiyon yapıldı. Tüm analitlerin MRM değerleri belirlendi. Kromatografik ayırma, bir C₁₈ koruma kolonuna bağlanmış Synergi (4 µm Max-RP 80 A 50 x 2mm) LC kolon ile 40 C’de yapıldı. Neonikotinoidlerin tutunma zamanları ve Mrm değerleri belirlendi. Hesaplamalar belirlenen Mrm değerleri kullanılarak yapıldı.

2.6. Özütleme

Bal örneklerinin LC-MS/MS cihazına uygulanabilir hale getirilmesi için yapılan ekstraksiyon işlemi, Mrzlikar ve ark. (2019) kullandığı yöntem kısmen modifiye edilerek gerçekleştirildi.

10 g bal numunesi polipropilen 50 ml’lik bir santrifüj tüpüne tartıldı. Üzerine 10 ml ultra saf su ve 10 ml Asetonitril ilave edildi. Karışıma 4 g magnezyum sülfat, 1 g sodyum klorür, 1 g tri sodyum sitrat ve 0,5 g di sodyum sitrat tuzları eklendi. Karışım 1 dk homojeniz oluncaya kadar elle çalkalandı. Daha sonra 3000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz 4 ml, 15 ml’lik cam tüpe aktarıldı. 900 g Magnezyum sülfat ve 150 g PSA (Primer Sekonder Amin) bulunan karışım üzerine eklendi ve 30 saniye boyunca vorteksle karıştırıldı. Daha sonra karışım 3000 rpm’de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Üst fazı temiz bir cam tüpe alındı ve azot altında 40°C sıcaklıkta uçuruldu.

Tüpte kalan kuru kalıntı 1 ml metanol/su (20/80) çözücü ile çözüldü. Elde edilen sıvı, 0,22 mikron çapındaki filtrelerden geçirilerek, LC-MS/MS cihazına enjeksiyon edildi.

2.7. Metot Validasyon

Metod validasyon çalışmaları, AB Komisyonu, 2002/657/EC sayılı kararına ve ICH'a göre gerçekleştirildi. Doğrusallık, kesinlik, spesifiklik, geri kazanım, tespit ve ölçüm limitleri, karar limiti tayin yeterliliği ve sağlamlık parametreleri belirlendi. Değerlendirme ise AB tarafından balda bulunmasına izin verilen kalıntı limitleri üzerinden yapıldı (Hau ve ark., 2019 ve Tanner ve ark., 2011).

2.7.1. Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisini elde etmek için; analizi yapılan maddelerin hiçbirini içermeyen 10 g miktarındaki bal (0 veya kör numune) ve analizi yapılan maddelerin MRL miktarlarının 0,5, 1, 1,5, 2 ve 5 katını içerecek şekilde oluşturulan numuneler (pozitif numune) hazırlandı. IS için de aynı işlemler yapıldı (Çizelge 2.4). Özütleme ile elde edilen örnekler cihaza enjekte edildi ve analitlerin her birinin kalibrasyon eğrisi çizildi. Yapılan bütün hesaplamalarda çizilen kalibrasyon eğrileri kullanıldı.

Çizelge 2.4. 10 gram bal örneğine katılan standart miktarları.

Analit	0,5 MRL	1 MRL	1,5 MRL	2 MRL	5 MRL
Asetamiprid	25 µl (25 ppb)	50 µl (50 ppb)	75 µl (75 ppb)	100 µl (100 ppb)	250 µl (250 ppb)
Klotiyanidin					
İmidakloprid					
Tiyametoksam					
Tiyaloprid	25 µl (100 ppb)	50 µl (200 ppb)	75 µl (300 ppb)	100 µl (400 ppb)	250 µl (1000 ppb)
Trifenilfosfat (IS)	100 µl (100 ppb)	100 µl (100 ppb)	100 µl (100 ppb)	100 µl (100 ppb)	100 µl (100 ppb)

3.7.2. Spesifiklik

İçinde aranan maddenin olmadığı bilinen 10 g bala MRL miktarın da standart karışım eklendi. Asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid ve tiametoksam için MRL'in

bir katı, tiyaloprid için ise MRL'in yarım katı olacak şekilde 100 ppb Trifenilfosfat (IS) eklenerek numuneler hazırlandı. Hazırlanan numuneler aynı metod ile çalışılıp, LC-MS/MS cihazına uygulandı.

2.7.3. Geri Kazanım

Geri kazanım değerleri, herbir analit için (klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid, tiametoksam, asetamiprid) 0,5, 1 ve 1,5 kat MRL oranında 3 farklı şekilde zenginleştirilen 6'şar adet numuneler analize alınarak yapıldı.

Mevcut derişim “%Geri kazanım=100xÖlçülen içerik/Güçlendirme seviyesi” formülü esas alınarak hesaplandı ve ortalaması alındı.

2.7.4. Kesinlik

Kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki bileşene göre yapıldı. Tekrarlanabilirlik için, herbir analit için (klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid, tiametoksam, asetamiprid) MRL'nin 0.5, 1 ve 1.5 katı oranında standart karışımı (IS ile birlikte) eklenerek (Çizelge 2.1) hazırlanan 6'şar örnek aynı kişi tarafından 3 farklı günde analize alınıp, her numunedeki mevcut derişim, ortalama derişim, standart sapma ve CV hesaplandı.

Tekrar üretilebilirlik, herbir analit için (klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid, tiametoksam, asetamiprid) MRL'nin 0.5, 1 ve 1.5 katı oranında standart karışımı (IS ile birlikte) eklenerek (Çizelge 2.3) hazırlanan 6'şar örnek farklı günde tekrarlanabilirlik çalışan farklı bir kişi tarafından analize alınıp, her numunedeki mevcut derişim, ortalama derişim, standart sapma ve CV hesaplandı.

2.7.5. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ için kör örnek Asetemiprid, Klotiyanidin, İmidakloprid, Tiyaetoksam ve Tiyakloprid'in 1 MRL seviyesinde standart ile zenginleştirildi. Zenginleştirilmiş kör ile 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin standart sapması hesaplandı.

$$\text{LOD (TESPİT LİMİTİ)} = 3 \cdot \text{SD}$$

$$\text{LOQ (ÖLÇÜM LİMİTİ)} = 10 \cdot \text{SD}$$

2.7.6. CC α ve CC β

CC α ve CC β , kesinlik bölümünde Anova tek etken excel yöntemi kullanılarak belirlenen MRL düzeyindeki Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı ($S_{R(MRL)}$) kullanılarak hesaplandı. CC α , MRL miktarı artı Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı ($S_{R(MRL)}$) 1,64 katı olarak ve CC β , CC α artı Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı ($S_{R(MRL)}$) 1,64 katı olarak hesaplandı.

2.7.7. Sağlamlık

Bu parametrede farklı analistler tarafından uzun dönemde deneyin gerçekleştirilmesi ile gerçekleştirilen matriks sağlamlığı test edildi. Spesifiklik parametresindeki veriler matriks sağlamlığı için eş anlı olarak kullanıldı. Kesinlik parametresi altında gerçekleştirilen laboratuvar içi üretilebilirlik çalışmalarında deneylerin farklı analistler tarafından gerçekleştirilmesi kapsamında üretilebilirlik sağlamlığı kontrol edildi.

2.7.8. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği hesaplamaları, Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metod Validasyonu/Verifikasyonu ile Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberine göre yapıldı (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018a ve Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018b).

Kesinlikten gelen birleştirilmiş tekrar üretilebilirlik birleştirilmiş belirsizliğinin hesaplanmasında ofis programı excel içinde bulunan veri çözümleme bölümde ‘Anova Tek Etken’ kullanılarak; Tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r), Grublar arasındaki standart sapma (S_b) ve Tekrar üretilebilirlik standart Sapması (S_R) bölüm 1.1.3. belirtilen formüller kullanılarak hesaplandı.

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapma değerleri aşağıdaki formülle birleştirilerek birleşik standart sapma değeri/ birleştirilmiş laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ölçüm belirsizliği değeri hesaplandı.

$$u_{\text{(Tekrar üretilebilirlik)}} = S_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2 \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$$

Gerçeklikten gelen birleştirilmiş belirsizliğin hesaplanmasın da ise, kirlenilmiş materyallerle yapılan gerçeklik çalışmasın da, geri kazanım değerinin istatistiksel olarak önemli derecede 1’den farklı olup olmadığı t-Testi ile belirlenir. t-Testi’nin formülü aşağıda verilmiştir.

$$t = \left| \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \right|$$

$\bar{x}$: Analiz sonuçları ortalaması, μ : Gerçek değer veya beklenen değer, s: Analiz sonuçlarının standart sapması, n: Analiz sayısı.

Hesaplanan t değeri t_{Tablo} değerinden küçük (t değeri < t_{Tablo}) olduğunda geri kazanım değeri 1’den farklı değildir.

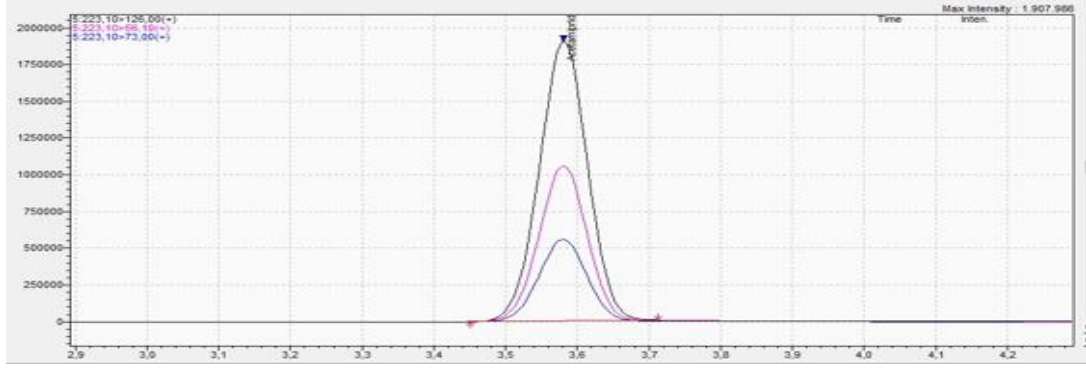
3. BULGULAR

Klotiyanidin, imidakloprid, tiyaloprid, tiyametoksam, asetamiprid ve IS olarak kullanılan trifenilfosfatın ESI pozitif iyon modun da çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak analitlerin kolondan çıkış zamanları ve belirlenen diğer değerleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Hesaplamalar Çizelge 3.1.'de verilen MRM değerlerine göre yapıldı.

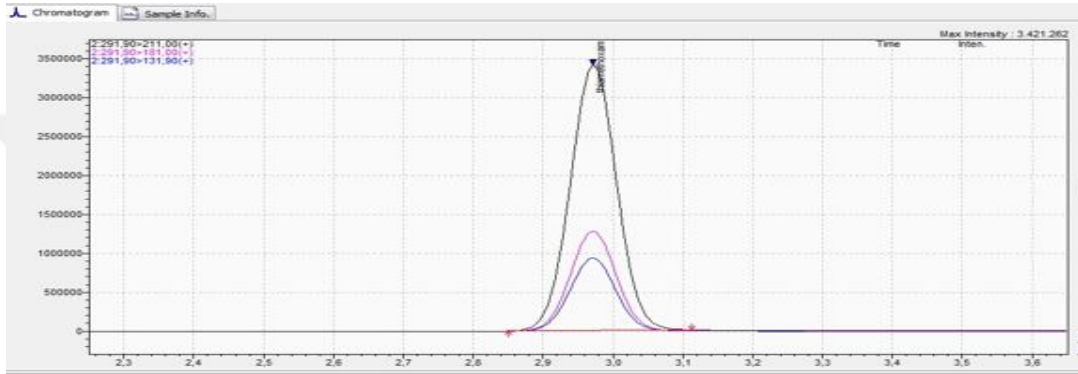
Çizelge 3.1. Neonikotinoidlerin MRM değerleri.

Analit	Kütle	Yavru İyon	Dwell Zaman	Polarite	Kolezyon Enerji	Tutunma Zamanı
Asetamiprid	223	Q1 126	24	Pozitif	23	3,592 (±0,05)
		Q2 56	24	Pozitif	17	3,592 (±0,05)
Klotiyanidin	249	Q1 169	38	Pozitif	12	3,349 (±0,05)
		Q2 131	38	Pozitif	16	3,349 (±0,05)
İmidakloprid	256	Q1 209	24	Pozitif	19	3,336 (±0,05)
		Q2 175	24	Pozitif	16	3,336 (±0,05)
Tiametoksam	291	Q1 211	24	Pozitif	13	2,952 (±0,05)
		Q2 181	24	Pozitif	24	2,952 (±0,05)
Tiyaloprid	252	Q1 126	24	Pozitif	21	3,832 (±0,05)
		Q2 90	24	Pozitif	40	3,832 (±0,05)
Trifenilfosfat (IS)	327	Q1 152	38	Pozitif	12	5,369 (±0,05)
		Q2 77	38	Pozitif	12	5,369 (±0,05)

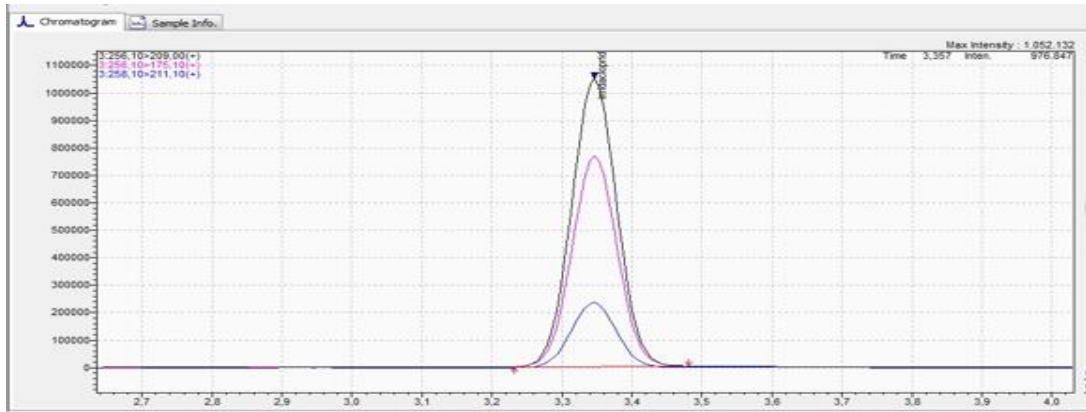
Asetamiprid (m/z 126, 56,10 ve 73), Tiyametoksam (m/z 211, 181 ve 131,90), İmidakloprid (m/z 209, 175,10 ve 211,10), Tiyakloprid (m/z 126, 90, 188 ve 119,90), Klotiyanidin (m/z 169 ve 131,90) ve Trifenilfosfat (IS) (m/z 152 ve 77) ile herbirinin yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı Şekil 3.1-Şekil 3.6'da verilmiştir.



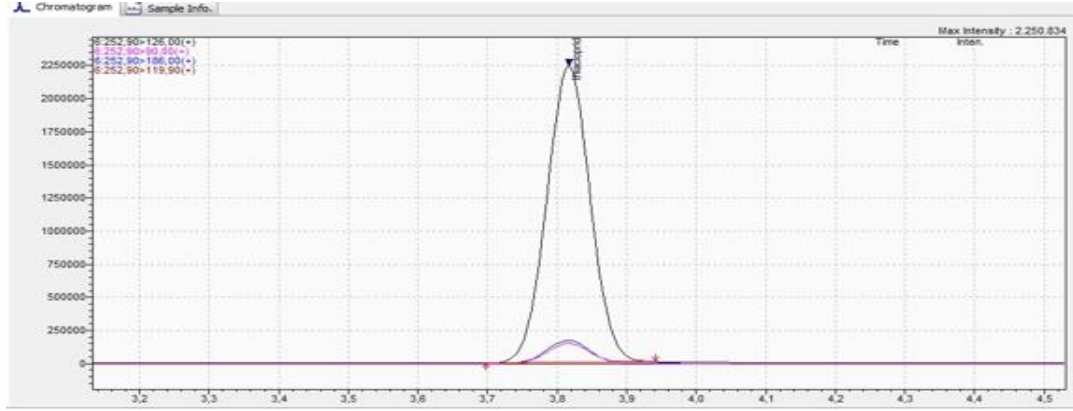
Şekil 3.1. Asetamiprid (m/z 126, 56,10 ve 73) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.



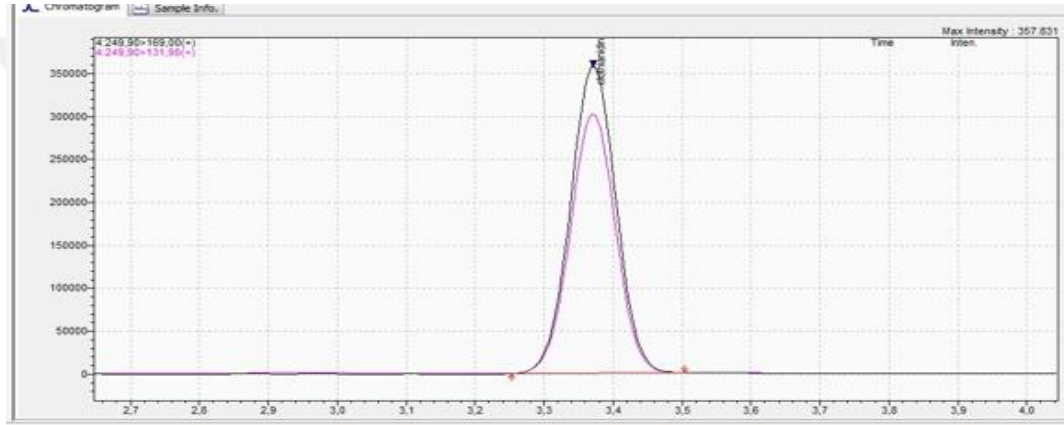
Şekil 3.2. Tiyametoksam (m/z 211, 181 ve 131,90) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.



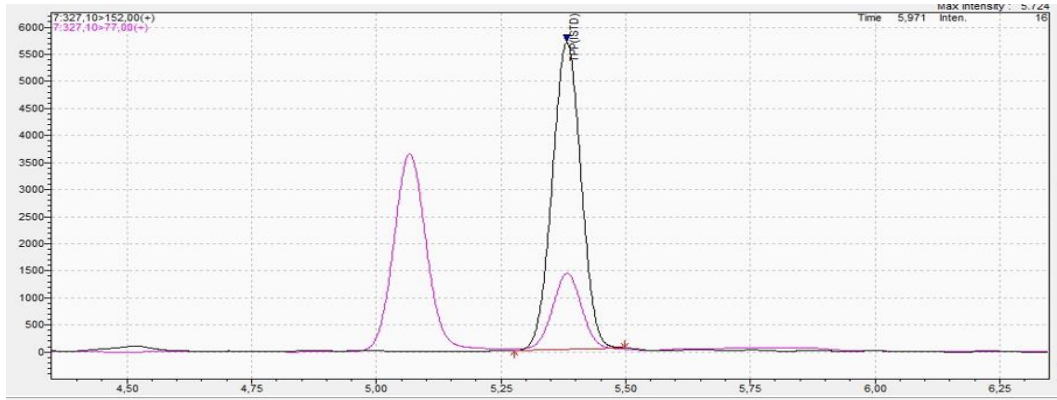
Şekil 3.3. İmidakloprid (m/z 209, 175,10 ve 211,10) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.



Şekil 3.4. Tiyakloprid (m/z 126, 90, 188 ve 119,90) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.

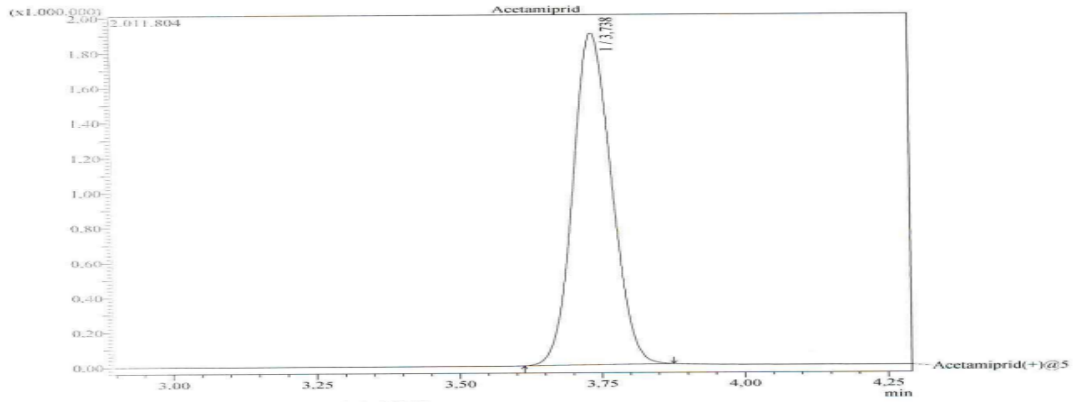


Şekil 3.5. Klotianidin (m/z 169 ve 131,90) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.

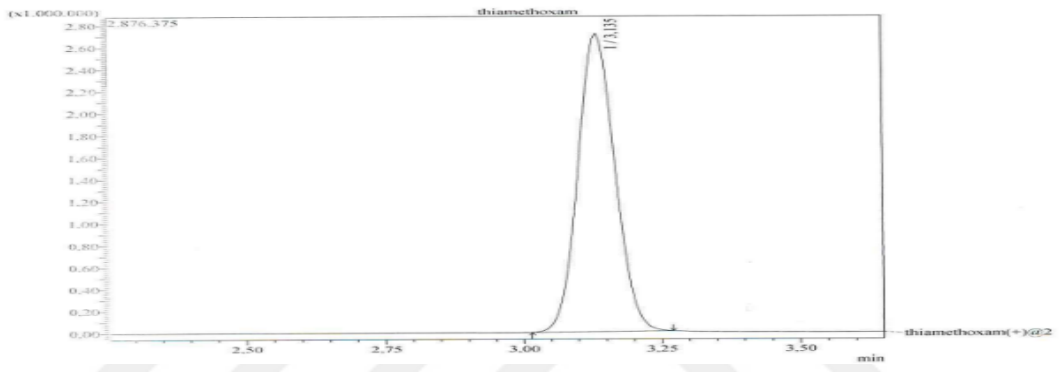


Şekil 3.6. Trifenilfosfat (IS) (m/z 152 ve 77) yavru iyonlarının LC-MS/MS kromatogramı.

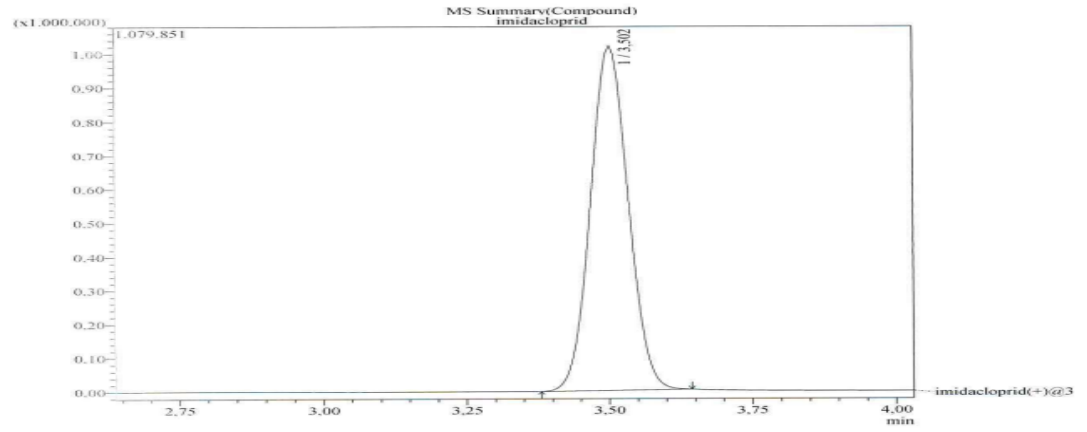
Asetamiprid, Tiyaetoksam, İmidakloprid, Tiyakloprid, Klotianidin ve Trifenilfosfat (IS) standartlarının LC-MS/MS kromatogramı Şekil 3.7-Şekil 3.12’de verilmiştir.



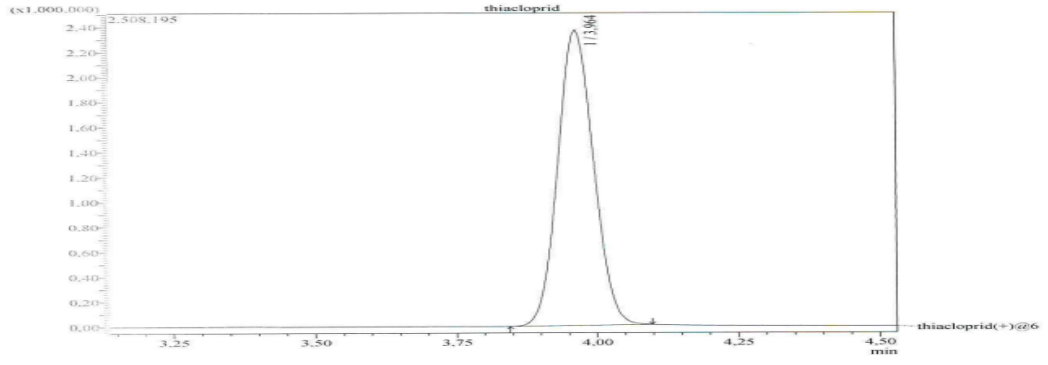
Şekil 3.7. Asetamiprid standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.



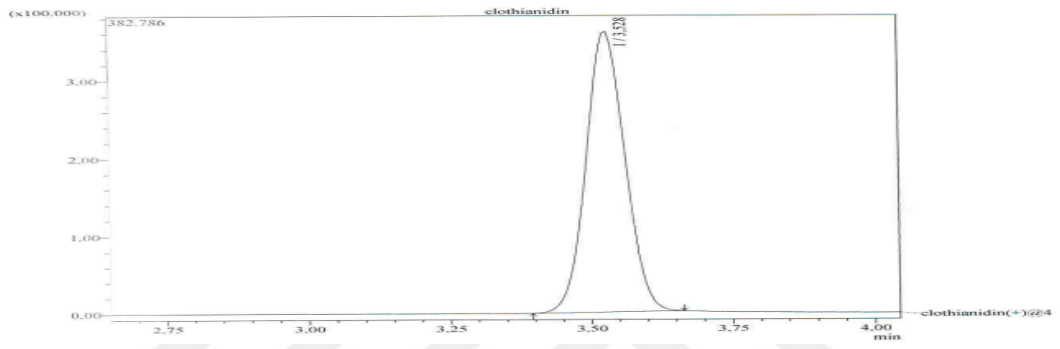
Şekil 3.8. Tiyaetoksam standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.



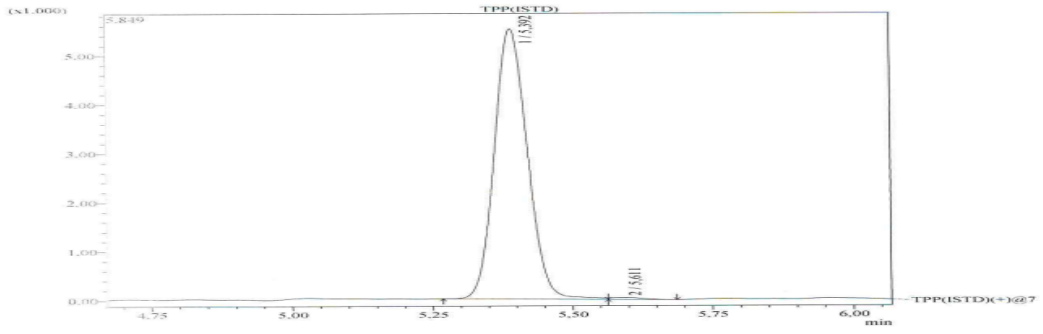
Şekil 3.9. İmidakolprid standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.10. Tiyakloprid 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.



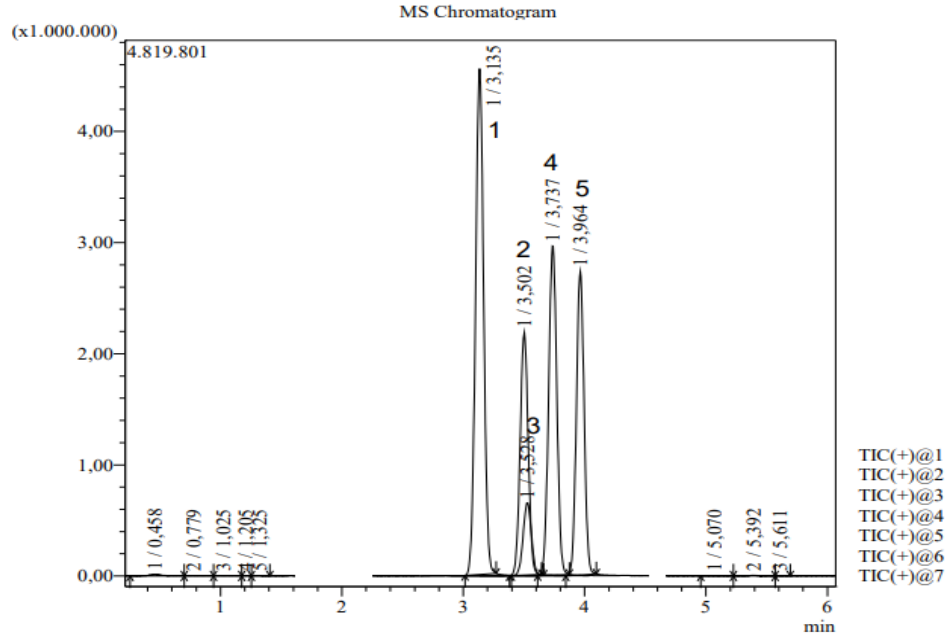
Şekil 3.11. Klotiyanidin standartının 1 MRL LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.



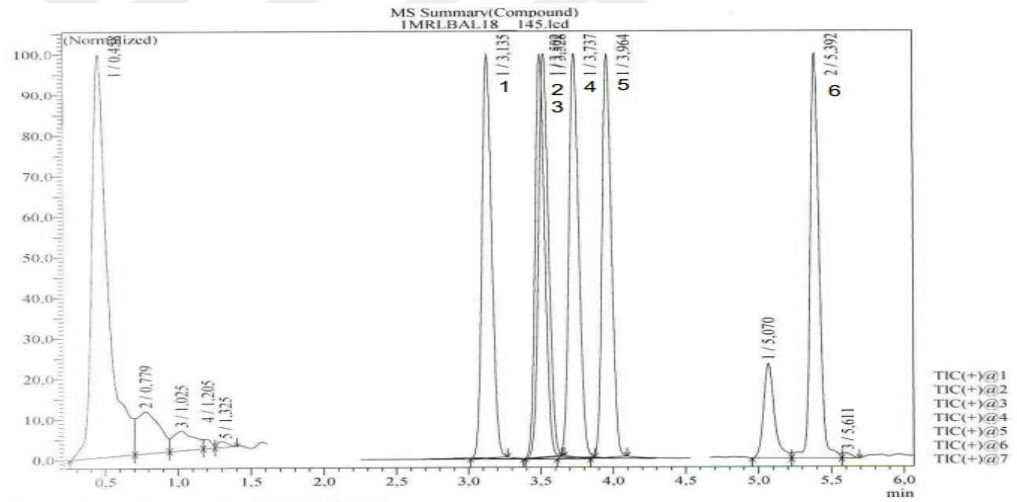
Şekil 3.12. Trifenilfosfat (IS) 100 ppb LC-MS/MS kromatogram görüntüsü.

Analitlerin; 1.000.000 x’de ve 100.0x’de 1 mrl baldaki kromatogram görüntüleri Şekil 3.13’de verilmiştir.

A)



B)



Şekil 3.13. A) 1.000.000 x’de analitlerin 1 mrl baldaki kromatogram görüntüsü. B) 100.0x’de analitlerin 1 mrl bal daki kromatogram görüntüsü 1-Tiyametoksam, 2-İmidakloprid, 3-Klotiyanidin, 4-Asetamiprid, 5- Tiyakloprid, 6- Trifenilfosfat (IS).

3.1. Lineer Ölçüm Aralığı (Doğrusallık)

Kalibrasyon eğrisi için klotiyanidin, imidakloprid, tiyakloprid, tiyametoksam ve asetamiprid’in MRL düzeylerinin 0,5-1-1,5-2-5 kat MRL olacak şekilde 5 ayrı konsantrasyonların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Tekrarlanılabilirlik

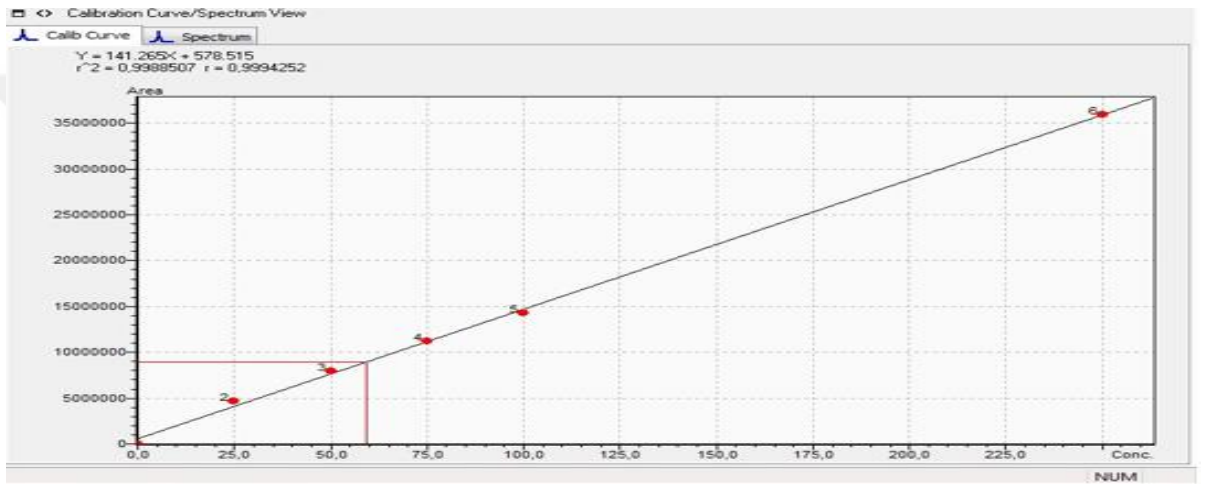
çalışmalarına ait 3 adet deney setine (1. Tekrarlanılabilirlik, 2. Tekrarlanılabilirlik ve 3. Tekrarlanılabilirlik), 4. Tekrarlanılabilirlik Çalışmaları ve 5. beşinci deney setinde kullanılmak üzere 10 adet kör numune ve 10 adet 1 MRL düzeyinde analitin eklenerek geri kazanılması çalışmasına (sağlamlık çalışması) ait linearite (kalibrasyon) bilgileri Çizelge 3.2 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kalibrasyon bilgileri/ linearite bilgileri.

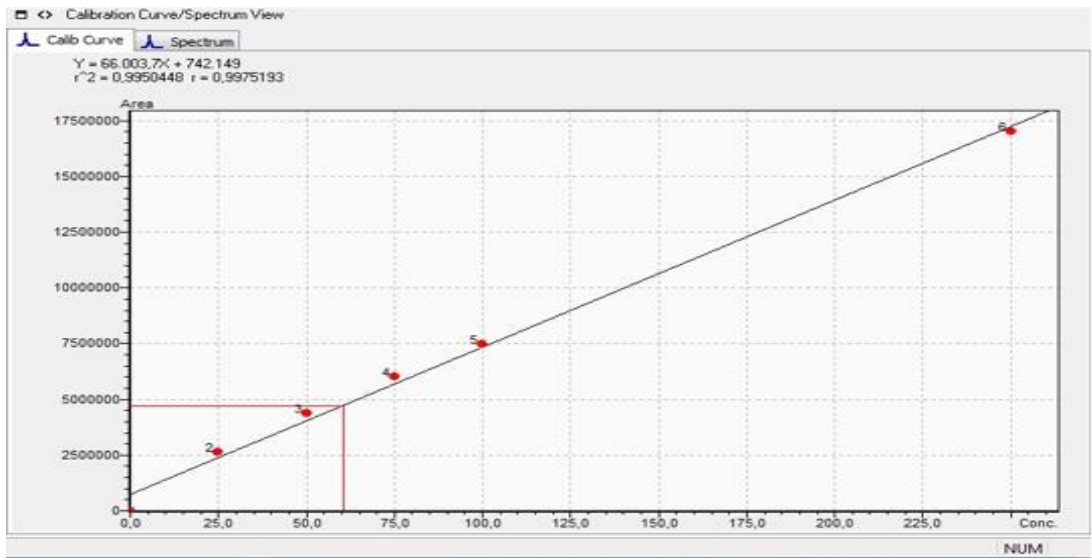
Analit	Günler	Kalibrasyon Doğrusu Denklemi ($y=ax+b$)	Kalibrasyon Katsayıları (R^2)
Asetamiprid	1 Gün	$Y=141.265x+578,515$	0,9994252
	2 Gün	$Y=148.010x+487,809$	0,9988346
	3 Gün	$Y=145.205x+388,657$	0,9985321
	4 Gün	$Y=7,83860e,600x+410,464$	0,9991080
	5 Gün	$Y=152,692x+927,269$	0,9964828
Klotiyanidin	1 Gün	$Y=21.382,2x+269,694$	0,9967681
	2 Gün	$Y=21.934,3x+253,360$	0,9935166
	3 Gün	$Y=23.700,3x+282,472$	0,9930336
	4 Gün	$Y=1,00841e,600x+218,873$	0,9968242
	5 Gün	$Y=27,266,8x+435,024$	0,9912213
İmidakloprid	1 Gün	$Y=66.003,7x+742,149$	0,9950448
	2 Gün	$Y=68.415,1x+530,260$	0,9974413
	3 Gün	$Y=68,415,3x+253,360$	0,9967530
	4 Gün	$Y=3,04831,006x+567,771$	0,9950000
	5 Gün	$Y=72,607,7x+856,199$	0,9946905
Tiyametoksam	1 Gün	$Y=253.169x+1.27784e+006$	0,9989692
	2 Gün	$Y=260,921x+1.03758e+006$	0,9986459
	3 Gün	$Y=254,041x+1.12758e+006$	0,9978059
	4 Gün	$Y=1,36426e,700x+253,360$	0,9993056
	5 Gün	$Y=246,664x+838,808$	0,9978059
Tiyaloprid	1 Gün	$Y=42.582,1x+420,108$	0,9956258
	2 Gün	$Y=43.322,0x+435,457$	0,9984002

3 Gün	$Y=44,514,1x+949,671$	0,9958612
4 Gün	$Y=8,90076e,006x+723,420$	0,9979077
5 Gün	$Y=50,237,1x+56,749,9$	0,9993628

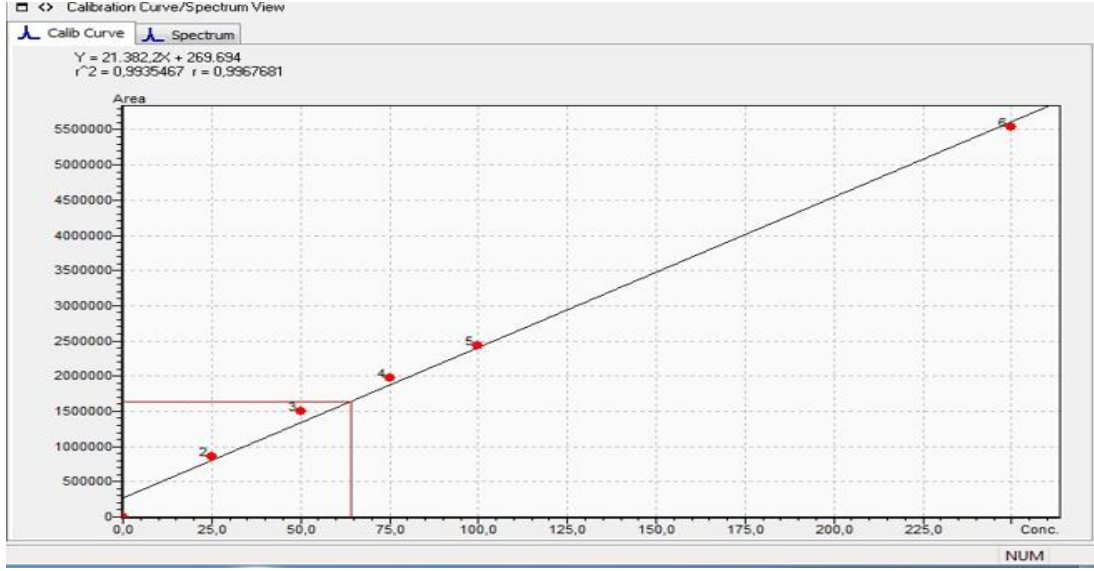
Asetamiprid, Tiyaetoksam, İmidakloprid, Tiyakloprid, Klotiyanidin ve Trifenilfosfat (IS) kalibrasyon doğruları Şekil 3.14-Şekil 3.18’de verilmiştir.



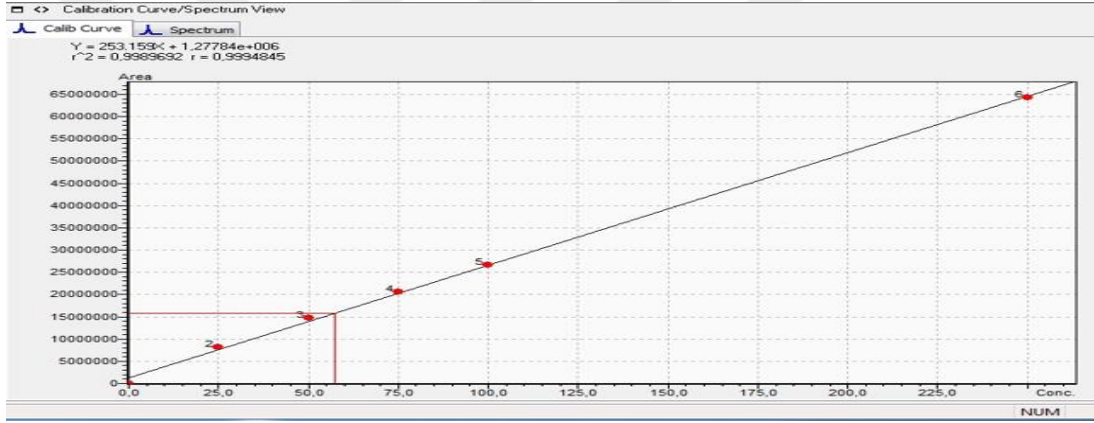
Şekil 3.14. Asetamiprid kalibrasyon doğrusu.



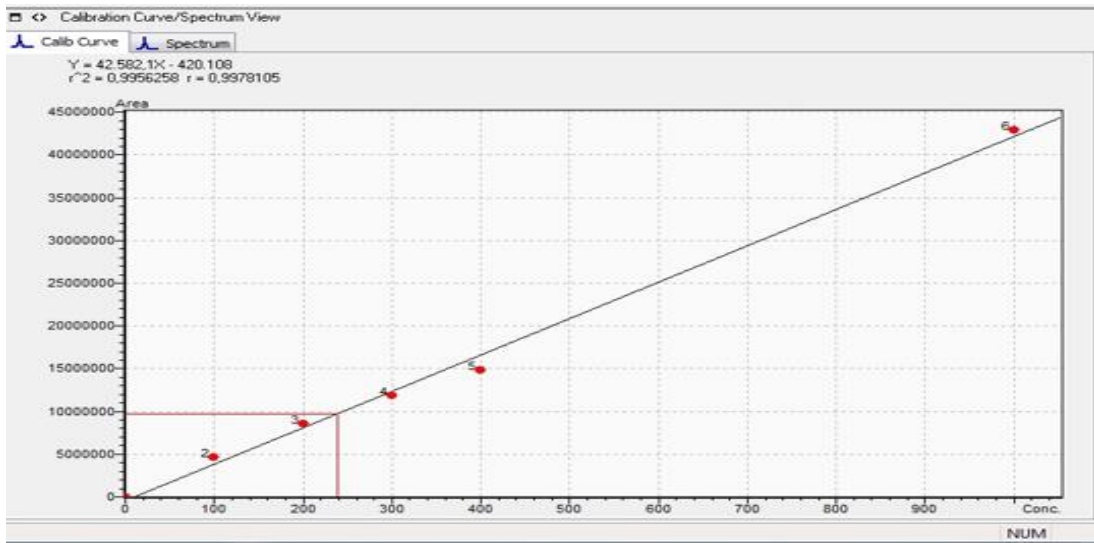
Şekil 3.15. İmidakloprid kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.16. Klotiyanodin kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.17. Tiyametoksam kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.18. Tiyakloprid kalibrasyon doğrusu.

3.2. Geri Alım ve Yüzde Geri Alım Sonuçları

Kör bir matrise bilinen analit miktarının eklenmesinin geri alınması yoluyla yapılan validasyon çalışmasında klotiyanidin, imidakloprid, tiyakloprid, tiyametoksam ve asetamiprid'in MRL düzeylerinin 0,5-1-1,5 MRLdüzeylerinin her birinde 6 şar adet tekrarların yapıldığı dört ayrı deney seti (1. Tekrarlanabilirlik, 2. Tekrarlanabilirlik, 3. Tekrarlanabilirlik ve 4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları) ile matriks sağlamlığı hesaplamasında kullanılmak üzere 10 adet kör numune ve 10 adet 1 MRL düzeyinde analitin eklenerek geri kazanılması çalışmasının yapıldığı 5. deney verisi için ortalama yüzde geri alım (% geri alım), ortalama yüzde standart sapma (%SD), ortalama yüzde varyans katsayısı (%CV) değerleri hesaplanmış. asetamiprid, imidakloprid, klotiyanidin, tiyametoksam ve tiyakloprid için hesaplanan sonuçlar Çizelge 3.26- 3.27'de verilmiştir.

Analitik yöntemlerin performansı ve sonuçların yorumu ile ilgili 96/23/EC Konsey Direktifini Uygulama 2002/657/EC Direktifinde yer alan 2.3.2. Nicel analiz yöntemleri için ek performans ölçütleri ve diğer gereklilikler ve 2.3.2.1. Nicel yöntemlerin gerçekliği parametresinde; Çizelge 3.26- 3.30'da yer alan Ortalama % Geri Alım değerlerimiz kabul edilebilir doğrulukta hesaplandığı görülmüştür.

Nicel yöntemlerin minimum gerçekliği parametresinde kabul edilen geri alım değerleri.

Kitle parçası	Aralık
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- %50 ilâ +%20
$> 1 \mu\text{g/kg}$ ilâ $10 \mu\text{g/kg}$	- %30 ilâ + %10
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	- %20 ilâ + %10

Analitik yöntemlerin performansı ve sonuçların yorumu ile ilgili 96/23/EC Konsey Direktifini Uygulama 2002/657/EC Direktifinde yer alan 2.4.2.2. Niceliksel Yöntemlerin Kesinliği parametresinde; bir referans veya güçlendirilmiş materyalin tekrarlanmış analizi için laboratuvarlar-arası sapma katsayısı (CV), üretilebilirlik

koşulları altında, değişimin iç-laboratuar katsayısı Horwitz denklemince hesaplanan düzeyi aşmamalıdır kriteri yer almaktadır. Çizelge 3.3’de Neonikotinoidlerin CV_{kritik} değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Neonikotinoidlerin CV_{kritik} değerleri.

Analit	Konsantrasyon (ng/g)	CV_{kritik}
Asetamiprid, Klotiyanidin, İmidakloprid,Tiyametoksam	2,5	39
	5	36
	7,5	33
Tiyakloprid	10	32
	20	29
	30	27

Horwitz Denklemi $CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$ Burada C, 10'nun bir gücü (üssü) olarak ifade edilmiş kitle bölümüdür (örneğin $1 \text{ mg/g} = 10^{-3}$).

Bu kritere göre Çizelge 3.31’de yer alan ortalama % CV değerleri ilgili kritere uyduğu için kabul edilebilir kesinlikte hesaplandığı görülmüştür.

3.3. Spesifiklik

Bu parametrede, 20 farklı numune (10 farklı kör matriks ve 10 farklı mrl düzeyde spike yapılmış matriks) kullanıldı. Asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyametoksam ve tiyaloprid maddeleri IS olarak kullanılan trifenilfosfat ile birlikte aynı metot ile çalışılıp, LC-MS/MS cihazına verildi. Hedef analitlerin elüsyona uğramasının beklendiği noktada herhangi bir çakışma olup olmadığı (sinyaller, pikler, iyon izleri vb.) kontrol edildi. Herbir maddenin analiz kromatogramlarının etkilenmediği görüldü. Bu analitlere özgü aşağıda Çizelge 4.1’de verilen MRM değerleri spesifiklik bakımından tekdir.

3.4. Kesinlik

Kör bir matrikse bilinen analit miktarının eklenmesinin geri kazanılması vasıtasıyla yapılan validasyon çalışmasında 0,5-1-1,5 MRL düzeylerinin her birinde 6 şar adet tekrarların yapıldığı dört ayrı deney seti verisinden ISO 5725-2: 2019'a göre Excel'de Anova Tek etken Varyans Analizi ile tekraredebilirlik S_r^2 ve laboratuvar içi üretilebilirlik SRw^2 ve gün içi tekrardan gelen S_{days}^2 varyansları hesaplandı. Çizelge 3.34'de ISO 5725-2: 2019 göre tekrarlanabilirlik sonuçları verilmiştir. Anova Tek Etkene göre, Tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r), Gruplar arasındaki standart sapma (S_b) ve Tekrar üretilebilirlik standart Sapması (S_R) sonuçları hesaplandı. Çizelge 3.33'da Anova Tek Etkene göre, Tekrarlanabilirlik standart sapması (S_r), Gruplar arasındaki standart sapma (S_b) ve Tekrar üretilebilirlik standart Sapması (S_R) sonuçları verilmiştir. Anova Varyans Analizi Tablosunda $F < F$ ölçütü kriteri kontrolü yapılarak validasyon çalışması sonuçlarının aynı yığından geldiği görüldü. Asetamiprid, İmidaklopid, Klotiyanidin, Tiyametoksam ve Tiyaklopid için Anova Varyans Analizi Tablosu Çizelge 3.4-3.18'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Asetamiprid 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET							
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans			
Sütun 1	6	150,141	25,0235	0,4346575			
Sütun 2	6	148,44	24,74	0,7592852			
Sütun 3	6	154,4	25,73333333	0,982207867			
Sütun 4	6	151,025	25,17083333	0,337820567			
0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0			
ANOVA	0	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü	
Gruplar Arasında	3,142016167	3	1,047338722	1,666429194	0,2061723	3,098392654	
Gruplar İçinde	12,56985567	20	0,628492783	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	

Asetamiprid 2,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.5. Asetamiprid 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6	298,33	49,7216666 7	5,456689067		
Sütun 2	6	305,354	50,8923333 3	4,284627467		
Sütun 3	6	308,354	51,3923333 3	7,557827467		
Sütun 4	6	310,222	51,7036666 7	11,48154907		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	13,64265267	3	4,54755088 9	0,632027989	0,602924 7	3,09839265 4
Gruplar İçinde	143,9034653	20	7,19517326 7	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Asetamiprid 5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.6. Asetamiprid 7.5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6	451,607	75,2678333 3	9,323864967		
Sütun 2	6	447,367	74,5611666 7	1,856810167		
Sütun 3	6	453,735	75,6225 3	4,6929755		
Sütun 4	6	449,801	74,9668333 3	8,952986967		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	3,654989833	3	1,21832994 4	0,196293991	0,897676 9	3,09839265 4
Gruplar İçinde	124,133188	20	6,2066594 0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Asetamiprid 7,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

2,5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{0,628493} = 0,792775$$

$$S_b = \sqrt{((1,047339 - 0,628493)/6)} = 0,264211$$

$$S_R = \sqrt{((0,792775)^2 + (0,264211)^2)} = 0,2758$$

5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{7,195173} = 2,682382$$

$$S_b = \sqrt{((4,547550889 - 7,195173)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((2,682382)^2 + (0)^2)} = 2,682$$

7,5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{6,206659} = 2,491317$$

$$S_b = \sqrt{((6,206659 - 1,218329944)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((2,491317)^2 + (0)^2)} = 2,491$$

$$S_{pool} = \sqrt{(23 \cdot 0,02758^2) + (23 \cdot 0,268^2) + (23 \cdot 0,2491^2) / (23 + 23 + 23)} \\ = 0,18$$

$$t = (x_{ort} - \mu) / (s / \sqrt{n})$$

$$= |100,8874 - 1| / (0,193 / 8,49) = 0,3901$$

T tablo n-1 (n=72) %95 güven aralığında 1,67

t değeri < T tablo olduğundan ortalama geri kazanım değeri 1'den farklı değildir.

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik = ortalama standart sapma / $\sqrt{n}$

$$= 0,193 / 8,49 = 0,023$$

Çizelge 3.7. İmidakloprid 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET				
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Sütun 1	6	149,902	24,98366667	0,460234267

Sütun 2	6	149,998	24,99966667	0,910807867		
Sütun 3	6	148,998	24,833	0,5809412		
Sütun 4	6	147,473	24,57883333	0,821837367		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,684488458	3	0,228162819	0,329023169	0,804401	3,098392654
Gruplar İçinde	13,8691035	20	0,693455175	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

İmidaklopid 2,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.8. İmidaklopid 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6	299,941	49,9901666	1,280333367		
Sütun 2	6	302,375	50,3958333	0,691369767		
Sütun 3	6	302,38	50,3966666	0,781440267		
Sütun 4	6	303,142	50,5236666	0,665869867		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,9703515	3	0,3234505	0,378413858	0,769570	3,09839265
Gruplar İçinde	17,09506633	20	0,85475331	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

İmidaklopid 5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.9. İmidaklopid 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET				
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Sütun 1	6	446,649	74,4415	2,1779771

Sütun 2	6	447,275	74,54583333	2,875965367		
Sütun 3	6	446,214	74,369	1,9295668		
Sütun 4	6	451,447	75,24116667	1,113438167		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	2,896562458	3	0,965520819	0,476980159	0,7018542	3,098392654
Gruplar İçinde	40,48473717	20	2,024236858	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

İmidakloprid 7,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

2,5 ng/g için

$$Sr = \sqrt{0,693455} = 0,83$$

$$Sb = \sqrt{((0,228162819 - 0,693455)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$SR = \sqrt{((0,83)^2 + (0)^2)} = 0,83$$

5 ng/g için

$$Sr = \sqrt{0,854753317} = 0,92$$

$$Sb = \sqrt{((0,3234505 - 0,854753317)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$SR = \sqrt{((0,92)^2 + (0)^2)} = 0,92$$

7,5 ng/g için

$$Sr = \sqrt{2,024237} = 0,142$$

$$Sb = \sqrt{((0,965520819 - 2,024237)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$SR = \sqrt{((0,142)^2 + (0)^2)} = 0,142$$

$$\begin{aligned} Spool &= \sqrt{(23 \cdot 0,083^2) + (23 \cdot 0,092^2) + (23 \cdot 0,142^2)} / (23 + 23 + 23) \\ &= 0,11 \end{aligned}$$

$$t = (x_{\text{ort}} - \mu) / (s / \sqrt{n})$$

$$= |99,86 - 1| / (0,10 / \sqrt{8,49}) = 0,12$$

T tablo n-1(n=72) %95 güven aralığında 1,67

t değeri < Ttablo olduğundan ortalama geri kazanım değeri 1'den farklı değildir.

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik =ort standart sapma/ $\sqrt{n}$

$$=0,10/8,49=0,01$$

Çizelge 3.10. Klotiyanidin 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET							
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans			
Sütun 1	6	150,025	25,00416667	1,176586567			
Sütun 2	6	152,215	25,36916667	0,784187767			
Sütun 3	6	149,721	24,9535	0,4924059			
Sütun 4	6	153,601	25,60016667	0,350233367			
0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0			
ANOVA	0	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü	
Gruplar Arasında	1,7029885	3	0,567662833	0,809959448	0,5032268	3,098392654	
Gruplar İçinde	14,017068	20	0,7008534	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	

Klotiyanidin 2,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.11. Klotiyanidin 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET							
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans			
Sütun 1	6	301,043	50,17383333	1,639186567			
Sütun 2	6	301,417	50,23616667	1,497654567			
Sütun 3	6	305,597	50,93283333	1,592238567			
Sütun 4	6	298,761	49,7935	3,4379071			
0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0			
ANOVA	0	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü	
Gruplar Arasında	4,055997833	3	1,351999278	0,662177771	0,5849589	3,098392654	
Gruplar İçinde	40,834934	20	2,0417467	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	

Klotiyanidin 5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür

Çizelge 3.12. Klotiyanidin 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET							
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans			
Sütun 1	6	446,826	74,471	2,2276408			
Sütun 2	6	442,999	73,83316667	1,224367767			
Sütun 3	6	441,045	73,5075	2,7932931			
Sütun 4	6	454,006	75,66766667	5,145033067			
0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0			
ANOVA	0	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü	
Gruplar Arasında	16,35741567	3	5,452471889	1,914771433	0,159719	3,098392654	
Gruplar İçinde	56,95167367	20	2,847583683	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	

Klotiyanidin 7,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür

2,5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{0,7008534} = 0,84$$

$$S_b = \sqrt{((0,567662833 - 0,7008534)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,084)^2 + (0)^2)} = 0,084$$

5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{2,0417467} = 0,143$$

$$S_b = \sqrt{((1,351999278 - 2,0417467)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,143)^2 + (0)^2)} = 0,143$$

7,5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{2,847583683} = 0,169$$

$$S_b = \sqrt{((5,452471889 - 2,847583683)/6)} = 0,659$$

$$S_R = \sqrt{((0,169)^2 + (0,659)^2)} = 0,680$$

$$\text{Spool} = \sqrt{(23 \cdot 0,084^2) + (23 \cdot 0,143^2) + (23 \cdot 0,680^2) / (23 + 23 + 23)}$$

$$= 0,40$$

$$t = (x_{\text{ort}} - \mu) / (s / \sqrt{n})$$

$$= |100,22 - 1| / (0,13 / 8,49) = 0,14$$

T tablo n-1 (n=72) %95 güven aralığında 1,67

t değeri < Ttablo olduğundan ortalama geri kazanım değeri 1'den farklı değildir.

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik = ortalama standart sapma / $\sqrt{n}$

$$= 0,13 / 8,49 = 0,016$$

Çizelge 3.13. Tiyametoksam 2,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6,00	146,91	24,49	0,69		
Sütun 2	6,00	148,94	24,82	1,08		
Sütun 3	6,00	150,44	25,07	0,81		
Sütun 4	6,00	148,63	24,77	0,59		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
ANOVA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	1,04	3,00	0,35	0,44	0,73	3,10
Gruplar İçinde	15,88	20,00	0,79	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tiyametoksam 2,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür

Çizelge 3.14. Tiyametoksam 5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET				
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans
Sütun 1	6,00	300,52	50,09	2,37

Sütun 2	6,00	301,36	50,23	1,23		
Sütun 3	6,00	304,31	50,72	0,27		
Sütun 4	6,00	300,53	50,09	0,44		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
ANOVA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	1,62	3,00	0,54	0,50	0,69	3,10
Gruplar İçinde	21,58	20,00	1,08	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tiyametoksam 5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür

Çizelge 3.15. Tiyametoksam 7,5 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6,00	450,48	75,08	1,53		
Sütun 2	6,00	447,83	74,64	0,41		
Sütun 3	6,00	448,75	74,79	1,06		
Sütun 4	6,00	447,64	74,61	1,85		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
ANOVA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,84	3,00	0,28	0,23	0,87	3,10
Gruplar İçinde	24,26	20,00	1,21	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tiyametoksam 7,5 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür

2,5 ng/g için

$$Sr = \sqrt{0,79} = 0,09$$

$$Sb = \sqrt{((0,35 - 0,79)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$SR = \sqrt{((0,09)^2 + (0)^2)} = 0,09$$

5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{1,08} = 0,10$$

$$S_b = \sqrt{((0,54 - 1,08)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,10)^2 + (0)^2)} = 0,10$$

7,5 ng/g için

$$S_r = \sqrt{1,21} = 0,11$$

$$S_b = \sqrt{((0,28 - 1,21)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,11)^2 + (0)^2)} = 0,11$$

$$S_{pool} = \sqrt{(23 \cdot 0,09^2) + (23 \cdot 0,10^2) + (23 \cdot 0,11^2) / (23 + 23 + 23)} \\ = 0,10$$

$$t = (x_{\text{ort}} - \mu) / (s / \sqrt{n})$$

$$= |99,81 - 1| / (0,10 / 8,49) = 0,17$$

T tablo n-1 (n=72) %95 güven aralığında 1,67

t değeri < T tablo olduğundan ortalama geri kazanım değeri 1'den farklı değildir.

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik = ortalama standart sapma / $\sqrt{n}$

$$= 0,10 / 8,49 = 0,01$$

Çizelge 3.16. Tiyakloprid 10 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET							
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans			
Sütun 1	6	600,48	100,08	3,2676624			
Sütun 2	6	601,536	100,256	3,1411072			
Sütun 3	6	594,023	99,00383333	2,000088167			
Sütun 4	6	595,176	99,196	2,9606848			
0	0	0	0	0			
0	0	0	0	0			
ANOVA	0	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü	
Gruplar Arasında	7,048524125	3	2,349508042	0,82659721	0,494682	3,0983927	
Gruplar İçinde	56,84771283	20	2,842385642	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	

Tiyaklopid 10 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.17. Tiyaklopid 20 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6	1200,514	200,0856667	1,834953867		
Sütun 2	6	1208,584	201,4306667	3,072637867		
Sütun 3	6	1197,38	199,5633333	5,115876667		
Sütun 4	6	1195,651	199,2751667	7,886295767		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	16,43238213	3	5,477460708	1,22334625	0,327186	3,0983927
Gruplar İçinde	89,54882083	20	4,477441042	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Tiyaklopid 20 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.18. Tiyaklopid 30 ng/g seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısı.

ÖZET						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	6	1778,723	296,4538333	19,56831537		
Sütun 2	6	1785,128	297,5213333	3,096573867		
Sütun 3	6	1785,128	297,5213333	3,096573867		
Sütun 4	6	1783,63	297,2716667	2,656852267		
0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0		
ANOVA	0	0	0	0	0	0
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	4,608946125	3	1,536315375	0,216242991	0,883961	3,0983927
Gruplar İçinde	142,0915768	20	7,104578842	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Tiyaklopid 30 (ng/g) seviyesinde 1-2-3-4. tekrarlanılabilirlik anova çıktısından $F < F$ ölçütü olduğu görülmüş olup, sonuçların aynı yığında geldiği ve tekrarklanabilir olduğu görülmüştür.

10 ng/g için

$$S_r = \sqrt{2,842385642} = 0,168594$$

$$S_b = \sqrt{((2,349508042 - 2,842385642)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,168594)^2 + (0)^2)} = 0,169$$

20 ng/g için

$$S_r = \sqrt{4,477441042} = 2,682382$$

$$S_b = \sqrt{((5,477460708 - 4,477441042)/6)} = 0,041$$

$$S_R = \sqrt{((0,169)^2 + (0,041)^2)} = 0,173$$

30 ng/g için

$$S_r = \sqrt{7,104578842} = 0,267$$

$$S_b = \sqrt{((1,536315375 - 7,104578842)/6)} = \text{Sonuç 0 kabul edildi.}$$

$$S_R = \sqrt{((0,267)^2 + (0)^2)} = 0,267$$

$$S_{pool} = \sqrt{(23 \cdot 0,169^2) + (23 \cdot 0,173^2) + (23 \cdot 0,267^2) / (23 + 23 + 23)} \\ = 0,208$$

$$t = (x_{ort} - \mu) / (s / \sqrt{n})$$

$$= |99,56 - 1| / (0,22 / 8,49) = 0,17$$

T tablo n-1 (n=72) %95 güven aralığında 1,67

t değeri < Ttablo olduğundan ortalama geri kazanım değeri 1'den farklı değildir.

Geri kazanımdan gelen standart belirsizlik = ortalama standart sapma / $\sqrt{n}$

$$= 0,22 / 8,49 = 0,025$$

3.5. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ çalışmaları için, her biri 10 g ağırlığında 10 farklı bal numunesi kullanılarak asetamiprid, imidakloprid, klotiyanidin, tiyametoksam ve tiyakloprid'i içeren standart karışımdan ölçüm sonucu 1 MRL olarak hazırlanan spike numuneleri kullanılmış ve 10 kez bağımsız ölçüm yapılmıştır. Yapılan bu ölçümlerin standart çarpması 3 ile çarpılarak Tayin limiti (LOD)'nin ve 10 ile çarpılarak Ölçüm limiti (LOQ)'nun değerleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 3.34 'de verilmiştir.

3.6. CC α ve CC β

CC α ve CC β , kesinlik bölümünde Anova tek etken excel yöntemi kullanılarak belirlenen MRL düzeyindeki Tekrarüretilebilirlik Varyans Katsayısı ($S_{R(MRL)}$) kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.19'da her bir madde için MRL düzeylerin de CC α ve CC β değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.19. Analitlerin CCA α (CC α) ve CCB β (CC β) değerleri (ng/g).

Analit	CC α	CC β
Asetamiprid	$5+1,64*0,27=5,44$	$5,44+1,64*0,27=5,89$
Klotiyanidin	$5+1,64*0,14=5,23$	$5,23+1,64*0,14=5,46$
İmidakloprid	$5+1,64*0,09=5,15$	$5,15+1,64*0,09=5,30$
Tiyametoksam	$5+1,64*0,10=5,16$	$5,16+1,64*0,10=5,32$
Tiyakloprid	$20+1,64*0,17=20,28$	$20,28+1,64*0,17=20,56$

3.7. Sağlamlık

Metodun sağlamlık parametresinde; matriks sağlamlığı ile farklı analistler tarafından uzun dönemde deneylerin gerçekleştirilmesi verileri değerlendirildi. Spesifiklik parametresindeki veriler matriks sağlamlığı için, laboratuvar içi üretilebilirlik çalışmalarında deneylerin farklı analistler tarafından gerçekleştirilmesi kapsamında üretilebilirlik sağlamlığı ile ilgili değerler Çizelge 4.9'da verilmiştir.

3.8. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği hesaplamaları yapılırken validasyon çalışmasındaki kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik) ve geri kazanım verilerinden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. Asetamiprid, İmidakolprid, Klotiyanidin, Tiyametoksam ve Tiyakloprid için yapılan ölçüm belirsizliği hesaplamaları Çizelge 3.20.-3.24’de verilmiştir.

Çizelge 3.20. Asetamiprid ‘in ölçüm belirsizliği hesaplamaları.

Gerçeklikten gelen belirsizlik	ort standart sapma/ $\sqrt{n}$	$0,193/\sqrt{72}=0,023$
Kesinlikten (Tekrarlanabilirlik ve Lab. içi Tekrar üretilebilirlikten) gelen belirsizlik	0,18	
$U(\text{birleştirilmiş bel.})=\sqrt{(U \text{ gerç. bel.})^2 + (U \text{ tek. üret. bel.})^2}$	$\sqrt{(0,023)^2 + (0,18)^2}=0,18$	
$U(\text{Genişletilmiş})= U(\text{birleştirilmiş bel.}) * k$ (%95 güven aralığında $k=2$)	0,36	

Çizelge 3.21. İmidakloprid’in ölçüm belirsizliği hesaplamaları.

Gerçeklikten gelen belirsizlik	ort standart sapma/ $\sqrt{n}$	$0,10/\sqrt{72}=0,01$
Kesinlikten (Tekrarlanabilirlik ve Lab. içi Tekrar üretilebilirlikten) gelen belirsizlik	0,11	
$U(\text{birleştirilmiş bel.})=\sqrt{(U \text{ gerç. bel.})^2 + (U \text{ tek. üret. bel.})^2}$	$\sqrt{(0,01)^2 + (0,11)^2}=0,11$	
$U(\text{Genişletilmiş})= U(\text{birleştirilmiş bel.}) * k$ (%95 güven aralığında $k=2$)	0,22	

Çizelge 3.22. Klotiyanidin’in ölçüm belirsizliği hesaplamaları.

Gerçeklikten gelen belirsizlik	ort standart sapma/ $\sqrt{n}$	$0,193/\sqrt{72}=0,016$
Kesinlikten (Tekrarlanabilirlik ve Lab. içi Tekrar üretilebilirlikten) gelen belirsizlik	0,40	
$U(\text{birleştirilmiş bel.})=\sqrt{(U \text{ gerç. bel.})^2 + (U \text{ tek. üret. bel.})^2}$	$\sqrt{(0,016)^2 + (0,40)^2}=0,40$	
$U(\text{Genişletilmiş})= U(\text{birleştirilmiş bel.}) * k$ (%95 güven aralığında $k=2$)	0,80	

Çizelge 3.23. Tiyametoksam’ın ölçüm belirsizliği hesaplamaları.

Gerçeklikten gelen belirsizlik	ort standart sapma/ $\sqrt{n}$	$0,10/\sqrt{72}=0,01$
Kesinlikten (Tekrarlanabilirlik ve Lab. içi Tekrar üretilebilirlikten) gelen belirsizlik	0,10	

$U(\text{birleştirilmiş bel.})=\sqrt{(U \text{ gerç bel.})^2 + (U \text{ tek.üret.bel.})^2}$	$\sqrt{(0,01)^2 + (0,10)^2}=0,10$
$U(\text{Genişletilmiş})= U(\text{birleştirilmiş bel.}) * k$ (%95 güven aralığında k=2)	0,20

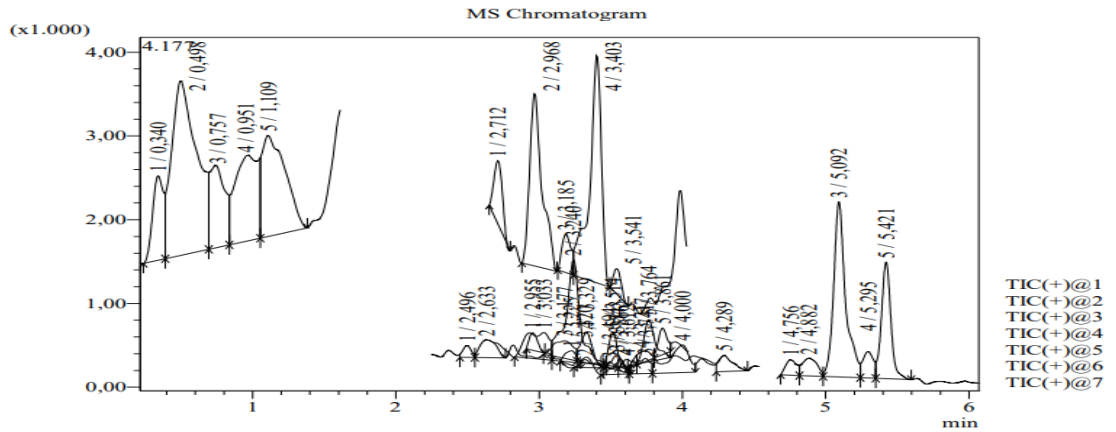
Çizelge 3.24. Tiyaklopid'in ölçüm belirsizliği hesaplamaları.

Gerçeklikten gelen belirsizlik	ort standart sapma/ $\sqrt{n}$	$0,22/\sqrt{72}=0,025$
Kesinlikten (Tekrarlanabilirlik ve Lab. içi Tekrar üretilebilirlikten) gelen belirsizlik	0,208	
$U(\text{birleştirilmiş bel.})=\sqrt{(U \text{ gerç bel.})^2 + (U \text{ tek.üret.bel.})^2}$	$\sqrt{(0,025)^2 + (0,208)^2}=0,21$	
$U(\text{Genişletilmiş})= U(\text{birleştirilmiş bel.}) * k$ (%95 güven aralığında k=2)	0,42	

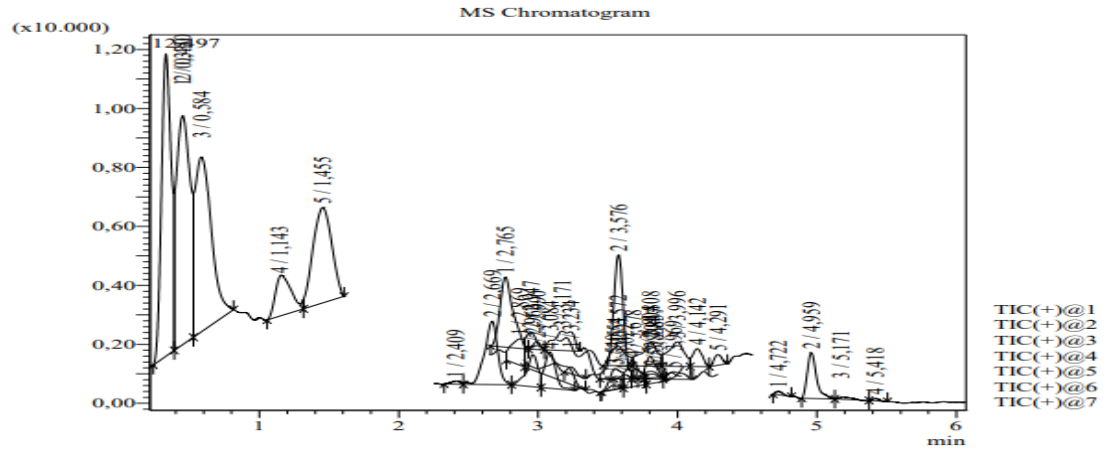
3.9. Bal Numunelerinde Neonikotinoid Varlığının Belirlenmesi

Metot validasyon parametreleri sağlandıktan sonra Ankara'da satışa sunulan 60 adet bal numunesinin analizi yapıldı.

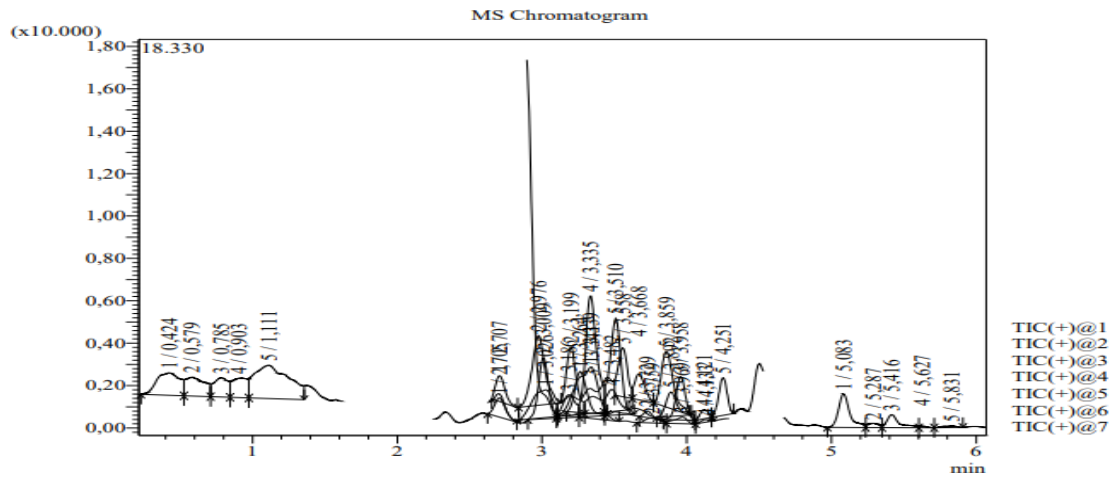
2002/657/EC direktiflerine göre yapılan analizlere göre; numunelerde analizi gerçekleştirilen analitler yönüyle incelendiğin de, maksimum kalıntı limitlerini aşan neonikotinoid kalıntısı varlığı belirlenememiştir. Analizi yapılan numuneleri gösteren çiçek balı, çam balı ve kestane balına ait birer kromatogram örneği Şekil 3.19-Şekil 3.21'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Çiçek balı ait kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.20. Çam balı ait kromatogram görüntüsü.



Şekil 3.21. Kestane balı ait kromatogram görüntüsü.

Asetamiprid, Tiyaetoksam, İmidakloprid, Tiyakloprid ve Klotiyanidin'in 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları Çizelge 3.25-Çizelge 3.29'da; neonikotinoidlerin doğruluk, standart sapma ve % CV değerleri ise Çizelge 3.30'da verilmiştir.

Çizelge 3.25. İmidakloprid 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları.

Analit	İmidakloprid									
	Deney 1		Deney 2		Deney 3		Deney 4			
	Çalışma Düzeyi (ng/g)	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım
2,5	2,44	97,57	2,33	93,10	2,53	101,10	2,33	93,06		
2,5	2,51	100,56	2,54	101,40	2,44	97,40	2,55	101,80		
2,5	2,54	101,63	2,52	100,68	2,52	100,68	2,42	96,68		
2,5	2,39	95,67	2,46	98,43	2,36	94,43	2,57	102,75		
2,5	2,54	101,63	2,58	103,33	2,48	99,33	2,41	96,55		
2,5	2,56	102,56	2,58	103,04	2,58	103,04	2,48	99,04		
5,0	4,96	99,30	4,97	99,37	5,07	101,37	5,13	102,60		
5,0	5,02	100,49	5,00	100,04	5,00	100,04	5,01	100,20		
5,0	4,81	96,11	5,13	102,51	5,13	102,53	5,02	100,50		
5,0	5,03	100,56	5,05	100,93	4,95	98,93	4,95	98,97		
5,0	5,15	103,05	4,95	98,92	4,95	98,92	5,03	100,64		
5,0	5,02	100,37	5,15	102,98	5,15	102,97	5,17	103,37		
7,5	7,57	100,87	7,44	99,13	7,44	99,13	7,53	100,37		
7,5	7,25	96,62	7,32	97,55	7,31	97,49	7,48	99,77		
7,5	7,41	98,86	7,53	100,46	7,53	100,46	7,42	98,99		
7,5	7,31	97,44	7,68	102,42	7,58	101,08	7,69	102,55		
7,5	7,62	101,63	7,21	96,18	7,23	96,42	7,42	98,94		
7,5	7,51	100,11	7,55	100,62	7,53	100,37	7,60	101,30		

Çizelge 3.26. Asetamiprid 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları.

Analit	Asetamiprid									
	Deney 1		Deney 2		Deney 3		Deney 4			
	Çalışma Düzeyi (ng/g)	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım
2,5	2,59	103,68	2,45	97,98	2,55	101,98	2,52	100,94		
2,5	2,46	98,51	2,59	103,56	2,59	103,56	2,42	96,76		
2,5	2,52	100,74	2,46	98,40	2,46	98,24	2,49	99,58		
2,5	2,40	96,02	2,33	93,19	2,63	105,19	2,59	103,59		
2,5	2,54	101,65	2,49	99,50	2,49	99,50	2,53	101,30		
2,5	2,50	99,96	2,53	101,13	2,73	109,13	2,55	101,92		
5,0	5,24	104,86	4,95	99,02	4,95	99,02	5,05	101,02		
5,0	5,21	104,17	5,18	103,55	5,48	109,55	5,50	109,95		
5,0	4,91	98,22	5,10	102,06	5,00	100,06	5,12	102,46		
5,0	4,76	95,29	5,06	101,27	5,46	109,27	5,52	110,32		
5,0	4,67	93,36	4,82	96,33	4,82	96,33	4,60	91,97		
5,0	5,04	100,76	5,42	108,48	5,12	102,48	5,24	104,72		
7,5	7,54	100,48	7,35	98,03	7,95	106,03	7,89	105,23		
7,5	7,64	101,83	7,70	102,61	7,40	98,61	7,42	98,88		
7,5	7,74	103,15	7,44	99,26	7,44	99,26	7,53	100,43		
7,5	7,07	94,27	7,31	97,45	7,61	101,45	6,98	93,04		
7,5	7,90	105,36	7,50	100,04	7,60	101,37	7,59	101,24		
7,5	7,28	97,07	7,43	99,10	7,37	98,25	7,57	100,92		

Çizelge 3.27. Klotiyanidin 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları.

Analit	Klotiyanidin									
	Deney 1		Deney 2		Deney 3		Deney 4			
	Çalışma Düzeyi (ng/g)	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım
2,5	2,34	93,69	2,51	100,55	2,54	101,52	2,53	101,28		
2,5	2,66	106,53	2,67	106,82	2,41	96,24	2,61	104,24		
2,5	2,56	102,40	2,57	102,80	2,57	102,80	2,53	101,31		
2,5	2,47	98,84	2,58	103,13	2,48	99,13	2,47	98,73		
2,5	2,52	100,68	2,42	96,93	2,42	96,93	2,62	104,97		
2,5	2,45	97,96	2,47	98,63	2,56	102,27	2,60	103,87		
5,0	5,14	102,87	5,07	101,35	5,14	102,75	5,03	100,66		
5,0	5,04	100,84	4,95	99,04	5,01	100,23	4,81	96,24		
5,0	4,82	96,49	5,14	102,75	5,17	103,43	5,23	104,66		
5,0	4,99	99,75	4,91	98,23	4,92	98,37	4,73	94,52		
5,0	4,94	98,84	4,89	97,84	5,27	105,46	4,98	99,62		
5,0	5,16	103,29	5,18	103,63	5,05	100,96	5,09	101,83		
7,5	7,40	98,69	7,22	96,21	7,24	96,55	7,54	100,55		
7,5	7,24	96,57	7,44	99,13	7,14	95,13	7,44	99,16		
7,5	7,44	99,15	7,39	98,58	7,59	101,25	7,59	101,26		
7,5	7,39	98,49	7,29	97,14	7,28	97,01	7,35	97,94		
7,5	7,53	100,37	7,48	99,67	7,39	98,47	8,00	106,60		
7,5	7,69	102,49	7,49	99,93	7,47	99,65	7,49	99,83		

Çizelge 3.28. Tiyametoksam 1., 2., 3. tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları.

Analit	Tiyametoksam									
	Deney 1		Deney 2		Deney 3		Deney 4			
	Çalışma Düzeyi (ng/g)	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım
2,5	2,31	92,54	2,44	97,64	2,56	102,44	2,46	98,44		
2,5	2,44	97,42	2,65	105,96	2,53	101,30	2,59	103,56		
2,5	2,45	98,18	2,47	98,94	2,36	94,28	2,45	97,82		
2,5	2,52	100,80	2,33	93,36	2,44	97,65	2,36	94,58		
2,5	2,55	101,94	2,53	101,21	2,60	103,81	2,53	101,30		
2,5	2,42	96,76	2,47	98,62	2,56	102,27	2,47	98,81		
5,0	5,29	105,80	4,95	99,01	5,05	100,97	5,01	100,21		
5,0	4,84	96,81	5,14	102,88	5,08	101,69	4,95	99,08		
5,0	5,01	100,28	5,04	100,72	5,02	100,39	5,09	101,72		
5,0	5,03	100,51	5,15	103,01	5,13	102,66	4,91	98,22		
5,0	4,91	98,25	4,87	97,35	5,02	100,35	5,07	101,35		
5,0	4,97	99,40	4,99	99,75	5,13	102,56	5,02	100,47		
7,5	7,60	101,36	7,44	99,14	7,45	99,28	7,58	101,10		
7,5	7,27	96,96	7,36	98,17	7,31	97,50	7,48	99,77		
7,5	7,60	101,29	7,55	100,68	7,58	101,08	7,60	101,31		
7,5	7,48	99,75	7,46	99,46	7,43	99,13	7,28	97,05		
7,5	7,55	100,71	7,51	100,12	7,58	101,03	7,51	100,15		
7,5	7,54	100,57	7,47	99,54	7,52	100,31	7,31	97,47		

Çizelge 3.29. Tiyakloprid 1., 2., 3.tekrarlanılabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları geri kazanım ve yüzde geri kazanım sonuçları.

Analit	Tiyakloprid									
	Deney 1		Deney 2		Deney 3		Deney 4			
	Çalışma Düzeyi (ng/g)	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	Geri Kazanım (ng/g)	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım
10	9,82	98,19	10,31	103,12	10,10	101,00	10,12	101,22		
10	9,93	99,33	9,76	97,64	9,70	97,00	9,98	99,84		
10	10,19	101,94	10,04	100,38	10,00	100,00	9,65	96,49		
10	9,82	98,22	9,96	99,55	9,80	98,00	10,04	100,44		
10	10,05	100,46	10,02	100,16	9,90	99,02	9,80	98,03		
10	10,24	102,35	10,07	100,68	9,90	99,00	9,92	99,16		
20	20,02	100,11	20,26	101,28	20,26	101,28	20,20	100,98		
20	20,03	100,16	20,07	100,33	20,10	100,50	20,11	100,57		
20	20,22	101,08	20,44	102,22	20,00	100,00	19,56	97,82		
20	20,06	100,32	20,02	100,11	19,70	98,50	19,58	97,91		
20	19,86	99,32	19,98	99,91	19,68	98,41	20,01	100,06		
20	19,85	99,26	20,09	100,44	20,00	100,00	20,10	100,49		
30	29,70	99,02	29,89	99,62	29,89	99,62	29,81	99,38		
30	29,86	99,54	29,68	98,95	29,88	99,61	29,82	99,42		
30	29,99	99,97	29,51	98,38	29,51	98,38	29,65	98,83		
30	28,83	96,09	29,82	99,40	29,92	99,73	29,49	98,30		
30	29,50	98,34	29,62	98,75	29,62	98,75	29,94	99,81		
30	29,99	99,95	29,99	99,95	29,29	97,62	29,65	98,82		

Çizelge 3.30. Neonikotinoidlerin doğruluk, standart sapma ve % CV değerleri.

Analit	Standart (ng/g)	Validasyon Seviyesi (MRL)	Deney 1. Doğruluk (%)	Deney 2. Doğruluk (%)	Deney 3. Doğruluk (%)	Deney 4. Doğruluk (%)	Deney 1. Sd. (%)	Deney 2. Sd. (%)	Deney 3. Sd. (%)	Deney 4. Sd. (%)	Deney 1. CV (%)	Deney 2. CV (%)	Deney 3. CV (%)	Deney 4. CV (%)
İmidakloprid	2,5	0,5	99,93	100,00	99,33	98,32	2,71	3,82	3,05	3,63	2,72	3,82	3,07	1,97
	5,0	1	99,98	100,79	100,79	101,05	2,26	1,66	1,77	1,63	2,26	1,65	1,75	1,62
	7,5	1,5	99,26	99,39	99,16	100,32	1,97	2,26	1,85	1,41	1,98	2,27	1,87	1,40
Asetamiprid	2,5	0,5	100,09	98,96	102,93	100,68	2,64	3,49	3,96	2,32	2,63	3,52	3,85	1,23
	5,0	1	99,44	101,78	102,78	103,41	4,67	4,14	5,50	6,78	4,70	4,07	5,35	6,55
	7,5	1,5	100,36	99,41	100,83	99,96	4,07	1,82	2,89	3,99	4,06	1,83	2,86	3,99
Klotiyanidin	2,5	0,5	100,02	101,48	99,81	102,40	4,34	3,54	2,81	2,37	4,34	3,49	2,81	1,30
	5,0	1	100,35	100,47	101,87	99,59	2,56	2,45	2,52	3,71	2,55	2,44	2,48	3,72
	7,5	1,5	99,29	98,44	98,01	100,89	1,99	1,48	2,23	3,02	2,00	1,50	2,27	3,00
Tiyametoksam	2,5	0,5	97,94	99,29	100,29	99,09	3,32	4,16	3,61	3,08	3,39	4,19	3,60	1,68
	5,0	1	100,17	100,45	101,44	100,18	3,08	2,22	1,03	1,33	3,07	2,21	1,02	1,33
	7,5	1,5	100,11	99,52	99,72	99,48	1,65	0,86	1,37	1,81	1,65	0,86	1,37	1,82
Tiyakloprid	10	0,5	100,08	100,26	99,00	99,20	1,81	1,77	1,41	1,72	1,81	1,77	1,43	0,94
	20	1	100,04	100,72	99,78	99,64	0,68	0,88	1,13	1,40	0,68	0,87	1,13	1,41
	30	1,5	98,82	99,17	98,95	99,09	1,47	0,59	0,85	0,54	1,49	0,59	0,86	0,55

Çizelge 3.31. Neonikotinoitlerin tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik, ortalama geri alım, R (%) ort, RSD_r (%), RSD_R (%).

Analit	Asetamiprid	Klotiyanidin	İmidakloprid	Tiyametoksam	Tiyaloprid
Spike	0,5 1 MRL	1,5 0,5 1 MRL	1,5 0,5 1 MRL	1,5 0,5 1 MRL	1,5 0,5 1 MRL
Düzevi (MRL)	MRL	MRL	MRL	MRL	MRL
Ortalama					
Geri alım (ng/g)	2,52 5,09 7,51	2,52 5,03 7,44	2,49 5,03 7,47	2,48 5,03 7,48	4,98 10,00 14,85
R (%)					
ort.	100,67 101,86 100,14	100,93 100,57 99,16	99,40 100,65 99,53	99,15 100,56 99,71	99,63 100,04 99,01
RSD _r					
(%)	3,15 3,57 3,32	3,32 2,84 2,27	3,35 1,84 1,91	3,59 2,07 1,47	3,38 2,12 1,79
RSD _R					
(%)	3,32 5,43 3,53	3,32 2,92 2,27	3,35 1,93 1,99	3,59 2,07 1,47	3,38 2,12 1,79

Neonikotinoitlerin tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik, ortalama geri alım, R (%) ort, RSD_r (%), RSD_R (%) değerleri Çizelge 3.31’de; Anova tek etkene göre, tekrarlanabilirlik standart sapması (sr), gruplar arasındaki standart sapma (sb) ve tekrar üretilirlik standart sapması (sr) sonuçları ise Şekil 3.32’de verilmiştir.

Çizelge 3.32. Anova tek etkene göre, tekrarlanabilirlik standart sapması (s_r), gruplar arasındaki standart sapma (s_b) ve tekrar üretilebilirlik standart sapması (s_r) sonuçları.

Analit	Standart (ng/g)	Validasyon Seviyesi (MRL)	Tekrarlanabilirlik (S_r)	Gruplar Arası (S_b)	Tekrar üretilebilirlik (S_R)
İmidakloprid	2,5	0,5	0,083	0	0,083
	5,0	1	0,092	0	0,092
	7,5	1,5	0,142	0	0,142
Asetamiprid	2,5	0,5	0,079	0,26	0,027
	5,0	1	0,27	0	0,27
	7,5	1,5	0,25	0	0,25
Klotiyanidin	2,5	0,5	0,084	0,00	0,084
	5,0	1	0,143	0	0,143
	7,5	1,5	0,168	0,66	0,68
Tiyametoksam	2,5	0,5	0,09	0,00	0,09
	5,0	1	0,10	0,00	0,10
	7,5	1,5	0,11	0,00	0,11
Tiyakloprid	10	0,5	0,169	0,00	0,169
	20	1	0,268	0,041	0,173
	30	1,5	0,267	0,00	0,267

Çizelge 3.33. ISO 5725-2:2019 göre tekrarlanabilirlik sonuçları.

Analit	Standart (ng/g)	Validasyon Seviyesi (MRL)	Tekrarlanabilirlik S_r^2	Günler Arası S days ²	Tekrar üretilebilirlik S_R^2
İmidakloprid	2,5	0,5	0,63	0,07	0,70
	5,0	1	7,20	0,44	7,64
	7,5	1,5	6,21	0,83	7,04
Asetamiprid	2,5	0,5	0,70	0,00	0,70
	5,0	1	2,04	0,11	2,16
	7,5	1,5	2,85	0,00	2,85
Klotiyanidin	2,5	0,5	0,69	0,00	0,69
	5,0	1	0,85	0,09	0,94
	7,5	1,5	2,02	0,18	2,20
Tiyametoksam	2,5	0,5	0,79	0,00	0,79
	5,0	1	1,08	0,00	1,08
	7,5	1,5	1,21	0,00	1,21
Tiyakloprid	10	0,5	2,84	0,00	2,84
	20	1	4,48	0,00	4,48
	30	1,5	7,10	0,00	7,10

r = Tekrarlanabilirlik a-b = İki sonuç arasındaki fark $SRW^2 = S_r^2 + S_{days}^2$ $s = \sqrt{[(\sum(a_1 - b_1)^2) / 2d]} \rightarrow$ İki farklı sonuç arasındaki standart sapma
d = Çalışma sayısı S days² = Gün içi tekrarlardan gelen varyans RW = Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik

ISO 5725-2:2019 göre tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 3.33’de; neonikotinoidlerin sağlamlık, LOD, LOQ ve spesifiklik değerleri Çizelge 3.34’de ve ölçüm belirsizliği hesaplamaları ve sonuçları da Çizelge 3.35’de verilmiştir.

Çizelge 3.34. Neonikotinoidlerin sağlamlık, LOD, LOQ ve spesifiklik değerleri.

Analit Spike düzeyi (ng/g)	Asetamiprid			Klotiyanidin			İmidakloprid			Tiyametoksam			Tiyaloprid		
	Geri Kazanım	R % Geri Kazanım	Geri (ng/g)	Geri Kazanım	R % Geri Kazanım	Geri (ng/g)	Geri Kazanım	R % Geri Kazanım	Geri (ng/g)	Geri Kazanım	R % Geri Kazanım	Geri (ng/g)	Geri Kazanım	R % Geri Kazanım	Geri (ng/g)
1 MRL	5,16	103,13	5,19	103,80	102,37	5,12	102,37	104,39	5,22	104,39	105,22	5,22	21,04	105,22	21,04
1 MRL	5,29	105,74	5,18	103,69	106,35	5,32	106,35	118,76	5,94	118,76	98,73	5,94	19,75	98,73	19,75
1 MRL	5,20	104,02	4,84	96,86	99,76	4,99	99,76	99,40	4,97	99,40	86,55	4,97	17,31	86,55	17,31
1 MRL	5,04	100,78	4,90	98,03	112,33	5,62	112,33	99,42	4,97	99,42	98,89	4,97	19,78	98,89	19,78
1 MRL	5,00	100,00	4,70	94,07	98,04	4,90	98,04	97,35	4,87	97,35	97,58	4,87	19,52	97,58	19,52
1 MRL	5,25	104,93	4,79	95,74	109,22	4,92	109,22	101,16	5,06	101,16	102,65	5,06	20,53	102,65	20,53
1 MRL	5,59	111,83	5,32	106,49	106,88	5,46	106,88	98,09	4,90	98,09	108,65	4,90	21,73	108,65	21,73
1 MRL	4,91	98,27	5,30	106,01	106,88	5,34	106,88	107,96	5,40	107,96	105,48	5,40	21,10	105,48	21,10
1 MRL	5,49	109,87	5,12	102,34	100,84	5,04	100,84	100,28	5,01	100,28	105,38	5,01	21,08	105,38	21,08
1 MRL	5,24	104,86	5,14	102,87	109,30	5,46	109,30	105,80	5,29	105,80	105,11	5,29	21,02	105,11	21,02
Ortalama Geri alım (ng/g)	5,22		5,05		5,22	5,16			5,22		20,28				
Sd	0,21		0,22		0,26	0,32			0,26		1,27				
% Sd	4,21		4,44		5,11	6,45			5,11		6,35				
% CV	4,03		4,40		4,90	6,25			4,90		6,27				
LOD(Tespit Limiti=3SD	0,63		0,66		0,78	0,96			0,78		3,81				
LOQ(Ölçüm Limiti=10SD	2,1		2,2		2,6	3,2			2,6		12,7				

Çizelge 3.35. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları ve sonuçları.

Analit	Standart (ng/g)	S _d	S _{pool}	T Değeri	T _{tablo} Değeri	Ölçüm Belirsizliği
İmidakloprid	2,5	0,08		0,65	1,67	
	5,0	0,09	0,11	0,63	1,67	0,22
	7,5	0,14		0,29	1,67	
Asetamiprid	2,5	0,08		0,69	1,67	
	5,0	0,26	0,18	0,60	1,67	0,36
	7,5	0,24		0,05	1,67	
Klotianidin	2,5	0,08		0,95	1,67	
	5,0	0,14	0,40	0,35	1,67	0,80
	7,5	0,18		0,40	1,67	
Tiyametoksam	2,5	0,09		0,84	1,67	
	5,0	0,10	0,10	0,47	1,67	0,20
	7,5	0,10		0,24	1,67	
Tiyakloprid	10	0,17		0,19	1,67	
	20	0,21	0,21	0,02	1,67	0,42
	30	0,27		0,32	1,67	

4. TARTIŞMA

Bal arılarının neonikotinoidlere maruz kalması, başta en yaygın tüketilen arı ürünü olan bal olmak üzere arı ürünlerinin kontaminasyonuna yol açabilmekte ve insan sağlığına yönelik potansiyel tehdit oluşturmaktadır. Son yıllarda, balın sağlıklı özellikleri nedeniyle bal tüketimi önemli ölçüde artmıştır. Bu nedenle, baldaki pestisitlerin izlenebilmesi, yalnızca insan sağlığına yönelik olası ciddi riskler nedeniyle değil, aynı zamanda düzeylerinin genel olarak çevrenin maruz kaldığı riski yansıtabilmesi nedeniyle de önemlidir. Balın güvenliğini ve kalite kontrolünü sağlamak için doğal ürünün tüketiciler için zararlı olacak seviyelerde herhangi bir toksik kalıntı içermediğinden emin olmak için baldaki kimyasal kirliliği izlemek gereklidir (Gbylik-Sikorsa ve ark., 2015 ve Tanner ve ark., 2011).

Balda neonikotinoid tayini için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemlerde de farklı teknikler kullanmıştır (LC-MS/MS , GC-MS/MS ,UPLC-UV, UPLC-DAD ve LC-amperometrik detektör gibi). Düşük uçuculukları ve yüksek polariteleri nedeniyle çoğu neonikotinoid, gaz kromatografi tekniklerine uygun değildir. Bu nedenle çoklu reaksiyon izleme (MRM) modlu sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC–MS/MS), yüksek seçici algılama ve hassas niceleme özelliği ile neonikotinoid insektisit kalıntılarının miktarının belirlenmesi için en yaygın kabul gören teknik haline gelmiştir. MS/MS dedektörü, karmaşık matrislerde neonikotinoidlerin belirlenmesi için DAD'den daha yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlar (Hou ve ark., 2019; Jovanov ve ark., 2015). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da bal numunelerinden elde edilen özütler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Bal matrislerinin karmaşıklığı ve gram başına düşük nanogram aralığında ölçüm limitlerine ulaşma ihtiyacı, analitik prosedürde bir numune hazırlama aşamasının dahil edilmesini gerekli kılar. Neonikotinoid kalıntılarının sıvı kromatografik analizi için bal numunelerinin farklı ön işlem prosedürleri geliştirilmiştir. Ön arıtma prosedürleri olarak yaygın olarak kullanılan teknikler

arasında geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), modifiye QuEChERS yöntemi veya dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) yer alır. QuEChERS yöntemi geleneksel yöntemlere kıyasla az miktarda kimyasal maddeye ihtiyaç duyulması, çok sayıda pestistin eş zamanlı olarak belirlenmesine izin veren, günümüzde en evrensel olarak kullanılan ve kabul gören numune hazırlama yöntemidir (Gbylik-Sikorsa ve ark., 2015; Jovanov ve ark., 2015). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da bal numunelerinde ekstraksiyon aşamasında QuEChERS yöntemi tercih edilmiştir.

Tanner ve ark. (2011), Avusturya’da 41 adet bal örneğinde LC-MS/MS metodu ile üç neonikotinoid kalıntısı araştırmış ve 18 numunede (% 22) tiyakloprid (27,4 µg/kg), 2 numunede (% 5) asetamiprid (15,2 µg/kg) ve 1 numunede de tiyametoksam kalıntılarının varlığını ortaya koymuştur. Ancak bu kalıntı miktarlarının hiçbirinin maksimum kalıntı limitini aşmadığını ve ortalama olarak çiçek balı numunelerinin orman balı numunelerine göre daha yüksek miktarlarda neonikotinoid kalıntısı içerdiğini bildirmiştir. Bildirilen bu sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında ufak farklılıklar bulunsa da, her iki çalışma sonucunda limit değerleri aşan örneğin bulunmaması yönüyle çalışmalar benzerlik göstermektedir. Analizler arasındaki farkın ise; analiz yapılan bölgelerin ve analiz yıllarının farklı olmasına, ayrıca analiz yapılan tarih aralığında bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Gbylik-Sikorska ve ark. (2015), Polonya’da bal arısı ve bal örneklerinde neonikotinoid ve bunların bazı metabolitlerini içeren 13 adet analitin hızlı nicel ve nitel analizleri için LC-MS/MS yöntem ile geliştirme çalışmasını başarıyla uygulandığını bildirmiştir. SANCO direktiflerine göre, doğrulanmış yöntem ile gerçek bal arısı örneklerinde uygulandığında (4,0 µgkg⁻¹ ve 13,1 µgkg⁻¹) klotiyanidin, imidakloprid (27,0 µgkg⁻¹) ve imidakloprid ürea (4,5 µgkg⁻¹), balda ise sırasıyla, 13,7 µgkg⁻¹ ve 198,2 µgkg⁻¹ klotiyanidin tespit edildiğini bildirmiştir. Bildirilen sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında bazı farklar bulunsa da, her iki çalışma sonucunda limit değerleri aşan örneğin bulunmaması yönüyle çalışmalar benzerlik göstermektedir. Analizler arasındaki farkın ise; kullanılan ekstraksiyon yönteminin ve

analizlerde kullanılan kolonların farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Jovanov ve ark. (2015), Sırbistan Cumhuriyetinin Voyvodina Özerk bölgesindeki birden fazla lokalizasyondan toplanan farklı bitki kökenli (51 ayçiçeği, 26 kır çiçeği, 22 akasya ve 5 ıhlamur) 104 bal örneğinde HPLC-DAD metodu ile neonikotinoid kalıntısı araştırmıştır. 5 kır çiçeği balında tiyokolprid, 4 ayçiçek balında imidakloprid ve 5 kır çiçeği balında ise tiyametoksam tespit edildiğini bildirmiştir. Ancak bildirilen tüm örneklerde elde edilen değerlerin, Maksimun Kalıntı Limitinin altında olduğu belirtilmiştir. Bildirilen bu sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında ufak farklılıklar bulunsa da, her iki çalışma sonucunda limit değerleri aşan örneğin bulunmaması yönüyle çalışmalar benzerlik göstermektedir. Analizler arasındaki farkın ise; analizlerde kullanılan cihaz ile kullanılan ekstraksiyon yönteminin ve analiz yapılan bölge ile yılların farklı olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Codling ve ark. (2016), Kanada'ya 30 km uzaklıkta olan Saskatoon şehrinde bulunan kovanlardan toplanan (26 bal, 19 polen ve 16 arı) numunelerde LC-MS/MS ile klotiyanidin (%68) ve tiyametoksam (%75)'in, bal örneklerinde en sık tespit edilen neonikotinoidler olduğunu ve klotiyanidin'in $8,2 \text{ ng g}^{-1}$, tiyametoksam'ın ise $17,2 \text{ ng g}^{-1}$ konsantrasyonlarında tespit edildiğini bildirmişlerdir. 26 bal örneğinin %86'sında, 19 polen örneğinin % 58'inde ve 16 arı örneğinin %56'sında klotiyanidin tespit edilmiştir. Bildirilen sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasındaki farkın numune toplanan yer ve bölgenin farklı olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Laaniste ve ark. (2016), Estonya'da 200'den fazla noktadan 2005-2013 yılları arasında hasat edilen 294 bal örneğinde, sıvı kromatografisi-elektrosprey kütle spektrometresi ile dört adet neonikotinoid (tiyametoksam, tiyakloprid, asetamiprid ve imidakloprid) kalıntısını araştırmış ve analiz edilen 294 balda asetamiprid, tiyametoksam ve imidakloprid kalıntısına rastlamazken, % 27'sinde tiyakloprid tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tespit edilen seviyelerin ise AB tarafından belirlenen

maksimum kalıntı seviyesinin altında olduğunu da belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile tiyakloprid'in uzun bir bozunma süresine sahip olduğu ve bal örneklerinde 5 yıl veya daha uzun bir süre kalıntı olarak bulunabileceğini de bildirmişlerdir. Bildirilen bu sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında ufak farklılıklar bulunsa da, her iki çalışma sonucunda limit değerleri aşan örneğin bulunmaması yönüyle çalışmalar benzerlik göstermektedir. Analizler arasındaki farkın ise; analiz yapılan yılların farklılığı ve analiz yapılan tarih aralığında bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir. Yine Estonya'da yapılan bu çalışmada sadece tiyaloprid'in tespit edilebilmesinin, pH 4-9 aralığında bu maddenin çözünürlüğünün stabil olmasından kaynaklanabileceğine bağlı olacağı da düşünülmektedir.

Paradis ve ark. (2014), Fransa'da 2009-2010 yılları arasında Vendee (Batı Fransa) bulunan 2 farklı (ekim alanlarına yakın, ağaçlık alana yakın) aralıktan toplanan 90 bal örneğinde GC-MS/MS ile LC-MS/MS metodu ile 3 farklı insetisit grubundan (neonikotinoid, pretroidler ve pirazoller) 22 aktif maddenin kalıntısı araştırılmış ve çalışma sonucunda tiyakolprid; 2009-2010 yıllarına ekim alanlarına yakın toplanan ballarda maksimum 11,6 ng/g düzeyinde tespit edilirken, ağaçlık alanda ise bu oranın 9,1 ng/g seviyesine ulaştığı bildirilmiştir. Asetamipridin her iki aralıktan toplanan bal numulerinde 51,9 ng/g (ekim alanı) ve 112,8 ng/g (ağaçlık alan) düzeyinde tespit edildiği, tiyametoksamın ise sadece ekim alanlarından toplanan ballarda 2 ng/g miktarda tespit edilirken, ağaçlık alanda toplanan ballarda tespit edilemediği de bildirilmiştir. Çalışma sonuçları ile gerçekleştirilen tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın numune toplanan yer ile bölgenin farklı olmasına ve analiz yapılan yıllar arasındaki farka bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Song ve ark. (2018), 2017 yılında Çin'in farklı bölgelerinden toplanan 30 bal örneğinde, anyon değiştirici tek kullanımlık pipet ekstraksiyonu (DPX; Disposable pipette extraction) ile LC-MS/MS kullanarak balda neonikotinoidlerin kalıntılarını araştırmış ve 30 bal örneğinde neonikotinoid insektisit saptanma sıklığının % 13 ila % 33 arasında, kalıntıların ise 11-120 µg/kg arasında, dinotefuran, klotiyanidin, imidakloprid ve tiyametoksamın maksimum seviyesinin 102 µg/kg'ı aştığını

bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile yapılan çalışma arasında farkın; kullanılan ekstraksiyon yönteminin farklı olmasına ve çalışmanın yapıldığı tarihte bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Woodcock ve ark. (2018), neonikotinoid (imidakloprid, klotiyanidin ve tiyametoksam) kullanımına ilişkin yasak yürürlüğe girmeden önce (2014; 21 adet) ve yasak yürürlüğe girdikten sonra (2015; 109 adet) Birleşik Krallık genelindeki arı yetiştiricilerinden 130 bal örneği toplayarak bal arılarına maruz kalma riskindeki azaltma etkinliğini araştırmış ve 2014 yılında toplanan 21 bal örneğinin yaklaşık yarısında bu maddeleri tespit ederlerken, 2015 yılında toplanan 109 bal örneğinin beşte birinde tespit edildiği bildirmişlerdir. Çalışmada en sık tespit edilen neonikotinoidin ise klotiyanidin (1,8 ng/g) olduğu da belirtilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile yapılan tez çalışması arasında farkın; analiz yapılan yılların farklılığı ve analiz yapılan tarih aralığında bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Chen ve ark. (2019), Çin’de 8 adet bal numunesinde, şeker uzaklaştırma (Sugaring-Out) yöntemi ile HPLC kullanarak balda, imidakloprid, asetamiprid ve tiyakloprid kalıntıları analizi için geliştirilen yöntemi uygulamış ve balda neonikotinoidlerin (imidakloprid, asetamiprid ve tiyakloprid) tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Bu çalışma ile gerçekleştirilen tez çalışması sonuçları arasındaki farkın analiz yöntemi ve kullanılan cihaza bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Gawel ve ark. (2019), Polonya’da 2015, 2016 ve 2017 yıllarında toplanan 155 bal örneğinde LC-MS/MS ve GC-MS/MS kullanarak, 207 (neonikotinoid, fungusit, herbisitler, akaristler, ve büyüme düzenleyicileri) pestisit kalıntısının belirlenmesi için modifiye edilmiş QuEChERS yöntemi uygulamış ve örneklerin %85’inde (132) pestisit kalıntısı tespit edildiğini bildirmişlerdir. Analiz edilen örneklerin, % 15’inde kalıntıya rastlanmazken, bir pestisit kalıntısı içeren örnek sayısı %17, iki farklı pestisit kalıntısı içeren örnek sayısı % 17, üç farklı pestisit kalıntısı içeren örnek sayısı % 16, dört farklı pestisit kalıntısı içeren örnek sayısı %18, dörtten fazla farklı pestisit kalıntısı içeren örnek sayısı ise % 17 olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Yine çalışmada 21

adet pestisit kalıntısı tespit edildiği ve örneklerin % 77'sinde siyano grubu içeren (asetamiprid ve tiyakloprid) neonikotinoidlerin en sık rastlandığı da bildirilmiştir. Çalışma sonuçları ile tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın analiz yapılan yılların farklı olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Hou ve ark. (2019), Çin'de yerel fabrikalardan ve marketlerden satın alınan 60 adet bal ve arı sütü örneğinde katı faz ekstraksiyonu ve sıvı kromatografisi- tandem kütle spektrometresi ile neonikotinoid insektisitlerinin kalıntısını araştırmıştır. Arı sütü örneklerinde neonikotinoid grubu insektisitler ve metabolit tespit edilemediği, ancak beş bal numunesinde asetamiprid ($1,3 \mu\text{g/kg}^{-1}$, $1,6 \mu\text{g/kg}^{-1}$, $3,4 \mu\text{g/kg}^{-1}$, $8,8 \mu\text{g/kg}^{-1}$ ve $14,9 \mu\text{g/kg}^{-1}$), bir bal numunesinde tiyakloprid ($4,7 \mu\text{g/kg}^{-1}$) ve iki bal numunesinde de asetamiprid-N-desmetil ($1 \mu\text{g/kg}^{-1}$ ve $0,6 \mu\text{g/kg}^{-1}$)'in tespit edildiğini bildirilmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın, kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile yıl farklılığına ve yine analiz yapılan tarih aralığında bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Miha ve ark. (2019), 2014–2016 yılları arasında, Slovenya'nın farklı coğrafi bölgelerinden toplanan farklı bitki kökenli 51 adet (28 çiçek, 15 orman, 5 akasya, 2 ıhlamur ve 1 kestane) bal örneğinde LC-MS/MS metodu ile neonikotinoid kalıntısı araştırmış ve araştırma sonucunda sadece asetamiprid ve tiyaklopridin varlığını ortaya koymuşlardır. Asetamiprid altı örnekte (4 çiçek, 1 orman ve 1 ıhlamur balı) tespit edilirken, ancak sadece bir çiçek balında LOQ değerini (2 ng/g) aştığı bildirilmiştir. Tiyaoklopridin ise 30 bal örneğinde LOD değerinin üzerinde olduğu, en yüksek konsantrasyonun da bir çiçek balında ($9,6 \text{ ng/g}$) mevcut olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın, analiz yapılan bölgeler ile analiz yapılan yılların farklı olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Ligor ve ark. (2020), Polonya ve diğer ülke (Avusturya, Brezilya, Bulgaristan, Kamerun, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Yunanistan, İtalya, Portekiz, Romanya, Rusya, ABD ve Türkiye) menşeli bal örneklerinde UHPLC/UV (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi/Ultraviyole Dedektör) metodu ile neonikotinoidlerin belirlenmesi için farklı çiçek kökenli 53 adet bal örneğinde yaptıkları çalışmada 19 numunede

hedeflenen pestisitlerin LOQ değeri üzerinde tespit edildiğini, incelenen diğer tüm örneklerde ise neonikotinoidlerin en azından LOD veya LOQ değerlerinin üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile tez çalışması sonuçları arasındaki farklılığın analizlerde kullanılan cihaz farklılığına ve çalışma yapılan bal numunelerinin farklı bölgelerden toplanmış olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Mitchell ve ark. (2017), dünyanın farklı bölgelerinden topladığı 198 adet bal numunesinde (37 Afrika, 41 Asya, 53 Avrupa, 22 Kuzey Amerika, 28 GüneyOrta Amerika ve Karayipler, 17 Okyanusya ve Pasifik Adaları) UHPLC-MS/MS metodu ile asetamiprid, klotianidin, imidakloprid,tiyakloprid ve tiyametoksam kalıntısını araştırmışlar ve çalışma sonucunda 198 numunenin % 75'inde analizi gerçekleştirilen beş bileşikten en az birini, % 45'inde iki ve daha fazlasını, % 10'unda ise dört ve daha fazlasını tespit ettiklerini ve bu değerlerin de MRL miktarının altında kaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada neonikotinoid çeşitlerinin kullanımında bölgesel farklılığı da ifade etmişlerdir. Bu yönde yaptıkları değerlendirmede; imidaklopridin Afrika ve Güney Amerika'da; tiaklopridin Avrupa'da; asetamipridin Asya'da ve tiyametoksamın ise Okyanusya ile Kuzey Amerika'da daha yaygın kullanıldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile yapılan çalışma arasında farkın; neonikotinoidlerin tamamının farklı ülkelerde yasaklanmadan önce analizlerinin gerçekleştirilmiş olmasından ve yine analizlerde kullanılan cihaz farklılığına, analiz yapılan bölgelerin, yılların farklı olmasına ve analiz yapılan tarih aralığında bu ürünlerin kullanımına izin veriliyor olmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Ülkemizde balda neonikotinoidle ilgili yapılan çalışmalarda ise; 2018 yılında Adana ve ilçelerinden toplanan arı ve petek numuneleri, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından Almanya'ya neonikotinoid grubu insektisit analizleri için gönderilmiştir. Gönderilen numunelerin tamamında klotianidin tespit edildiği bildirilmiştir (Oruç ve ark., 2019). Özdemir (2016) Tekirdağ ili ve çevresinden toplanan 33 adet bal örneğinde HPLC-MS/MS metodu ile neonikotinoid grubu pestisit kalıntıları araştırmış ve numunelerde nitempiran tespit edilemezken, dinotefuran (0,40-1,35 µg/kg) aralığında, tiyametoksam iki numunede (0,07 µg/kg ve 1 µg/kg) miktarlarda, klotianidin (0,11 – 1,58 µg/kg) aralığında, imidaklopridin (1,21- 1,78

$\mu\text{g/kg}$) aralığında, asetamiprid (1,93- 3,64 $\mu\text{g/kg}$) aralığında ve tiyaklopridin ise (0,50- 0,64 $\mu\text{g/kg}$) aralığında elde edildiğini bildirmiştir. Belirtilen konsantrasyonların ise maksimum kalıntı limitlerinin çok altında olduğu da belirtilmiştir. İplikçioğlu ve ark. (2020), Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladıkları 44 adet süzme bal numunesinde LC-MS/Q-TOF metodu ile neonikotinoid varlığını araştırmışlar ve çalışma sonucunda numunelerin hiçbirinde neonikotinoid grubu pestiside rastlanılmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışma LC-MS/MS ile analizler gerçekleştirilmiş olup, bulgularımız literatür çalışmasını destekler niteliktedir. Bildirilen bu sonuçlar ile yapılan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında ufak farklılıklar bulunsa da, tüm bu çalışma sonuçlarında limit değerleri aşan örneğin bulunmaması yönüyle çalışmalar arasında bir benzerlik bulunduğu söylenebilir. Analizler arasında görülen ufak farklılıkların ise; analiz yapılan bölgeler ile analiz yıllarının farklılığına ve analiz yapılan yöntem ile kullanılan cihaz farkına bağlı olabileceği öngörülmektedir. Yine tüm bu çalışmalar ışığında; her ne kadar neonikotinoid pestisid kullanımı yaygın olmasına rağmen bal numunelerinde kalıntı limit değerlerinin altında kalıyor olmasının; bu ürünlerin arılar tarafından hızla metabolize edilebildiğine bağlı olabileceği de öngörülmektedir.

Yeter ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada asetamipridin farklı ballarda, farklı sıcaklıklarda (20°C, 30°C ve 40°C), 180 gün boyunca ayrışma hız sabitleri ve yarı ömürleri incelemiş ve çalışma sonucunda asetamipridin, IM-1-2 ((E)-N2-carbamoyl-N1-[6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N1-methylacetamide)'ye parçalanması pH'sı 3,0-5,0 arasında olan sulu çözeltilerde gözlenen oranlardan daha hızlı olduğunu bildirmişler ve balda gerçek asetamiprid kontaminasyonun takip edilebilmesi için, ACE ve IM-2-1 (N-desmethylacetamiprid) analizleri yerine IM-1-2 analizinin yapılmasını önermişlerdir. Bu sebeple kalıntı tarama çalışmalarında neonikotinoidlerin taranmasının yanı sıra, bu ürünlerin metabolitlerinin de analizlerinin yapılması daha sağlıklı olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, öncelikle süzme ballarda asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyametoksam ve tiyakloprid için test yönteminin uyarlanması ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm neonikotinoidler için gerçekleştirilen validasyon çalışmaları 2002/657/EC direktifinde belirtilen şartlara uyumlu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan QuEChERS (ucuz, etkili, hızlı, kolay, sağlam ve güvenli) yöntemi ile kimyasal maddelerin az miktarda kullanılması, hem kısa zamanda hem de daha düşük maliyetle, birden fazla analitin aynı anda analiz edilmesine imkân sağlaması, seçilen yöntemin avantajları olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışma ile tek bir ekstraksiyon yöntemi kullanılarak beş farklı analitin analiz edilebilir olması da yöntemin kullanılabilirliğini ön plana çıkarmaktadır. Yine tez çalışmasında kullanılan yöntemin, baldaki neonikotinoid kalıntılarının analizi için geliştirilen duyarlı ve seçici LC-MS/MS yöntemiyle AB kalıntı tanımında yer alan analitlerin izlenmesi için yarar sağlayacağı ve yaygınlaştırılmasına olanak sağlaması açısından da faydalı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmanın sonucunda bal numunelerinde neonikotinoid kalıntısının bulunmaması hem halk sağlığı hem de bal üreticileri ile tüketicileri için önemli bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Buna rağmen ülkemizde neonikotinoidlerle ilgili yapılan çalışmaların sınırlı sayıda ve bölgesel olması nedeniyle, halk sağlığı yönünden kesin bir kanıya varılabilmesi için, izlenebilir ve sürdürülebilir bir plan dahilinde bu analizlerin yapılması gereklidir.

Pestisitlerin sürdürülebilir kullanımı, yalnızca insan sağlığı değil, aynı zamanda çevre ve ilgili ekosistem araçlarını da koruyan sağlam risk değerlendirmelerine bağlıdır. Sağlıklı bir risk değerlendirmesinin yapılabilmesi için gerekli olan verilerin oluşması adına, bu alanda yapılan çalışmaların belirlenen bir plan dahilinde ve rutin bir şekilde yapılması gereklidir. Bu kapsamda, neonikotinoidlerle ilgili olarak hem farklı arı ürünlerinde (arı sütü, bal mumu ve polen) hem de farklı hayvansal gıda

kaynaklarından (balık dokusu, kırmızı et, beyaz vb.) olacak şekilde gerek nekinotinoidler ve gerekse bu neonikotinoidlerin metabolitlerinin analiz metotlarının geliştirilmesi ve bu yöndeki kalıntı analizlerinin planlı bir şekilde belirli periyotlarla yapılması önemlidir.



ÖZET

Ankara’da Satışa Sunulan Ballarda Bazı Neonikotinoidlerin LC-MS/MS ile Araştırılması

Bu çalışma ile süzme ballarda asetamiprid, klotiyanidin, imidakloprid, tiyametoksam ve tiyakloprid kalıntılarının belirlenmesi için test yönteminin uyarlanması, uyarlanan yöntem ile neonikotinoid kalıntılarının araştırılması, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Avrupa Komisyonu 2002/657/EC sayılı Kararına uygun olarak baldaki beş neonikotinoidin, likit kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi, analiz yöntemi eş zamanlı olarak hızlı ve güvenilir bir şekilde geliştirilmiş ve tam olarak doğrulanmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda, CC α ve CC β sırasıyla, Asetamiprid için 5,44 ve 5,89 ng/g, Klotiyanidin için 5,23 ve 5,46 ng/g, İmidakloprid için 5,15 ve 5,30 ng/g, Tiyametoksam için 5,16 ve 5,32 ng/g, Tiyakloprid için 20,28 ve 20,56 ng/g olarak bulundu.

Metot validasyon parametreleri sağlandıktan sonra Ankara’da satışa sunulan 60 adet bal numunesinin de maksimum kalıntı limitlerini aşan neonikotinoid kalıntısı varlığı belirlenememiştir. Uyarlanan yöntemin kısa zamanda, az kimsayal kullanılarak, etkili, güvenilir, duyarlı, tekraredilebilmesinin yanı sıra birden fazla analitin eş zamanlı olarak analiz edilebilir olması nedenleriyle kullanılabilir ve avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bal, Kalıntı, LC-MS/MS, Neonikotinoid, Validasyon.

SUMMARY

Investigation of Some Neonicotinoids in Honey Sold in Ankara by LC-MS/MS

In this study, it was targeted to adapt the test method for the determination of acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam and thiacloprid residues in filtered honey, to investigate neonicotinoid residues with the adapted method, to evaluate the results in terms of food safety and public health. In accordance with the European Commission Decision 2002/657/EC, the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method of analysis of the five neonicotinoids in honey was developed and fully validated simultaneously, quickly and reliably.

As a result of the study, CC α and CC β were respectively 5.44 and 5.89 ng/g for Acetamiprid, 5.23 and 5.46 ng/g for Clothianidin, 5.15 and 5.30 ng/g for Imidacloprid, and for Thiamethoxam, respectively. 5.16 and 5.32 ng/g were found as 20.28 and 20.56 ng/g for Thiacloprid.

After the method validation parameters were provided, the presence of neonicotinoid residues exceeding the maximum residue limits could not be determined in 60 honey samples offered for sale in Ankara. It has been concluded that my adapted method can be used in a short time, using less chemicals, effective, reliable, sensitive, reproducible, and can be used and advantageous because more than one analyte can be analyzed simultaneously.

Keywords: Honey, Residue, LC-MS/MS, Neonicotinoid, Validation.

KAYNAKLAR

- AHMED M., DJEBLİ N., AİSSAT S., KHIATİ B., MESLEM A., ve BACHA S. (2013). In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**: 816–821.
- ALMASAUDI S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi J Biol Sci*, **28**(4): 2188-2196. doi:10.1016/j.sjbs.2020.10.017.
- ALQARNİ A. S., OWAYSS A. A., ve MAHMOUD A. A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, **5**: 618–625.
- ALVAREZ-SUAREZ J. M., GIAMPİERİ F., GONZÁLEZ-PARAMÁS A. M., DAMİANİ E., ASTOLFİ P., MARTİNEZ-SANCHEZ G. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 1508–1516.
- ALVAREZ-SUAREZ J. M., TULIPANI S., ROMANDINI S., BERTOLI E. ve BATTINO M. (2009). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **3**(1): 15-23. doi:10.1007/s12349-009-0051-6.
- ANDERSEN Ø. M., ve MARKHAM K. R. (2006). Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. In Separation and quantification of flavonoids. New York: Taylor & Francis.
- ANONİM (2001). European Commission, Council Directive 2001/110/EC, Offic. J. Eur. Commun. L10/47, 20 December 2001.
- ANONİM (2002). Bal Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, TS 3036. Ankara.
- ARSLAN M. B., KÜÇÜKAYDIN S., ŞAHİN B., DURU M. E.ve ŞAHİN H. T. (2021). *Marchalina hellenica* Genn.'in konuk olduğu kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) kısımlarının fenolik bileşenlerinin belirlenmesi. *Ormancılık Araştırma Dergisi*. doi:10.17568/ogmoad.925760.
- ARSLAN S. ve ÇİÇEKGİL Z. (2018). Türkiye’de Tarım İlacı Kullanım Durumu ve Kullanım Öngörüsü. *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi (TEAD)*, **4**(1): 1-12.
- AVRUPA BİRLİĞİ PESTİSİT VERİ TABANI (2021). Erişim Adresi: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/]. Erişim Tarihi:18.11.2021.
- BAĞCI, H. (2019). Muğla Bölgesinde Üretilen Ballarda Antibiyotik Kalıntılarının Araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar-Türkiye.
- BAL TEBLİĞİ (2020). Resmi Gazete Türk Gıda Kodeksi. Erişim Adresi:[https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm] Erişim Tarihi: 28.12.2020.

- BOGDANOV S., BIERI K., GREMAUND G., IFF D., KANZING A., SEILER K., ZURCHER K., (2003) Bienenprodukte; 23 A Honing. *Swiss Food Manual*, 1-35.
- BONMATIN J., M., GIORIO C., GIROLAMI V., GOULSON D., KREUTZWEISER D. P., KRUPKE C., LIESS M., LONG E., MARZARO M., MITCHELL E., A., D., NOOME D., A., SIMON-DELSON N., TAPPARO A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int*, **22**(1): 35-67. doi:10.1007/s11356-014-3332-7.
- BONTÉ F., VE DESMOULIÈRE A. (2013). Honey: Origin and composition. *Actualités Pharmaceutiques*, **531**: 18–21.
- BREDESON M., M., LUNDGREN J., G. (2018) Thiamethoxam seed treatments reduce foliar predator and pollinator populations in sunflowers (*Helianthus annuus*), and extra-floral nectaries as a route of exposure for seed treatments to affect the predator, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Crop Prot* **106**: 86–92.
- BRUNET JL, BADIÖU A, BELZUNCES LP. (2005). In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Manag Sci*. **61**:742–748
- BUSZEWSKI B., BUKOWSKA M., LIGOR M.ve STANECZKO-BARANOWSKA I. (2019). A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides-properties, applications, occurrence, and analysis. *Environ Sci Pollut Res Int*, **26**(34): 34723-34740. doi:10.1007/s11356-019-06114-w.
- CAN Z., YILDIZ O., SAHIN H., AKYUZ TURUMTAY E., SILICI S.ve KOLAYLI S. (2015). An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem*, **180**: 133-141. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.024.
- CHANG H., Y., DAUGHERTY L., MITCHELL A. (2013) Bee afraid, bee very afraid – neonicotinoids and the nAChRs family. InterPro Protein Focus 25 Sep:1–8 Erişim adresi: [https://proteinswebteam.github.io/interpro-blog/potm/2013_9/prot_foc_13_09.pdf]. Erişim Tarihi: 18.11.2021.
- CHEN M., TAO L., MCLEAN J.ve LU C. (2014). Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *J Agric Food Chem*, **62**(26): 6082-6090. doi:10.1021/jf501397m.
- CHEN W., WU S., ZHANG J., YU F., HOU J., MIAO X.ve TU X. (2019). Matrix-Induced Sugaring-Out: A Simple and Rapid Sample Preparation Method for the Determination of Neonicotinoid Pesticides in Honey. *Molecules*, **24**(15). doi:10.3390/molecules24152761.
- CHROMACADEMY (2021) Erişim Adresi: [https://www.crawfordscientific.com/chrom-academy]. Erişim Tarihi 21.11.2021.
- CIANCIOSI D., FORBES-HERNÁNDEZ T.Y., AFRIN S., GASPARRINI M., REBOREDO-RODRIGUEZ P., MANNA P.P., ZHANG J., LAMAS L.B., FLÓREZ S.M., TOYOS P.A., QUILES J.L., GIAMPIERI F., BATTINO M.,(2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: a review. *Molecules* **23**: 2322. https://doi.org/10.3390/ molecules23092322.

- CODLING G., AL NAGGAR Y., GIESY J. P. ve ROBERTSON A. J. (2016). Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*, **144**: 2321-2328. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.135.
- ÇINAR B., S. (2010). Türk Çam Balının Analitik Özellikleri. Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara-Türkiye.
- ÇUBUK S. (2008). Bal Örneklerinde İndoxcarb Kalıntısının ve Bozunma Ürünlerinin Tayini İçin Yöntem Geliştirme. Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programı Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İstanbul-Türkiye.
- DA SILVA P. M. GAUCHE C., GONZAGA L. V., COSTA A. C. ve FETT R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*, **196**: 309-323. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
- DAŞ Y., K. ve AKSOY A. (2016). Pestisitler. *Türkiye Klinikleri*, **2** (2): 1-14.
- DOĞAN, H. (2014). Çiçek Ballarının Kimyasal Fiziksel ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum-Türkiye.
- DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ (2019). Erşim Adresi: [https://www.who.int/topics/pesticides/en/]. Erişim Tarihi: 31.07.2019.
- EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.*, **50**: 8–36.
- FAIRBROTHER A., PURDY J., ANDERSON T., FELL R. (2014) Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ Toxicol Chem*, **33**:719–731.
- FAO (2019). Bal, Gıda ve Tarım Örgütü. Erişim Adresi: [http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA4657EN/] Erişim Tarihi: 22.09.2021.
- FAO (2021). Statistics at FAO, Erişim Adresi: [http://www.fao.org/statistics/en/] Erişim Tarihi: 27.09.2021.
- FREDERICKSON D., WOHLMAN M., STODDARD D., REGIMBAL G., SCHOLER J., ZACHMANN J., ORTIZ-RIBBING L., MANN R. (2016) Review of neonicotinoid use, registration, and insect pollinator impacts in Minnesota, August 2016. Erişim Adresi: [http://www.mda.state.mn.us/~media/Files/chemicals/reviews/neonicreview rpt2016.pdf]. Erişim Tarihi: 16.11.2021.
- FRIEDLI A., WILLIAMS G., R., BRUCKNER S., NEUMANN P., STRAUB L. (2020). The weakest link: Haploid honeybees are more susceptible to neonicotinoid insecticides. *Chemosphere*, **242**: 125–145.
- GÁMBARO A., ARES G., GIMÉNEZ A., PAHOR (2007). Preference mapping of color of Uruguayan honeys. *Journal of Sensory Studies*, **22**: 507–519.

- GAWEL M., KILJANEK T., NIEWIADOWSKA A., SEMENIUK S., GOLISZEK M., BUREK O.ve POSYNIK A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem*, **282**: 36-47. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.003.
- GBYLIK-SIKORSKA M., SNIEGOCKI T.ve POSYNIK A. (2015). Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **990**: 132-140. doi:10.1016/j.jchromb.2015.03.016.
- HAYES W., J. (1982) Pesticides studies in man. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 86–91.
- HOU J., XIE W., HONG D., ZHANG W., LI F., QIAN Y.ve HAN C. (2019). Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and Royal-jelly by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*, **270**: 204-213. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.068.
- ICH (2006). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology Q2(R1), Current Step.
- ILIA G., SIMULESCU V., MERGHES P. ve VARAN N. (2021). The health benefits of honey as an energy source with antioxidant, antibacterial and antiseptic effects. *Science & Sports*, **36**(4): 272.e271-272.e210. doi:10.1016/j.scispo.2020.10.005.
- IWASA T., MOTOYAMA N., AMBROSE J. T., ROE M., R. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* **23**:371–378.
- İPLİKÇİOĞLU Ç. G., KORKMAZ S. D., CENGİZ G.ve KÜPLÜLÜ Ö. (2020). Türkiye’deki bal örneklerinde neonicotinoid varlığının LC-MS/Q-TOF yöntemi ile tespiti. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11-17. doi:10.24998/maeusabed.695570.
- JESCHKE P., NAUEN R., SCHINDLER M.ve ELBERT A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem*, **59**(7): 2897-2908. doi:10.1021/jf101303g.
- JOVANOV P., GUZSVÁNY V., LAZIĆ S., FRANKO M., SAKAČ M., ŠARIĆ L.ve KOS J. (2015). Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, **40**: 106-113. doi:10.1016/j.jfca.2014.12.021.
- KARADAL F. ve YILDIRIM Y. (2012). Balın Kalite Nitelikleri, Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*, **9**(3): 197-209.
- KARTAL N. M. (2019). Neonicotinoid pesticide applications outcomes; contaminate honey and honey bees. *Türkiye Halk Sağlığı Dergisi*, 88-91. doi:10.20518/tjph.405719.
- KAYA S. (2014). Pestisidler, Veteriner Toksikoloji (s. 301-391). Ankara: Medisan.
- KIMURA-KURODA J., KOMUTA Y., KURODA Y., HAYASHI M.ve KAWANO H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and

imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One*, **7**(2): e32432. doi:10.1371/journal.pone.0032432.

KOLAYLI S., CAN Z., YILDIZ O., SAHIN H.ve KARAOGLU S. A. (2016). A comparative study of the antihyaluronidase, antiurease, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) honeys. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **31**(sup3): 96-104. doi:10.1080/14756366.2016.1209494.

KRUVE A., REBANE R., KIPPER K., OLDEKOP M. L., EVARD H., HERODES K., RAVIO P., LEITO I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. *Anal Chim Acta*, **870**: 29-44. doi:10.1016/j.aca.2015.02.017.

LAANISTE A., LEITO I., REBANE R., LOHMUS R., LOHMUS A., PUNGA F.ve KRUVE A. (2016). Determination of neonicotinoids in Estonian honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Environ Sci Health B*, **51**(7): 455-464. doi:10.1080/03601234.2016.1159457.

LAYCOCK I., LENTHALL K., M., BARRATT A., T., CRESSWELL J., E. (2012) Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* **21**:1937–1945.

LIGOR M., BUKOWSKA M., RATIU I. A., GADZALA-KOPCIUCH R.ve BUSZEWSKI B. (2020). Determination of Neonicotinoids in Honey Samples Originated from Poland and Other World Countries. *Molecules*, **25**(24). doi:10.3390/molecules25245817.

MİTCHELL E. A., MULHAUSER B., MULOT M., MUTABAZİ A., GLAUSER G., AEBİ A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* **358**(6359): 109-111.

MOFFAT C., BUCKLAND S., T., SAMSON A., J., MCARTHUR R., PINO V., C., BOLLAN K., A., HUANG J., T-J., CONNOLLY C., N. (2016) Neonicotinoids target distinct nicotinic acetylcholine receptors and neurons, leading to differential risks to bumblebees. *Sci Rep* **6**:24764.

MORRISSEY C., A., MINEAU P., DEVRIES J., H., SANCHEZ-BAYO F., LIESS M., CAVALLARO M., C., LIBER K. (2015) Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ Int* **74**: 291–303.

MRZLIKAR M., HEATH D., HEATH E., MARKEL J, J., KANDOLF BOROVŠAK A.ve PROSEN H. (2019). Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. *Lwt*, **104**: 45-52. doi:10.1016/j.lwt.2019.01.017.

MUTLU C., ERBAŞ M. ve ARSLAN TONTUL S. (2017). Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, **15**(1): 75-83.

NIKHAT S. ve FAZIL M. (2021). History, phytochemistry, experimental pharmacology and clinical uses of honey: A comprehensive review with special reference to Unani medicine. *J Ethnopharmacol*, **282**: 114614. doi:10.1016/j.jep.2021.114614.

OLIVIERA, R., QUEIROZ, S., LUZ, C., PRTO, R., RATH, S. (2016). Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*, **163**:52553.

ÖLMEZ Ç. (2009). Türkiye'de Üretilen Farklı Çiçek ve Salgı Bal Çeşitlerinin Bazı Kalitatif ve Besinsel Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Konya-Türkiye.

ÖZDEMİR N. (2016). Tekirdağ İli ve Çevresinden Toplanan Bal Örneklerin de Neonikotinoid Pestisit Kalıntılarının Araştırılması.Namık Kemal Üniversitesi,Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi- Tekirdağ.

PARADIS D., BERAİL G., BONMATIN J. M.ve BELZUNCES L. P. (2014). Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, **406**(2): 621-633. doi:10.1007/s00216-013-7483-z.

PISA L.,W., AMARAL,ROGERS V., BELZUNCES L., P., BONMATIN J., M., DOWNS C.,A., GOULSON D., KREUTZWEISER D., P., KRUPKE C., LIESS M., MCFIELD M., MORRISSEY C., A., NOOME D., A., SETTELE J., SIMON DELSO N., STARK J., D., VAN DER SLUIJS J., P., VAN DYCK H., WIEMERS M. (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**:68–102.

RAHMAN M. M., GAN S. H.ve KHALİL M. I. (2014). Neurological effects of honey: current and future prospects. *Evid Based Complement Alternat Med*, **958721**. doi:10.1155/2014/958721.

RESMÎ GAZETE (2017). ERİŞİM ADRESİ:
[<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/03/20170307-4.htm>] Erişim
Tarihi:07.07.2021.

REYNOSO E.C., TORRES E., BETTAZZI F., PALCHETTI I. (2019) Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors*, **9**(1):20.

SÁNCHEZ-BAYO F. (2018) Systemic insecticides and their environmental repercussions. In: Dellasala DA, Goldstein MI (eds) Encyclopedia of the Anthropocene. Elsevier, Oxford, pp 111–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09895-X>.

SÁNCHEZ-BAYO F., GOULSON D., PENNACCHIO F., NAZZI F., GOKA K., DESNEUX N. (2016) Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environ Int*, **89**:7–11.

SCHAAFSMA A., LIMAY RIOS V., BAUTE T., SMITH J., XUE Y. (2015) Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PLoS One* **10**:e0118139.

SCHNEIDER, C.,W., TAUTZ, J., GRÜNEWALD, B., FUCHS, S. (2012) RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**:e30023:1–9.

SERAGLIO S.K.T., SCHULZ M., BRUGNEROTTO P., SILVA B., GONZAGA L. V., FETT R.ve COSTA A. C. O. (2021). Quality, composition and health-protective properties of citrus honey: A review. *Food Res Int*, **143**: 110268. doi:10.1016/j.foodres.2021.110268.

- SHENDY A., GHOBASHY M., MHAMMED M., ALLA S., LTFY H.(2016). Simultaneous determination of 200 pesticide residues in honey using gas chromatography tandem mass spectrometry in conjunction with stream lined quantification approach. *Journal of Chromatography A*, **1427**:143-160.
- SINGARAVELAN N., NEE'MAN G., INBAR M.ve IZHAKI I. (2005). Feeding responses of free-flying honeybees to secondary compounds mimicking floral nectars. *J Chem Ecol*, **31**(12): 2791-2804. doi:10.1007/s10886-005-8394-z
- SONG S., ZHANG C., CHEN Z., HE F., WEI J., TAN H.ve LI X. (2018). Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC-MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. *J Chromatogr A*, **1557**: 51-61. doi:10.1016/j.chroma.2018.05.003.
- TANANAKI C., THRASYVOULOU A., GIRAUEDEL J.ve MONTURY M. (2007). Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps. *Food Chemistry*, **101**(4): 1687-1693. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.042.
- TANNER G. ve CZERWENKA C. (2011). LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. *J Agric Food Chem*, **59**(23): 12271-12277. doi:10.1021/jf202775m.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI (2018a). Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü. Erişim Adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf] Erişim Tarihi: 24.02.2022.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI (2018b). Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü. Erişim Adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_OB_Rehberi.pdf] Erişim Tarihi: 24.02.2022.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI (2021a). Tarım Ürünleri Piyasaları Arıcılık. Strateji Geliştirme Başkanlığı Erişim Adresi: [https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge] Erişim Tarihi: 27.09.2021.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI (2021b). Orman Genel Müdürlüğü. Hemşin Bal Üretim Ormanı Projesi (2012-2019) Erişim Adresi: [https://web.ogm.gov.tr/ekutuphane/Dokumanlar/Hem.Projesi.pdf] Erişim Tarihi: 07.10.2021.
- TKDK (2016). Arıcılık Sektör Toplantısı Sonuç Raporu. Tarım ve Kırsal Kalkınma Destekleme Kurumu Erişim Adresi:[https://www.tkd.gov.tr/Content/File/Yayin/Rapor/Arıcılıkv2.pdf] Erişim Tarihi: 01.02.2021.
- TOPTANCI İ. (2013). Çiçek ve Salgı Ballarında Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (Pah), Pestisit Ve Antibiyotik Kalıntılarının GC/MS ve LC/MS/MS İle Belirlenmesi. Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara-Türkiye.
- TRADE MAP (2021). Erişim Adresi: [https://www.trademapp.org/] Erişim Tarihi:01.06.2021.
- TUZEN M., SILICI S., MENDİL D.ve SOYLAK M. (2007). Trace element levels in honeys

from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, **103**(2): 325-330. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.053.

TÜİK (2021). Türkiye İstatistik Kurumu, Hayvansal Üretim İstatistikleri, Aralık 2020.

UKİP (2018). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ulusal Kalıntı İzleme Planı, Türkiye.

WOOD S., C., KOZII I., V., KOZIY R., V., EPP T., SIMKO E. (2018) Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees. *PLoS One* **13**(1):e0190517.

WOOD T., J., ve GOULSON D. (2017) The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res Int* **24**(21):17285–17325.

WOODCOCK B. A., RIDDING L., FREEMAN S. N., PEREIRA M. G., SLEEP D., REDHEAD J., ASTON D., CARRECK L. D., RICHARD F. S., BULLOCK J. M., MATTHEW S. H., PYWELL R. F. (2018). Neonicotinoid Residues In Uk Honey Despite European Union Moratorium. *plos one*, **13**(1): e0189681. doi:10.1371/journal.pone.0189681.

XU X., WANG X., YANG Y., ARES I., MARTINEZ M., LOPEZ-TORRES B., MARTINEZ-LARRANAGA M. R., WANG H., ANADON A., MARTINEZ M. A. (2022). Neonicotinoids: mechanisms of systemic toxicity based on oxidative stress-mitochondrial damage. *Arch Toxicol*, **96**(6): 1493-1520. doi:10.1007/s00204-022-03267-5.

YALÇIN M ve TURGUT C. (2016). Bal Arılarında Koloni Kaybı. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **13**(1): 151 - 157.

YANG, L., ZHAO Y., L., ZHAO C., Y., LI H., H., WANG M., J., MORRIS NATSCHKE S., L., QIAN K., LEE K., H., LIU Y., Q. (2014) Design, synthesis, crystal structure, bioactivity, and molecular docking studies of novel sulfonylamidine-derived neonicotinoid analogs. *Med Chem Res*, **23**:5043–5057.

YETER O. ve AYDIN A. (2020). The fate of acetamiprid and its degradation during long-term storage of honey. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, **37**(2): 288-303. doi:10.1080/19440049.2019.1696019

YILDIZ İ., RASGELE G., P.ve KEKEÇOĞLU M. (2016). Çam, Pamuk, Yayla ve Ayçiçeği Ballarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **16** (1): 2-11.

YÜCEL Y ve SULTANOĞLU P. (2013). Characterization of honeys from Hatay Region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience*, **1**: 16-25. doi:10.1016/j.fbio.2013.02.001.

ZİRAAT MÜHENDİSLERİ ODASI (2019). Ülkemizde Bitki Koruma Ürünleri ve Buna Bağlı Konular Üzerine Değerlendirme. Erşim Adresi: [http://www.zmo.org.tr/]. Erişim Tarihi: 14.11.2019