



## Giresun'da Üretilen Ballarda Neonikotinoid Kalıntı Varlığının LC-MS/MS ile Araştırılması

Seda Dicle KORKMAZ<sup>1\*</sup> Özlem KÜPLÜLÜ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü 28600, Espiye, Giresun-Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, 06110, Dışkapı, Ankara-Türkiye

Geliş Tarihi: 05.07.2023

Kabul Tarihi: 11.08.2023

Basım Tarihi: 30.09.2023

Atf yapmak için: Korkmaz, S.D. & Küplülü, Ö. (2023). Giresun'da üretilen ballarda neonikotinoid kalıntı varlığının LC-MS/MS ile araştırılması. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 8(3), 326-332. <https://doi.org/10.35229/jaes.1323223>

How to cite: Korkmaz, S.D. & Küplülü, Ö. (2023). Investigation of neonicotinoids insecticides with LC-MS/MS in honey produced in Giresun. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 8(3), 326-332. <https://doi.org/10.35229/jaes.1323223>

\*ID: <https://orcid.org/0000-0002-4272-300X>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-1559-2390>

**Öz:** Neonikotinoidler; geniş ticari yayılımları, etki biçimleri, sistemik özellikleri, kalıcılıkları ile insektisit ve metabolitlerinin toksisite profilleri, canlı organizmalar üzerindeki etkileri göz önüne alındığında çevreye ve besin zincirine önemli bir tehdittir. Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitlere alternatif olarak geliştirilen bu maddeler, polen ve nektar dâhil bitkilerin tüm kısımlarına geçmekte, başta arı ürünleri olmak üzere bu bitkilerden üretilen ürünlere aktarılabilmektedir. Neonikotinoidler, sistemik etkileriyle bal arıları ve yabani arılar gibi canlıların yanı sıra, diğer omurgalılar üzerinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır. Günümüzde neonikotinoid türevleri ve oluşturdukları etkilere ilişkin çalışmalar hızla artmakta, çalışma sonuçlarına göre farklı ülkelerde kullanımlarına yasak ve kısıtlamalar getirilmektedir. Çalışmanın amacı, Giresun ilinde üretilen ballarda neonikotinoid varlığı ve miktarının tespit edilerek çevredeki kirlilik seviyesinin ölçülmesi ile olası halk sağlığı risklerinin ortaya konulmasıdır. Bu amaçla Giresun'un özellikle fındık tarımı yapılan bölgelerine yakın alanlarda sabit arıcılık yapan yetiştiricilerden yeni hasat döneminde alınan 50 adet bal örneği materyal olarak kullanıldı. Örneklerde neonikotinoid (acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, imidacloprid, nitenpyram, thiomethoxam ve dinotefran) varlığı, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile tespit edildi. Analiz sonuçlarına göre; 50 bal örneğinin 9'unda imidacloprid, 2'sinde thiomethoxam, 1'inde ise hem imidacloprid hem thiomethoxam 10 ppb'nin üzerinde saptanmış olup toplam 12 örnekte neonikotinoid belirlenmiştir. Sonuç olarak; besleyici değeri yüksek, sağlıklı diyetlerin vazgeçilmezi, tedavi amaçlı tüketimi önerilen ballardaki olası neonikotinoid varlığı halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlikedir. Özellikle çocuklar ve yaşlılar tarafından sıklıkla tüketilen bal ve diğer arı ürünlerindeki neonikotinoid kontaminasyonu, oluşturabileceği sağlık riskleri açısından son derece önemlidir. İyi tarım uygulaması çerçevesinde arıcılık yapılan alanların seçimi ve AB' uygulamalarına paralel olarak bu yönde neonikotinoid kullanımına sınır getirilmesi oluşabilecek risklerin önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca bölgedeki arı yetiştiricilerinin konu ile ilgili bilgilendirme ve bilinçlendirilmesi açısından da önemlidir.

\*Sorumlu yazar:

Seda Dicle KORKMAZ  
Gıda İşleme Bölümü, Espiye Meslek  
Yüksekokulu, Giresun Üniversitesi, 28600,  
Espiye, Giresun-Türkiye  
✉: [diclekahraman@gmail.com](mailto:diclekahraman@gmail.com)

**Anahtar kelimeler:** Bal, halk sağlığı, kontaminant, LC-MS/MS, neonikotinoid.

## Investigation of Neonicotinoids Insecticides with LC-MS/MS in Honey Produced in Giresun

**Abstract:** Neonicotinoids are a significant threat to the environment and the food chain given their wide commercial distribution, mode of action, systemic properties, persistence, toxicity profiles of insecticides and metabolites, and their effects on living organisms. These substances, developed as an alternative to organophosphate and carbamate insecticides, pass to all parts of plants, including pollen and nectar, and can be transferred to products produced from these plants, especially bee products. With these systemic effects, neonicotinoids lead to negative effects on living things such as honey bees and wild bees, as well as other vertebrates. Currently, studies on neonicotinoid derivatives and their effects are increasing rapidly, and according to the results of the study, bans and restrictions are imposed on their use in different countries. The aim of the study was to determine the presence and amount of neonicotinoids in honey produced in Giresun province and to measure the level of pollution in the environment and possible public health risks it is revealed. For this purpose, 50 honey samples taken during the new harvest period from growers engaged in stationary beekeeping in areas close to Giresun's nut-growing regions were used as materials. The presence of neonicotinoid in the samples was detected by LC-MS/MS. According to the analysis results; imidacloprid was detected in 9 of 50 honey samples, thiomethoxam in 2, and both imidacloprid and thiomethoxam in 1 were above 10 ppb, which is the limit value, and neonicotinoids were determined in a total of 12 samples. As a result, the presence of possible neonicotinoids in honey, which is recommended for therapeutic consumption, a sine qua non of healthy diets with high nutritional value, is a potential danger to public health. Within the framework of good agricultural practice, the selection of beekeeping areas and the introduction of restrictions on the use of neonicotinoids in this direction in parallel with the EU are important for preventing possible risks.

\*Corresponding author:

Seda Dicle KORKMAZ  
Department of Food Processing, Espiye  
Vocational School, Giresun University, 28600,  
Espiye, Giresun-Turkey.  
✉: [diclekahraman@gmail.com](mailto:diclekahraman@gmail.com)

**Keywords:** Contaminant, honey, public health, LC-MS/MS, neonicotinoid

## GİRİŞ

Neonikotinoidler, organofosfatlı ve karbamath insektisitlere alternatif olarak geliştirilen; tarım, bahçe ve ormancılıkta (tohum ıslahı, kereste koruma, su ürünleri yetiştiriciliği, çiftlik ve ev hayvanı vektör kontrol tedavileri vb.) yüzlerce ürünleri de insekt ile mücadelede kullanılan, etkilerini nikotinik asetilkolin reseptörü üzerinde nörotoksisite oluşturarak gösteren kimyasal bir sınıftır (Cimino vd., 2017; Simon vd., 2015). Neonikotinoidler, 90'ların sonlarında yeni bir insektisit sınıfı olarak değerlendirilen, etkili ve geniş spektrumlu insektisidal aktiviteleri, benzersiz etki şekilleri ve memeliler için varsayılan daha düşük toksisite nedeniyle dünya çapında yaygın kullanım alanı bulmuştur. İmidakloprid, asetamiprid, klotianidin, thiakloprid, tiamethoksam, dinotefuran ve nitenpiram bu sınıfın üyeleri arasında olup arı ölümlerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir. İlk kez 1980'lerde organofosfatlı ve karbamath insektisitlere alternatif olarak geliştirilmiş ve 1990'larda ilk ticari preparat olan imidakloprid ile kullanımları başlamıştır (Bonmatin vd., 2015; Çil vd., 2020).

Neonikotinoidler 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. İlk nesil neonikotinoidler kloronikotiniller olup; imidakloprid (en yaygın), nitenpyram, acetamiprid ve thiaclopridi, ikinci nesil neonikotinoidler tianikotinil olup thiamethoxam ve clothianidini, üçüncü nesil neonikotinoidler furanonikotiniller olup dinotefuramı kapsar (Tomizawa & Casida, 2005; Decourtye & James, 2010). 1990'ların sonlarından bu yana yeni bir insektisit sınıfı olarak ortaya çıkan neonikotinoidler, etkili ve geniş spektrumlu insektisidal aktiviteleri, benzersiz etki şekilleri, varsayılan düşük toksisite nedeniyle dünya çapında yaygın kullanım alanı bulmuştur. Hatta bazı araştırmacılar tarafından, kullanım miktarlarının yüksek olması ve zararlarının geç fark edilmesi açısından bu gruptaki pestisitleri DDT'ye benzetmektedir (Demares vd., 2018; Zhang vd., 2018). Toprakta, yer altı sularında, yabani otlarda kalıntı yüzdesinin yüksek olması, arı ve ürünlerindeki kalıntıları, uzun yarılanma ömrü, polinatörler üzerindeki etkileri nedeniyle neonikotinoid insektisitlerin potansiyel tehlikeleri tartışılmaktadır (Kartal, 2019).

Neonikotinoid insektisitler yağlı tohumlar, tahıllar, meyveler, sebzeler ve süs bitkileri gibi birçok tarımsal üründe kullanılmaktadır. Ayrıca çimlerde, ağaçlarda, yerleşim bölgelerindeki dış mekanlarda da insektisit olarak kullanım alanı bulmaktadır. Sistemik özellikleriyle suda kolay çözünüp bitkilerin kök ve yaprakları yoluyla emilerek tüm dokulara taşınan neonikotinoidler, polen ve nektar gibi kısımlarında da tespit edilmektedir. (Koc vd., 2008; Main vd., 2014). Bununla birlikte ana bileşiklerin ve bunların

metabolitlerinin çevreye ve besin zincirine aktarılabilmesi de, bu insektisitlerin kullanımı ile ilgili tedirginlik oluşturmaktadır (Sánchez vd., 2014). Gıdaların (sebze, meyve, arı ürünleri vb.) hemen her dokusuna penetre olup soyulma veya yıkanma yoluyla uzaklaştırılmamaktadır (Zhang vd., 2019). Örneğin; İnsan diyetinde sıklıkla bulunan çeşitli gıdalardaki neonikotinoid varlığını araştıran bir çalışmada, meyvelerin %72'sinde, sebzelerin %45'inde ve bal örneklerinin %50'sinde her bir örnek için en az iki farklı neonikotinoide rastlanmış, tüm polen örneklerinin de birden fazla neonikotinoid içerdiği ortaya konulmuştur. Tüm örnekler için, en yüksek saptama oranına sahip neonikotinoid imidaclopriddir (Chen vd., 2014).

Neonikotinoidler sistemik özellikleri nedeniyle hedef canlılar dışındaki canlıları da etkilemektedir. Neonikotinoidler, özellikle bal arıları ve yabani arılar gibi tozlaştırıcılar başta olmak üzere insanlar dahil omurgalılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. İnsan sağlığı üzerine direkt etkileri arasında fallot tetralojisi, anensefali, otizm spektrum bozuklukları, hafıza kaybı, tremor gibi gelişimsel ve nörolojik bozukluklar bulunmaktadır. Neonikotinoidlerin özellikle gelişim sırasında beyin işlevi için kritik öneme sahip nAChR reseptörlerini nikotine benzer şekilde etkilediği bilinmektedir. Bununla birlikte, memelilerde talamusta yoğun bulunan nöralproliferasyon, apoptoz, sinaps oluşumu, migrasyon gibi birçok görevde yer alan nAChR'lerin en belirgin alt tipi  $\alpha 4\beta 2$ 'ye bağlanarak toksik etki oluşturup Alzheimer, Parkinson, şizofreni ve depresyon gibi birçok merkezi sinir sistemi bozukluğuna neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca neonikotinoidlerin endokrin bozukluğu, sperm üretim ve fonksiyonlarında azalma, dişilerde infertilite, erken ve ölü doğumlar, düşük yavru ağırlığı gibi olumsuz üreme ve gelişimsel etkileri bulunmaktadır (Chen vd., 2014; Gibbons vd., 2015).

Çevreye ve özellikle bal arılarına verdiği zarar nedeniyle Kanada'da 2015 yılında bütün neonikotinoidlerin, 2018 yılında Avrupa Birliği'nde clothianidin, imidakloprid ve thiamethoxamin kullanımı yasaklanmıştır. Amerika'nın bazı eyaletlerinde sınırlandırmalar getirilmesine rağmen halen neonikotinoid kullanımı devam etmektedir. Türkiye'de ise acetamipridin kullanımına izin verilirken clothianidin yasaklanmış, imidakloprid, thiakloprid ve thiamethoxam kullanımlarına ise çeşitli sınırlandırmalar getirilmiştir (EC, 2014; PMRA, 2015; TOB, 2022).

Neonikotinoid kalıntılarının analizine odaklanan yöntemlerde, meyve ve sebzelerin yanı sıra hayvansal gıdalarda da kalıntı düzeyleri araştırılmaktadır. Neonikotinoidlerin doğada yaygın olarak kullanılması ve bal arılarına etkileri göz önüne alındığında baldaki kalıntılarının varlığı ve miktarının uygun analitik

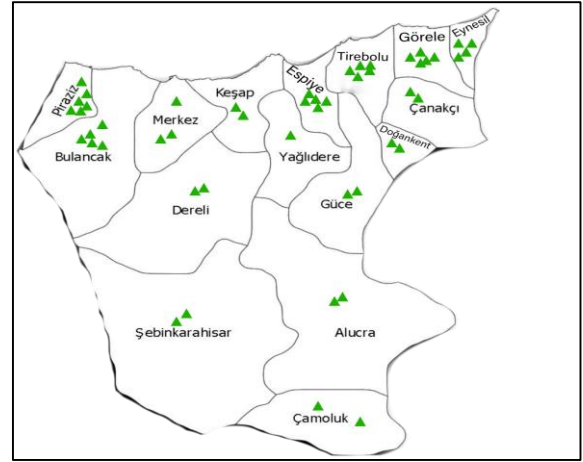
yöntemlerle tespiti gerekliliği dikkati çekmektedir. Ancak çok az sayıda yayın baldaki neonikotinoid kalıntılarının analizini özel olarak hedeflemektedir (Proietto vd., 2013; Gbylik vd., 2015). 2000'li yıllarda geliştirilen ve ilk olarak 2003 yılında bildirilen QuEChERS tekniği hızlı ve eksiksiz bir ekstraksiyon ve temizleme prosedürüdür (Eurochem Guide, 2014). Bu çalışmada bu yöntem tercih edilerek, bal gibi, yoğun şeker konsantrasyonuna sahip matrislerden, güvenilir sonuçlar elde etme şansı artırılmıştır. Neonikotinoidlerin tespit ve miktar analizlerinde, başlıca gaz kromatografisi veya sıvı kromatografisi gibi kromatografik metodlar yanında, UV/diyot dizisi, floresans, elektrokimyasal veya kütle spektrometrisi gibi farklı birçok teknik de kullanılmaktadır (Cicero vd., 2017).

Baldaki pestisit kalıntı çalışmaları ile ilgili Türkiye'de birçok çalışma bulunmasına rağmen neonikotinoid grubunun bal ve diğer arı ürünlerinde kalıntısına ilişkin yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Türkiye'nin de aralarında olduğu bir çalışmada, dünyanın farklı bölgelerindeki yerel üreticilerden 198 bal örneği toplanmış ve neonikotinoid varlığı bakımından incelenmiştir. Bu balların %75'inde neonikotinoid kalıntılara rastlanmıştır (EC, 2002; Mitchell vd., 2017). Benzer şekilde Avusturya'nın farklı bölgelerinden toplanan 41 bal numunesindeki neonikotinoid kalıntılarının LC-MS/MS ile araştırıldığı çalışmada üç neonikotinoid varlığı dikkat çekmiştir; tiakloprid (18 numune), asetamiprid (2 numune) ve tiyametoksam (1 numune). Ancak numunelerdeki kalıntı düzeyleri MRL'lerle karşılaştırıldığında, tümünün ilgili sınırların altında olduğu bildirilmiştir (Tanner & Czerwenka, 2011).

Türkiye'de fındık başta olmak üzere yoğun tarımsal faaliyetin yapıldığı Giresun ili ve çevresinde arıcılığında yaygın olması örneklerin bu bölgeden temin edilmesinde en önemli etkidir. Çalışmada amaç, Giresun ve çevresinde üretilen ballarda neonikotinoid varlığı ve miktarının tespit edilerek çevredeki kirlilik seviyesinin ölçülmesi ile olası halk sağlığı risklerinin ortaya konulmasıdır.

## MATERYAL VE METOT

**Araştırma Materyali:** Çalışmada Giresun ilinde sabit arıcılık yapan yetiştiricilerden hasat döneminde temin edilen 50 adet süzme bal örneği materyal olarak kullanılmıştır. Toplanan bal örnekleri cam kavanozlara alınarak analiz aşamasına kadar laboratuvarında  $20 \pm 2$  °C'de muhafaza edilmiştir. Giresun ilinde balların temin edildiği örnekleme alanları Şekil 1.'de verilmiştir. Örneklere ait neonikotinoid kalıntısı varlığı ve miktarı (asetamiprid, klotianidin, tiakloprid, imidakloprid, nitenpiram, tiamethoksam ve dinotefuran), sıvı kromatografi-kütle spektrofotometresi (LC-MS/MS) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Giresun ilinde bal örneklerinin temin edildiği örnekleme alanları. **Figure 1.** Sampling areas where honey samples are collected in Giresun.

**Yöntemler:** Bu çalışmada, bal örnekleri modifiye Quechers AOAC 2007.01 yöntemi ile hazırlanarak LC-MS/MS ile analizi ve miktarlandırması yapılmıştır (Anastassiades vd., 2003; Lehotay vd., 2005).

**Kimyasallar ve Reaktifler:** Analizler için kullanılan asetonitril ve metanol HPLC saflıkta olup Merck firmasından temin edilmiştir (Darmstadt, Germany). Mobil faz tampon için formik asit (J.T.Baker, Holland) ve amonyum format (Fluka, USA) kullanılmıştır. Numune hazırlama işleminde Quechers tuz karışımları; 1. set magnezyum sülfat ve sodyum asetat karışımı ile 2. set için magnezyum sülfat, karbon 18 ve primersekonderamin (PSA) karışımları (Chromatific, Germany) kullanılmıştır. Ultra saf su Millipore Direct-Q 3UV su arıtma düzeneğinden elde edilmiştir (Merck, Germany). Sertifikalı analitik saflıkta standartlar Dr.Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) markadır. Stok çözeltiler 10 ml hacimde %0,1 asetik asit içeren asetonitrilde hazırlanmıştır. 1mg/ml derişimde hazırlanarak -18°C'de saklanmıştır. Seyreltme işlemlerinde %0,1 asetik asit içeren asetonitril kullanılmıştır. Kalibrasyon çözeltileri, pestisit içermeyen numunelerin hazırlandığı çözeltiler kullanılarak oluşturulmuştur. Matris eşleşmiş olarak hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinde matris çözelti miktarı %90 oranında tutulmuştur.

**Ekstraksiyon Aşaması:** Numune hazırlama aşamasında, 5 gr numune ile çalışılmıştır. Numunelerin ekstraksiyon aşamasında Quechers yöntemi kullanılmıştır (Anastassiades vd., 2003; Lehotay vd., 2005).

Bal numuneleri karıştırılarak homejen hale getirildikten sonra 5,0 gr örnek 50 ml santrifüj tüpüne tartılarak alındı. Üzerine 10 ml saf su ilave edilerek vorteks karıştırıcıda 30 sn karıştırıldı. 15 ml % 1 asetik asit içeren asetonitril eklendi ve elde 1 dk çalkalandı. Homojen hale getirilen çözelti üzerine 6,0 gr MgSO<sub>4</sub> ve 1,5 gr Sodyum asetat ilave edilip elde 1 dk daha çalkalandı. 4000 devirde 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, üst fazdan 8 ml

alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Bunun üzerine 1,2 gr MgSO<sub>4</sub> ve 400 mg PSA içeren tuz karışımı eklenerek elde 1 dk karıştırıldı ve 4000 devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası üst fazdan 1 ml alınarak 0,45 µm enjektör filtreden süzülerek vialde alındı. LC-MS/MS sistemine enjekte edildi. Matriks eşleştirilmiş (Matrix Matched) kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması için analizi yapılmış bal numunelerinden, içeriğinde pestisit kalıntısı tespit edilememiş olan numune ekstraktı ile standart çözeltiler hazırlanmıştır.

**LC-MS/MS:** Hazırlanan bal numunelerinin neonikotinoid içeriği tespitinde, Elektrosprey pozitif iyonlaşma ile LC-MS/MS sistemi (Agilent 6460, USA) kullanılmıştır.

Miktarlandırma çalışmalarında matriks girişimleri göz önünde bulundurularak, temiz olduğu belirlenen numune ile ekstraktı matriks eşleşmiş kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Sistem koşulları aktif madde bazında optimize edilerek en hassas voltaj değerleri bulundu. Bu değerler sırasıyla Ana iyon, Parçalanma iyonları, Parçalama enerjisi ve Fragmentasyon voltajı'dır. Pestisit tayini için kullanılacak cihaz koşulları Tablo 1.'de, MRM geçiş bilgileri Tablo 2.'de verilmiştir.

**Tablo 1.** HPLC ve MS sistemine ait koşullar.

**Table 1.** HPLC and MS system conditions.

<b>Mobil Faz</b>	A: 5mM Amonyum Format+% 0,1 Formik asit içeren su B: 5mM Amonyum Format+% 0,1 Formik asit içeren metanol
<b>Kolon</b>	Agilent Poroshell SB-C18 3mm x 100mm x 2,7µm
<b>Kolon Fırın Sıcaklığı</b>	35 °C
<b>Enjeksiyon Hacmi</b>	5 µl
<b>Analiz süresi</b>	16 dakika
<b>Pompa Gradient programı (süre-%B)</b>	0 dk-%20B, 0.2 dk-%20B, 3 dk-%70B, 6dk-%95B, 12dk-%95B, 12.1dk-%20B
<b>MSMS koşulları</b>	MRM modu, pozitif ESI Kurutma gazı: 300 °C Kurutma gaz akışı: 11 L/dk Nebülizatör: 40 ps Kapiler voltaj: 4000 V

**Tablo 2.** Belirlenen neonikotinoidler için MRM geçişleri.

**Table 2.** MRM transitions for neonicotinoids.

	Ana iyon	Parçalanma iyonu	Fragmentör voltajı	Çarpışma enerjisi	İyonlaşma modu
Acetamiprid	223,1	56	80	11	Positive
Acetamiprid	223,1	126	80	15	Positive
Clothianidin	250	132	120	12	Positive
Clothianidin	250	169	120	8	Positive
Dinotefuran	203	129	130	8	Positive
Dinotefuran	203	114	130	12	Positive
Imidacloprid	256,1	175	80	12	Positive
Imidacloprid	256,1	209	80	10	Positive
Nitenpyram	271,1	126	120	25	Positive
Nitenpyram	271,1	225	120	2	Positive
Thiacloprid	253	126	90	17	Positive
Thiacloprid	253	186	90	40	Positive
Thiamethoxam	292	181	80	19	Positive
Thiamethoxam	292	211	80	5	Positive

**Validasyon:** Metot validasyon çalışmalarında Eurochem kılavuzu ve SANCO 12571/2013 referans olarak alınmıştır (Eurochem Guide, 2014; EC, 2014).

Çalışılan validasyon parametreleri spesifiklik, doğruluk, tekrarlanabilirlik, tespit ve teşhis limiti ve lineerlik'tir. Spesifiklik için kör numuneler, solventler, referans standartlar ve örneğe katım yapılmış (spike) çözeltiler çalışılmıştır. Her bir MRM geçişinin kontrolü, alıkonma süresi ve oluşan ürün iyonlarının oranı değerleri

sağlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri, spike yapılmış örneklerin sinyal:gürültü oranına göre hesaplanmıştır. Miktarlandırma için kullanılan kalibrasyon eğrisi 7 noktalı olarak hazırlanmıştır (1-100 ppb).

## BULGULAR

Aktif maddelerin optimizasyonu için, asetonitril içerisinde hazırlanmış 5ppm standart çözeltiler kullanılmıştır. Kütle dedektör parametreleri en uygun voltaj değerleri bulunarak optimize edilmiştir. Bu değerler Tablo 2.'de gösterilmiştir.

Metot validasyon çalışmaları, Eurochem kılavuzu ve EC direktifi 2002/657 kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Eurochem Guide, 2014; EC,2002). Geri kazanım (GK) değerleri %70-120 aralığında, tekrarlanabilirlik değeri ise %15'ten küçük olarak tüm analitler için elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri 2.5-100ppb aralığında kullanılmıştır, tüm analitler için  $r^2 > 0.99$  değeri sağlanmıştır. Detaylar Tablo 3.'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Kalibrasyon, LOD, LOQ, % GK değerleri.

**Table 3.** Calibration, LOD, LOD, % Regain values.

Aktif madde	Kalibrasyon 2,5-100ppb	r2	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	GK % 10µg/kg
Acetamiprid	y=4126,6x-1694,4	0,9996	0,5	2,0	86,4±6.2
Clothianidin	y=1493,3x-570	0,9936	0,6	2,0	87,6±9.4
Dinotefuran	y=2445,0x-444.4	0,9995	0,4	1,2	82,5±12.2
Imidacloprid	y=4874,9x-611	0,9964	0,2	0,7	89,7±7.6
Nitenpyram	y=4740,3x-3134	0,9986	0,6	2,1	83,8±11.2
Thiacloprid	y=6744,6x-1658	0,9994	0,1	0,5	84,9±8.1
Thiamethoxam	y=2801,9x-1384	0,9995	0,3	1,1	94,1±6.5

Analize alınan toplam 50 adet bal örneğinden 12'sinde LOQ seviyesinden (10 ppb) yüksek neonikotinoid grubu insektisitlere rastlanmıştır. Buna göre 10 örnekte imidacloprid miktarı 0.012-0.086 mg/kg aralığında bulunurken, 3 örnekte (G1,G2,G8) thiomethoxam (0.016; 0.018; 0.024 mg/kg) saptanmıştır. Ayrıca, örneklerden 1'inde (G2), hem imidacloprid hemde thiomethoxam saptanırken değerler sırasıyla; 0.013 mg/kg ve 0.018 mg/kg'dır. Analize alınan bal örneklerine ait sonuçlar Tablo 4.'de verilmiştir.

**Tablo 4.** Neonikotinoid kalıntısı saptanan bal örnekleri ve miktarları (mg/kg).

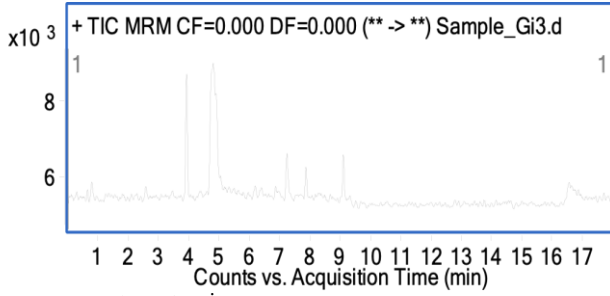
**Table 4.** Honey samples detected neonicotinoid residuals and amounts (mg/kg).

Örnek	Imidacloprid mg/kg	Thiomethoxam mg/kg
Sample-G1	<LOQ	0,016
Sample-G2	0,013	0,018
Sample-G3	0,041	<LOQ
Sample-G5	0,063	<LOQ
Sample-G7	0,012	<LOQ
Sample-G8	<LOQ	0,024
Sample-G10	0,074	<LOQ
Sample-G11	0,057	<LOQ
Sample-G18	0,023	<LOQ
Sample-G20	0,086	<LOQ
Sample-G22	0,012	<LOQ
Sample-G30	0,025	<LOQ

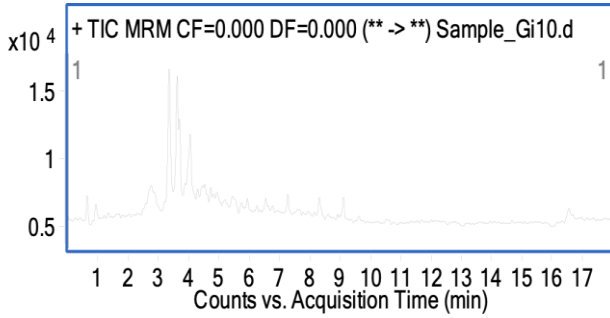
LOQ: 10ppb

İmidacloprid saptanan ballardan, örnek G3 ve G10'a ait Toplam İyon Kromatogramları (TIC) Şekil 2. ve 3.'de, imidacloprid standart madde için Çoklu Reaksiyon

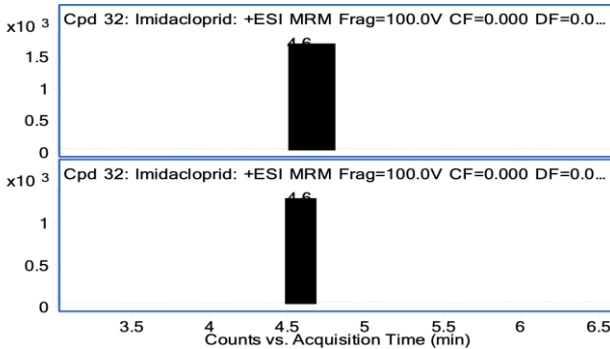
Takibi (MRM) gösteren kromatogram, Şekil 4.'te verilmiştir.



Şekil 2. G3'e ait Toplam İyon Kromatogramı.  
Figure 2. Total ion chromatogram of G3 sample.



Şekil 3. G10'a ait Toplam İyon Kromatogramı.  
Figure 3. Total ion chromatogram of G10 sample.



Şekil 4. Imidacloprid standart madde için MRM kromatogramı.  
Figure 4. MRM chromatogram for standart imidacloprid substance.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Giresun ilinde yetiştiricilik yapan arıcılardan direkt temin edilen 50 adet süzme bal örneğinde asetamiprid, klotianidin, dinotefuran, imidakloprid, nitenpiram, tiakloripid ve tiametoksam varlığı LC-MS/MS kullanılarak araştırılmış; 12 örnekte neonikotinoid grubu insektisitlere rastlanmıştır. Örneklerin 9'unda imidakloprid, 2'sinde tiametoksam saptanırken, 1 örnekte hem imidakloprid hem tiametoksam belirlenmiştir.

Sánchez-Hernández vd. (2016); tiametoksam, klotianidin ve imidakloprid neonikotinoidlerini ve bunların metabolitlerini bal örneklerinde LC/QTOF-MS ile araştırırken, balların toplandığı lokasyonları özellikle ayçiçeği ve mısır tarlaları yakınlarından seçmiş ve sonuçları da buna göre değerlendirmiştir. Buna göre bal

örneklerinde 3 ana neonikotinoide rastlanmadığını bildiren araştırmacılar, ayçiçeği bitkilerinin yanındaki arı kovanlarından toplanan tüm örneklerde tiametoksam metabolitleri TM5 ve TM13 saptarken, mısır bitkilerinin yakınından toplanan bal örneklerinde ise imidakloprid metabolitleri IMI4 ve IMI-15 bulunduğunu bildirmiştir (Sánchez-Hernández vd., 2016). Bu çalışmada benzer olarak neonikotinoid saptanan örneklerin 10'unda imidakloprid saptanması, kontaminasyon kaynağının örneklerin toplandığı bölgede yaygın olarak yapılan mısır yetiştiriciliğine ilişkin olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, tarım arazilerine yakın bölgeler ile uzak alanlarda üretilen ballarda neonikotinoid düzeyinin farklı olabileceğini de göstermektedir. Böylece çalışma, kovanların bulunduğu bölgeler dikkate alınarak yapılacak benzer çalışmalara da zemin hazırlayacaktır. Buna göre, hem örnek sayısı artırılıp hem de örneklerin temin edildikleri bölgeler dikkate alındığında neonikotinoid kontaminasyonuna ilişkin daha detaylı bilgi edinilebileceği düşünülmektedir.

Lu vd. (2016) yaptığı çalışmada ise Massachusetts'de 62 farklı kovandan alınan bal örneklerinde, çalışmamızda araştırılan 8 farklı neonikotinoid varlığı araştırmıştır. Örneklerin, %57'sinin en az bir, %15'inin de iki farklı neonikotinoid içerdiğini bildirmişlerdir. Sonuçlar, çalışmamızdaki örneklere ait kontaminasyon niteliği ile benzerlik gösterirken, kontamine olan örnek miktarı daha fazladır (Lu vd., 2016). Bir başka çalışmada, Sırbistan-Voyvodina'nın 7 bölgesinden, farklı orijinlere ait (ayçiçeği, çiçek, ıhlamur ve akasya) 104 bal örneği toplanmış ve HPLC-DAD metodu ile neonikotinoid kalıntıları araştırılmıştır. Beş çiçek balı örneğinde tiakloprid, 4 ayçiçeği balı örneğinde imidakloprid tespit edildiği bildirilmiştir. Ancak bu örneklerdeki seviyelerin hepsinin maksimum kalıntı limitlerinin (MRL) altındaki konsantrasyonlarda olduğu da vurgulanmıştır (Jovanov vd., 2015). Ayrıca Tanner ve Czerwenka tarafından yapılan çalışmada saptanan neonikotinoidler, çalışma sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir (Tanner&Czerwenka, 2011)

Sonuç olarak; neonikotinoid pestisitler, tarımsal üretim aşamalarında, tohum ıslah çalışmalarında zararlı böcek enfestasyonuna karşı kullanım amacıyla ruhsatlandırılmışlardır. Ancak yapılan çalışmalar, neonikotinoid pestisit grubu tarım ilaçlarının, hiç de masum olmadıklarını, tarımsal ürünlerde zararlı böceklerle karşı korunma amacıyla kullanılırken, diğer yandan bal arıları ve diğer ekolojik canlılar açısından toksik etkilere yol açabileceklerini göstermiştir. Besleyici değeri yüksek, sağlıklı diyetlerin olmazsa olmazı, tedavi amaçlı tüketimi önerilen ballardaki olası neonikotinoid varlığı, halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlikedir. Bal ve arı ürünlerini özellikle çocuk ve yaşlıların sıklıkla tükettiği göz önüne

alındığında neonikotinoid kontaminasyonunun oluşturabileceği sağlık riskleri son derece önem arz etmektedir. Neonikotinoidlerin ürün yüzeyinde kalmayıp ürünün dip kısımlarına da penetre olması nedeniyle Avrupa Birliği ve diğer ülkelerde kullanımına kısıtlama ve yasaklamalar getirilmiştir. İyi tarım uygulaması çerçevesinde arıcılık yapılan alanların seçimi ve AB'ye paralel olarak bu yönde neonikotinoid kullanımına sınır getirilmesi oluşabilecek risklerin önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Neonikotinoidlerin kullanım şekillerini ve canlı organizmalar üzerindeki etkilerini anlamak için artan araştırma çabalarına rağmen, canlılarda görülen riskleri değerlendirmek için dünyadaki neonikotinoid kirliliğinin dağılımına dair küresel veriler yeterli düzeyde değildir. Bu nedenle, başta arılar olmak üzere tarımsal üretimi ve tüm canlıların ömrünü etkileyebilecek farklı inorganik ve organik kirlenici maddeleri göz önünde bulundurarak neonikotinoidleri değerlendirmek için düzenli izleme programlarının yapılması önemlidir.

### TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından SAĞ-BAP-A-250221-57 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmalarımızın gerçekleşmesine imkan sunan Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stangbaher, D. & Schenck, F.J. (2003).** Quick, easy, cheap, effective (QueChERS) method for determining pesticide residue. *Journal of AOAC International*, *86*(2), 412-431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Bonmatin L., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro M., Mitchell E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N. & Tapparo, A. (2015).** Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 35-67. DOI: 10.1007/s11356-014-3332-7
- Chen, M., Tao, L., Mclean, J. & Lu, C. (2014).** Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *Journal of Agricultural Food Chemical*, *62*, 6082-6090. DOI: 10.1021/jf501397m
- Cicero, N., Naccari, C., Cammilleri, G., Giangrosso, G., Cicero, A., Gervasi, T. & Ferrantelli, V. (2017).** Monitoring of neonicotinoid pesticides in beekeeping. *Natural product research*, *31*(11),

1258-1262.

DOI:

[10.1080/14786419.2016.1236101](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1236101)

- Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A. & Perry, M.J. (2017).** Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health: Systematic Review. *Environmental Health Perspective*, *125*(2): 155-162. DOI: 10.1289/EHP515
- Çil, G.İ., Korkmaz, S.D., Ozansoy, G. & Küplülü, Ö. (2020).** Türkiye'deki bal örneklerinde neonikotinoid varlığının LC-MS/Q-TOF Yöntemi ile tespiti. *MAKU J. Health Sci. Ins.*, *8*(1):11-17. DOI: 10.24998/maeusabed.695570
- Decourtye, A. & James, D. (2010).** Insect nicotinic acetylcholine receptors. In: Thany, S. H. (eds) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. 85-95p, Springer, New York.
- Démares, F.J., Pirk, C.W., Nicolson, S.W. & Human, H. (2018).** Neonicotinoids decrease sucrose responsiveness of honeybees at first contact. *Journal of Insect Physiology*, *108*, 25-30. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2018.05.004
- Eurochem Guide. (2014).** The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) (2nd ed.) ISBN978-91-87461-590  
[https://www.eurochem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurochem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) (5.6.2021)
- European Commission. (2002/657/EC).** Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044) <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en> (22.6.2021)
- European Commission. (2014).** Safety of the food chain Chemicals, contaminants, pesticides. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013. [https://www.eurlpesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2013\\_12571.pdf](https://www.eurlpesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf) (8.6.2022)
- European Commission. (2020).** Neonicotinoids. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances/approval\\_renewal/neonicotinoids\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en) (27.02.2020).
- Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T. & Posyniak, A. (2015).** Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem massspectrometry. *Journal of Chromatography*

- B, **990**, 132-140. DOI: [10.1016/j.jchromb.2015.03016](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03016)
- Gibbons, D., Morrissey C. & Mineau, P. (2015)**. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science Pollution Research International*, **22**(1): 103-108. DOI: [10.1007/s11356-014-3180-5](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5)
- Jovanov, P., Guzsvány, V., Lazić, S., Franko, M., Sakač, M., Šarić, L. & 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](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.021)
- Kartal, M.N. (2019)**. Neonicotinoid pesticide applications outcomes; contaminate honey and honey bees. *Turkish Journal of Public Health*, **17**(1):88-91. DOI: [10.20518/tjph.405719](https://doi.org/10.20518/tjph.405719)
- Koc, F., Yigit, Y., Das, Y.K., Gurel, Y., & Yarali, C. (2008)**. Determination of Aldicarb Propoxur Carbofuran Carbaryl and Methiocarb Residues in Honey by HPLC with Post-column Derivatization and Fluorescence. *Journal of Food and Drug Analysis*, **16**(3), 39-45. DOI: [10.38212/2224-6614.2356](https://doi.org/10.38212/2224-6614.2356)
- Lehotay, S.J., Mastovska, K. & Lightfield A.R. (2005)**. Use of Buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, **88** (2), 615-629.
- Lu, C.A., Chang, C.H., Tao, L. & Chen, M. (2016)**. Distributions of neonicotinoid insecticides in the Common wealth of Massachusetts: a temporal and spatial variation analysis for pollen and honey samples. *Environmental Chemistry*, **13**(1), 4-1. DOI: [10.1071/EN15064](https://doi.org/10.1071/EN15064)
- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J. & Morrissey, C.A. (2014)**. Wide spread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PloSone*, **9**(3).
- Mitchell, E.A., Mulhauser, B., Mulot, M., Mutabazi, A., Glauser, G. & Aebi, A. (2017)**. A world wide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, **358**(6359), 109-111.
- PMRA. (2015)**. Pesticide Incident Reporting Database. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/disclaimer-avis-avertissement-eng.php> (Erişim 27.02.2020)
- Proietto Galeano, M., Scordino, M., Sabatino, L., Pantò, V., Morabito, G., Chiappara, E. & Gagliano, G. (2013)**. UHPLC/MS-MS analysis of six neonicotinoids in honey by modified QuEChERS: method development, validation, and uncertainty measurement. *International Journal of Food Science*, **2013**. DOI: [10.1155/2013/863904](https://doi.org/10.1155/2013/863904)
- Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Bernal, J., Neusüß, C., Martín, M.T. & Bernal, J.L. (2014)**. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a new approach analyze neonicotinoid insecticides. *Journal of Chromatography A*, **1359**, 317-324. DOI: [10.1016/j.chroma.2014.07.028](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.028)
- Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Martín, M.T., Nozal, M.J., Higes, M. & Yagüe, J.L.B. (2016)**. Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *Journal of Chromatography A*, **1428**, 220-227. DOI: [10.1016/j.chroma.2015.10.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.066)
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C. & Goulson, D. (2015)**. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(1), 5-24. DOI: [10.1007/s11356-014-3470-y](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y)
- Tanner, G. & Czerwenka, C. (2011)**. LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(23), 12271-12277. DOI: [10.1021/jf202775m](https://doi.org/10.1021/jf202775m)
- Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. (TOB). (2022)**. Imidacloprid, Thiomethoxam ve Thiram Aktif Maddeli Bitki Koruma Ürünleri Hk. (6950658 sayı). <https://bku.tarimorman.gov.tr/Duyuru/DuyuruDetay/85?csrt=3598786223508364038> (13.2.2023)
- Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2005)**. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, **45**, 247-268.
- Zhang, Q., Li, Z., Chang, C.H., Lou, J.L., Zhao, M.R. & Lu, C. (2018)**. Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: a review. *Environmental Pollution*, **236**, 71-81. DOI: [10.1016/j.envpol.2017.12.101](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.101)
- Zhang, Q., Lu, Z., Chang, C., Yu, C. & Wang, X. (2019)**. Dietary risk of neonicotinoid insecticides through fruit and vegetable consumption in school-age children. *Environment International*, **126**, 672-681. DOI: [10.1016/j.envint.2019.02.051](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.051)