



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
VFT-YL-2008-0001**

EGE BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN BALLARDA SÜLFONAMİD KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim Ramazan ULUDAĞ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT**

AYDIN - 2008

ÖNSÖZ

Günümüzde küreselleşme süreci devam ederken ülkeler yeni stratejiler oluşturmakta ve ülke çıkarları adına dünyada konumlarını belirlemektedirler. Bu çerçevede bazı ülkeler etkili olabilecek konumlarda yerlerini sağlamlaştırırken bazı ülkeler de bu süreçte kendilerine yer aramaktadır. Ülkemiz de gelişimini devam ettirerek çıkarlarını koruyacak etkili bir yer arayışını sürdürmektedir. Elbette bu yer arayışında siyasi duruş ve ekonomik güç önemini korumaktadır.

Avrupa Ekonomik Topluluğu adıyla kurulan, süre gelen yıllarda üye sayısının artması ve düzenlemelerle Avrupa Birliği olarak isimlendirilen ülkeler topluluğu da dünyanın gelişiminde ve küreselleşimde önemli yer tutmaktadır. Ülke çıkarlarımızı koruma adına bu ülkeler arasında yer ararken AB ile ilişkilerimiz devam etmektedir. Toplulukla olan ilişkilerimizde düzenlemeleri ülkemize uydurmaya çalışırken birtakım siyasi gelişmeleri de izlemekteyiz. Hukuki arenada söz sahibi olmak için düzenlemeleri takip etmek ve ülkemizde uygular hale getirmek mutlaktır. Ülkemizin AB'ye giriş talebinde bulunurken bu birliğe girilmemesi durumunda dahi düzenlemelerin ülkemize yerleştirilmesinin kazanç olduğu uzmanların ortak görüşüdür. Bu bağlamda düzenlemelerin % 30'unun tarımla ilgili, bunun da büyük bölümünün veteriner müktesebatından oluştuğu bilinmektedir. İthalat ve ihracat dengesinin ekonominin bel kemiği olduğu düşünüldüğünde her ihracatın önemli yer tuttuğu açıktır. Tarım içinde yüksek ihracat potansiyeli olan hayvansal gıdalardan balda kalıntı sorunlarıyla ihracat miktarı düşen ürünlerimizden olduğu bilinmektedir. AB'nin veteriner halk sağlığı ile ilgili olarak yaptığı düzenlemelerle hayvansal gıdalarda kalıntıların izlenmeye başlanması ihracatın düşüşünde önemli yer almıştır. AB'nin özellikle kalıntı izleme çalışmalarına başladıktan sonra Avrupa ülkelerinde ortalama yaşama ömrünün arttığı konunun önemine dikkatleri çekmektedir. Ülkemizde ise konunun sağlık açısından önemi kamuoyu tarafından tam olarak bilinmemektedir. Hâlihazırdaki veteriner teşkilatlanma yapısının Tarım Bakanlığı çatısı altında etkili rol alabilecek bir yer teşkil etmemesinden ekonomik önem halk sağlığından daha önde yer aldığı görülmektedir. AB uyum çerçevesinde bu tür aksaklıkların giderilmesi umut edilmektedir.

Hayvansal gıdalar içerisinde önemli yer tutan balın sağlık kaynağı olarak eski tarihten günümüze kadar kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde ise alternatif tıpta baldan ve ürünlerinden faydalanılarak kurulan apiterapi merkezleri popüler olmaya başlamıştır. Ancak bu değerli gıda maddesi çeşitli kimyasallarla kirlenerek halk sağlığı açısından tehlike oluşturması oldukça önemlidir.

Bu araştırma VTF-0711 kodlu proje olarak Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1. 1. Literatür Bilgisi.....	4
1. 1. 1 Dünyada Arıcılık	4
1. 1. 2. Türkiye’de Arıcılık.....	4
1. 1. 3. Arıcılıkta İlaç Kullanımı	6
1. 1. 4 Balda İlaç Kalıntısı ve Yasal Düzenlemeler.....	13
1. 1. 5 Sülfonamidler ve Arıcılıkta Yasadışı Kullanımı.....	17
1. 1. 6 Sülfonamid Kalıntılarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2. 1. Gereç.....	23
2. 1. 1. Kullanılan Cihaz Ve Laboratuvar Malzemeleri	25
2. 1. 1. 1. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) Cihaz Bileşenleri.....	25
2. 1. 1. 2. Laboratuvar Araçları.....	25
2. 1. 1. 3. Kimyasallar.....	25
2. 1. 1. 4. Cam Malzemeler.....	26
2. 1. 1. 5. Solüsyonlar	26
2. 2. Yöntem.....	28
2. 2. 1. Kromatografik Koşullar.....	28
2. 2. 2. Sülfonamid Standartlarının Cihaza Tanıtılması.....	29
2. 2. 3. Örneklerin ve Geri Alım Çalışması İçin Yükleme Yapılacak Bal Örneklerinin Hazırlanması	29
2. 2. 4. Özütleme.....	30
2. 2. 5. Metodun Geçerlilik ve Kesinliği.....	30

2. 2. 5. 1. Geri Alım Hesaplaması.....	30
2. 2. 5. 2. Gün İçi Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik.....	31
2. 2. 5. 3. Günler Arası Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik.....	31
2. 2. 5. 4. Tespit Limiti ve Değerlendirme Limitinin Hesaplanması.....	31
3. BULGULAR.....	32
3. 1. Pik Çıkış Süreleri.....	32
3. 2. Standart Eğri.....	33
3. 3. Kromatogramlar.....	34
3. 4. Geri Alım Oranları.....	36
3. 5. Gün İçi Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik.....	37
3. 6. Günler Arası Tekrarlanabilirlik ve Kesinlik.....	38
3. 7. Tespit ve Değerlendirme Limitleri.....	39
3. 8. Örneklerin Analiz Sonuçları.....	39
4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ	54
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66
TEŞEKKÜR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

\$	Dolar
µl	Mikrolitre
AB	Avrupa Birliği
AKS	Azami kalıntı seviyesi
AYÇ	Amerikan yavru çürüklüğü
BSE	Sığırların süngerimsi beyin hastalığı (Bovine spongiform encephalopathy)
CVMP	Veteriner İlaç Ürünleri Komitesi
dk	Dakika
ELISA	Enzim Linkid Immune Sorbent Assay
EMEA	Avrupa Birliği İlaç Değerlendirme ve Danışma Merkezi
g	Gram
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer)
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KGA	Kabul edilebilir günlük alım miktarı
LD ₅₀	Letal doz % 50
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
NOEL	Etkisiz miktar (No Observed Effect Level)
PCB	Poliklorlu bifeniller
ppm	Milyonda bir (Parts per milion)
RSD	Relatif standart sapma
YTL	Yeni Türk Lirası

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1.1.1. Dünyada bal üretimi.....	4
Çizelge 1.1.1.2. Dünyada kovan başına bal üretimi.....	4
Çizelge 1.1.2.1. Türkiye’de yıllara göre kovan sayısı ve bal üretimi.....	5
Çizelge 1.1.2.2. Türkiye’nin bal ihracat değerleri.....	5
Çizelge 1.1.3.1. Arı akarı mücadelesinde kullanılan müstahzarlar.....	7
Çizelge 1.1.3.2. Nösematisis müstahzarları.....	7
Çizelge 1.1.3.3. Yavru çürüklüğü’ne karşı kullanılan antibakteriyellerin uygulama protokolleri.....	9
Çizelge 1.1.3.4. Varroa (V), Trake Akarı (T) ve Amerikan Yavru Çürüklüğü’nün (AYÇ) kontrolünde esansiyel yağlar	11
Çizelge 1.1.4.1. EMEA tarafından değerlendirilen arı hastalıklarında kullanılan kimyasal maddeler.....	14
Çizelge 2.1.1. Ege Bölgesi 2006 arıcılık verileri ve toplanan numune sayısı.....	23
Çizelge 2.2.1.1. Mobil faz değişim programı.....	28
Çizelge 3.1.1. Pik çıkış süreleri.....	32
Çizelge 3.4.1. Geri alım oranları.....	36
Çizelge 3.5.1. Gün içi tekrarlanabilirlik ve kesinlik.....	37
Çizelge 3.6.1. Günler arası tekrarlanabilirlik ve kesinlik.....	38
Çizelge 3.7.1. Tespit ve değerlendirme limitleri.....	39
Çizelge 3.8.1. Muğla ili örneklerinin analiz sonuçları.....	39
Çizelge 3.8.2. Uşak ili örneğinin analiz sonucu.....	41
Çizelge 3.8.3. İzmir ili örneklerinin analiz sonuçları.....	41
Çizelge 3.8.4. Manisa ili örneklerinin analiz sonuçları.....	42

Çizelge 3.8.5.	Kütahya ili örneklerinin analiz sonuçları.....	42
Çizelge 3.8.6	Aydın ili örneklerinin analiz sonuçları.....	42
Çizelge 3.8.7.	Denizli ili örneklerinin analiz sonuçları.....	43
Çizelge 3.8.8.	Ege bölgesi pozitif örneklerinin ölçülen miktarları.....	47

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.5.1.	Bazı sülfonamidlerin kimyasal yapıları.....	18
Şekil 2.1.1.	Ege Bölgesi bal üretim miktarlarının oransal dağılımı.....	24
Şekil 3.2.1.	Kalıntı analizi yapılan sülfonamid standartlarının kalibrasyon eğrileri.....	33
Şekil 3.3.1.	Mobil faz kromatogramı.....	34
Şekil 3.3.2.	Boş bal kromatogramı.....	34
Şekil 3.3.3.	5 ng/g sülfonamid standardı kromatogramı.....	34
Şekil 3.3.4.	15 ng/ml yüklü bal örneğinin kromatogramı.....	35
Şekil 3.3.5.	Sülfametazin pozitif bal örneği kromatogramı.....	35
Şekil 3.3.6.	Sülfamerazin pozitif bal örneği kromatogramı.....	35
Şekil 3.3.7.	Sülfametoksazol pozitif bal örneği kromatogramı.....	35
Şekil 3.8.1.	Muğla ili pozitif örnek oranı.....	43
Şekil 3.8.2.	Muğla ili örneklerindeki kalıntıların ölçülen miktarlarının dağılımı.....	44
Şekil 3.8.3.	Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illeri pozitif örnek oranı.....	44
Şekil 3.8.4.	Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illeri pozitif örnek sayısı.....	45
Şekil 3.8.5.	Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak örneklerinin kalıntılarının ölçülen miktarlarının dağılımı.....	45
Şekil 3.8.6.	Ege Bölgesi pozitif örnek oranı.....	46
Şekil 3.8.7.	Ege bölgesi örneklerindeki kalıntıların ölçülen miktarlarının dağılımı.....	46

Şekil.3.8.8.	Sülfonamid kalıntısına sebep olan bileşiklerin oransal dağılımı	47
Şekil 3.8.9.	Pozitif bileşiklerin ölçülen miktarlarının grafiksel dağılımı.....	48

1. GİRİŞ

Bitkilerde sağladıkları tozlaşma ile bitkisel üretimde ve doğal dengenin korunmasında hayati rol oynayan bal arıları, insan sağlığı ve beslenmesi yönünden çok önemli olan balı üreterek insanoğluna büyük bir hizmet sunmaktadır. Bal; “Bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı (*Apis mellifera*) tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürün” olarak tanımlanmıştır. Bal, değerli bir besin kaynağı olmasının yanında bir ya da birden fazla hastalığın önlenmesi veya iyileştirilmesi amacıyla alternatif tedavi metodu olarak kullanılmakta olup buna da apiterapi adı verilmektedir. Yapılan araştırmalar özellikle Uzakdoğu ülkelerinde başlayan ve tüm dünyada gelişen arı ürünleri ile tedavi yöntemlerinin hızla yaygınlaştığını göstermektedir. Hatta başta Japonya, Doğu Asya ülkeleri, Amerika, Kanada gibi ülkelerde apiterapi merkezleri kurulmuştur. Bal, tedavi amaçlı yüzyıllarca kullanılmış olup günümüzde de antibakteriyel ve tedavi edici özellikleri ile ilgili bilimsel çalışmalara devam edilmekte, yara ve yanıkların tedavisinde de kullanıldığı belirtilmektedir (Efem ve Ark. 1992, Öztürk 2002, Çeliker 2002, Anonim 2005a, Okeniyi ve Ark. 2005, Eddy ve Gideonsen 2005, Van Der Weyden 2005, Anonim 2007a).

Kalıntı; çevreden bulaşma yoluyla ya da ilaç uygulanmış hayvanlardan elde edilen gıdalarda bulunan farmakolojik etkiye sahip etkin maddenin kendisi, parçalanma ürünleri veya metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde veteriner ilaçlarının kullanılma zorunluluklarıyla birlikte bilinçsizce uygulanmaları, aynı zamanda besinlerin veteriner ilaç kalıntıları ile kirlenme riskini arttırmış, dolayısı ile tüketicilerde tedirginlik oluşturan; hafif bir alerjiden, ölüme kadar değişen şiddetlerde zehirlenmelere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere, üreme bozukluklarına, teratojenik, mutajenik,

karsinojenik etkilere ve dirençli suşların ortaya çıkması ile ilaçların sağaltıcı etkilerinin azalması gibi olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir (Paulson ve ark. 1992, Threlfall ve ark. 1994, Thomson And Sporns 1995, Coffman ve Beran 1999, Kaya ve ark 2002a, Öztürk 2002).

Bal endüstrisi, ülkemizin gıda ihtiyacını karşılayan ve ihracaat potansiyeli olan bir sektörümüzdür. Ülkemizde yıllık bal üretimi 65-70 bin ton civarındadır. Özellikle Ege Bölgesinde üretilen yıllık 10 bin ton dolayındaki çam balının tümü ihracat potansiyeline sahipken, mevcut ihracatımızın son yıllarda 5–10 bin tonlara kadar inmesi dikkat çekmektedir. Balın kilosu 10 YTL olduğu göz önüne alındığında 750 Milyon YTL civarında küçümsenmeyecek bir rakam ile ülke ekonomisinde yer alabileceği göz önünde tutulmalıdır. Genel olarak tüm çiftçilerimizde olduğu gibi arıcılarımızda da yanlış ve fazla ilaç kullanma eğilimi vardır. İhracatımızda en büyük engellerden birinin kalıntı olduğu bilinmektedir ve Avrupa Birliği laboratuvarlarında yapılan bir istatistikte Türkiye’den ithal edilen ballarda antibakteriyel kalıntıların sıklıkla bulunduğu bildirilmektedir (Öztürk 2002, Çeliker 2002, Anonim 2006a, Anonim 2006b).

17 Aralık 2005 tarih ve 26026 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi 2000/49 sayılı Bal Tebliği’nde balın taşınması gereken özellikleri Avrupa Birliği uyum kapsamında yeniden belirlenmiştir. Bu tebliğe göre ballarda antibakteriyellerin hiç bulunmaması gerekmektedir. Ülkemizde arılarda fumagillin istisnası dışında ruhsatlı antibakteriyel müstehzarı bulunmamaktadır. Buna rağmen antibakteriyel kalıntıların tespit edilmesi kaçak ve ruhsatsız ilaç kullanıma dikkatleri çekerek konuya ilgileri arttırmaktadır.

Başta bal olmak üzere tüm arı ürünlerinin değerli ve yararlı olabilmeleri için bu ürünlerin doğal olmaları ve hiçbir yabancı madde içermemeleri gerekmektedir (Öztürk 2002, Çeliker 2002). Bilinçsiz ve gereksiz antibakteriyel ve diğer kimyasalların uygulamaları balın kalitesine ve arıcının bütçesine zarar verdiği gibi arı larvalarının sağlığını da olumsuz etkilemektedir. Kanada, ABD ve Arjantin’de yapılan çalışmalarda, bazı bakterilerin, arıcılıkta en çok kullanılan antibakteriyel grubu oksitetrasikline karşı bağışıklık kazandıkları belirlenmiştir (Spivak ve Reuter 2001). Ayrıca arı parazitleri için kullanılan pestisitlere de direnç geliştiği İtalya ve ABD’de rapor edilmiştir. Bununla birlikte bazı antibakteriyellerin yüksek dozlarının arı yavrularını zehirlediği ve yine bazı antibakteriyel gruplarının balda uzun süre kalıntı oluşturduğu belirlenmiştir. Görüldüğü üzere ilaçların yanlış ve bilinçsiz kullanımları bir yana, bilinçli ve doğru şekilde kullanılmalarının da bile

kalıntıların yanında birçok problemler ortaya çıkmaktadır (Milani 1995, 1999, Bogdanov ve ark. 1998, Alippi ve ark. 1999, Kochansky ve ark. 1999, Elzen ve ark. 2000, Kochansky ve ark. 2001, Spreafico ve ark., 2001, Öztürk 2002.).

Arıcıların yanlış uygulamaları sonucunda kullanılan kimyasal maddeler bal içinde kalıntılar bırakmaktadır. Balmumuna naftalin katılması, mazottan ilaç yapılması, yanlış zaman ve miktarda ilaç kullanımı gibi uygulamalar hem insan sağlığını tehlikeye düşürmekte, hem de ihraç sorunları dolayısı ile ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Genel olarak tüm çiftçilerimizde olduğu gibi arıcılarımızda da fazla ilaç kullanma eğilimi vardır. Bu uygulama AB'nin 1999 yılında ülkemizden bal ürünleri ithalatını durdurmayı düşünmesi gibi negatif sonuçlara neden olmaktadır (Çeliker, 2002).

Hâlihazırda AB'nin bal ithalatını sona erdirme ihtimali güncelliğini korumaktadır. Bu nedenle arıcılık faaliyetlerinin yeniden gözden geçirilmesi, denetlenmesi ve arı yetiştiricilerinin eğitilmesi için yapılan çalışmalara daha çok önem verilmesi gerekmektedir.

İhracatımızı ve halk sağlığını olumsuz olarak etkileyen ballardaki kalıntı sorunlarına dikkati çekmek maksadıyla hazırlanan bu çalışma arılarda bilinçsiz ilaç kullanımının oldukça yaygın olduğu bilinen “sülfonamid grubu antibakteriyellerin” bal örneklerinde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazında, florasan dedektörde, kolon sonrası türevlendirme ile kalıntı analizleri yapılarak;

1. Gıda güvenliğine katkıda bulunulması,
2. Halk sağlığı açısından sülfonamid kalıntılarıyla ilgili mevcut duruma dikkatler çekilerek, sülfonamid kullanımına karşı özellikle halk sağlığı açısından oluşabilecek olumsuzluklara karşı gerekli önlemlerin alınmasında yardımcı olunması,
3. Bal endüstrisinin bu konuda yaşayabileceği olumsuzlukların çözümüne yardımcı olunması için veri elde etmek ve ihracat için sektörümüzün hazırlanmasında katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

1.1. Literatür bilgisi

1.1.1. Dünyada arıcılık

Arıcılık tüm dünyada yapılan tarımsal faaliyettir. Bugün dünyada 56 milyon dolayında arı kovanı bulunduğu tahmin edilmektedir ve bu kovanlardan 1,2 milyon ton dolayında bal üretilmektedir. Dünya’da en çok kovana sahip olan ülke Çin olup 267 bin ton bal üretmektedir (Çizelge 1.1.1.1.).

Çizelge 1.1.1.1. Dünyada bal üretimi (Anonim, 2005b).

Ülkeler	Çin	Arjantin	ABD	Türkiye	Ukrayna	Hindistan	Kanada	İran
Bal Üretimi (Ton)	267.830	85.000	80.000	73.929	52.000	52.000	35.000	29.000

Bal üreticisi diğer birkaç önemli ülkeyle kıyaslandığında kovan başına bal üretiminin Türkiye’de düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 1.1.1.2.).

Çizelge 1.1.1.2 Dünyada kovan başına bal üretimi (Anonim, 2005b).

Ülkeler	ABD	Çin	Arjantin	Meksika	Kanada	Avustralya	Macaristan	Türkiye
Üretim (Kg)	50	33	40	27	64	55	40	16

Dünyada en çok bal ithal eden ülkeler; Almanya, ABD, Japonya, İngiltere, İtalya, İsviçre, Fransa, Avusturya ve diğer Avrupa ülkeleridir. Bunlar arasında Almanya’nın sadece ithalatı Türkiye’nin üretiminden fazladır (Anonim, 2005b).

1.1.2. Türkiye’de arıcılık

Arıcılık ülkemizde 40 bin aile tarafından geçim kaynağı olarak yapılmaktadır. Bu anlamda önemli bir istihdam alanı olma özelliği de vardır. Ülkemizde arıcılık konusundaki devlet politikaları istenilen düzeyde değildir. Ancak arıcılığa gönül verenlerin çabalarıyla gelişme olmaktadır. Türkiye 4–5 milyon civarındaki kovan varlığı ve 60–70 bin ton yıllık üretim miktarı ile dünyada 3–4. sıralarda yer alan önemli bir ülkedir (Çizelge 1.1.2.1.).

Çizelge 1.1.2.1. Türkiye’de yıllara göre kovan sayısı ve bal üretimi (Anonim 2005b).

Yıllar	Kovan Sayısı	Bal Üretim Miktarı (Ton)
2000	4.267.123	61.091
2001	4.115.353	60.190
2002	4.161.000	74.555
2003	4.288.853	69.540
2004	5.000.000	73.929

Türkiye dünya bal ticaretinde % 1.87’lik pay ile 10.sırada yer almaktadır. Türkiye’nin ihracat miktarı ise üretime kıyasla oldukça düşüktür (Çizelge 1.1.2.2.).

Çizelge 1.1.2.2.Türkiye’nin bal ihracat değerleri (Anonim, 2005b).

Yıllar	İhracat (1000 ton)	İhracat Değeri (1000 \$)
2000	3.515	5.889
2001	4.328	6.800
2002	15.294	30.687
2003	14.776	36.421
2004	5.686	16.329

Türkiye arı kolonisi sayısı bakımından Çin’in ardından 2. sıradadır. Bu da dünya koloni varlığının % 8’ine denk gelmektedir. Koloni başına verimlilikteyse Türkiye 10. sıralarda yer almaktadır.

Tozlaşma yoluyla arıcılığın sağladığı katkı göz önüne alınır ise bu sayede elde edilen ürünlerin gelirlerinin en azından bir kısmının arıcılık sektörüne dahil edilmesi anlamlı olacaktır (Çeliker, 2002).

Çiçeklerde rüzgar ve böcekler aracılığıyla dölleme olmaktadır. Pek çok meyve ve sebze böceklerle döllendir. Arılar da nektar ve polen toplamak için çiçekleri dolaşırken bitkilerin döllemesini sağlarlar. Bu nedenle başta turunçgillerde olmak üzere pek çok meyve bahçesinde yeterli döllemeyi sağlamak için arı kovanları bulundurulur. Benzer şekilde sebze bahçelerinde ve seralarda da arı kovanları bulundurulması önerilmektedir. Sebze bahçelerinde arıların tozlayıcı olarak kullanılması ile ilgili deneylerde baklanın dane

veriminin %20–70, kabakta bitki başına meyve ağırlığının %25 arttığı bildirilmiştir. Arıcılığın dölleme yoluyla ekonomiye sağladığı katkının en az arı ürünleri yoluyla sağlanan kadar olduğu düşünülmektedir (Çeliker, 2002).

Balın insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olmasının yanı sıra ilaç ve kozmetik sanayinde de baldan faydalanılmaktadır (Öztürk, 2002).

1.1.3. Arıcılıkta ilaç kullanımı

Hayvanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek ve biyolojik fonksiyonlarını istenen yönde değiştirmek amacıyla kullanılan kimyasal ve biyolojik kökenli maddeler veteriner ilaçları olarak ifade edilmektedir.

Arıcılıkta ilaç; bal arılarının hastalıklardan korunması, tedavisi direncin kuvvetlendirilmesi, fizyolojik dengenin sağlanması, strese bağlı olumsuzlukların engellenmesi, üretim hatalarının giderilmesi ve verimin artırılması amacıyla kullanılmaktadır.

Arıcılıkta günümüze kadar kullanılan ilaç ve benzeri maddeler, antibakteriyeller, parazit ilaçları, mantar ilaçları, vitaminler ve parafinler başı çekmektedir. Bal ve diğer tüm arı ürünlerinin değerli ve yararlı olabilmeleri, olabildiğince doğal olması ve herhangi bir madde içermemesine bağlıdır (Öztürk, 2001). Bu sebeple bu ilaçların tümünün belirli koşullar altında kullanıldığında arıcılığa destek olacağı, aksi takdirde tüketime sunulmasında bir dizi problemlere yol olacağı düşünülmektedir.

2005 yılında arı sağlığında kullanılmasına izin verilmiş ve prospektüsleri onaylanmış veteriner tıbbi müstahzarlar listesi Çizelge 1.1.3.1, 1.1.3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1.3.1. Arı akarı mücadelesinde (varroatosıs) kullanılan müstahzarlar (Anonim, 2005c).

Müstahzarın Ticari Adı	Farmasotik şekli	Etkin madde	Ruhsat sahibi
İMPAMİT	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	İMPA
PLUSMAT	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	İMPA
RULAMİT-VA	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	ARI KİMYA
VARROSET	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	ARI FARMA
VAMİTRAT-VA	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	ARI KİMYA
VARROASON	Arı tütsü kâğıdı	Amitraz	İLTERİŞ
PERİZİN %3,2	Çözelti	Asuntol	BAYER
FORMİSET	Kovan içi şerit	Formik asit	ARIFARMA
BAYVAROL	Kovan içi şerit	Flumethrin	BAYER
TYMOVAR	Kovan içi sünger	Timol	VERİM

Çizelge 1.1.3.2 Nosematosis Müstahzarları (*Nosema apis* için) (Anonim 2005c).

Müs. Ticari Adı	Farmasotik şekli	Etkin madde	Ruhsat sahibi
FUMİDİL-B	Oral toz	Fumagillin	DOĞU
FUMOSTAT	Oral toz	Fumagillin	VETAŞ

En önemli arı hastalıkları Varroa biti enfestasyonu, bakteriyel yavru çürüklükleri, kireç çürüklüğü (chalkbrood) ve arı felci gibi hastalıklardır (Williams, 2000). İlaçlar bu hastalıkların sağaltımında ya da korunmasında kullanılmaktadır.

Arıcılar Varroanın vereceği zarardan kaçındıkları için bütün arı kolonilerini düzenli olarak en azından yılda 1–2 kez gözden geçirip ilaç uygularlar. Bu yüzden arıcılıkta hastalığın ilaçla kontrolü alışkanlık haline gelmiştir (Koeniger ve Fuchs, 1988). Hastalığın sağaltımında akarları öldürücü (akarisid) özelliği olan pestisitler kullanılır. İnsektisit kullanımında dikkat edilecek en önemli nokta uygulama zamanıdır. Türkiye şartları dikkate alındığında ilaçlamanın en iyi zamanı, arı ailesinde yavru faaliyetlerinin en az olduğu döneme rastlayan ilkbaharın erken ayları ve sonbaharın geç aylarıdır. Ayrıca, varroa akarları, arı larva veya pupaları ile petek gözlerinde gelişmelerini tamamlarken uygulama gerekiyorsa, ilacın etkili olabilmesi için petek gözlerine geçebilecek uygun ilaç seçilmesi gerekmektedir. İşçi arıların soğuktan korunmak için oluşturdukları kış salkımının bozulma ve ana arının ölme riski taşınması nedeniyle kışın; ilaçların bala geçip kalıntı

oluşturma tehlikesi nedeniyle de yazın ilaç uygulaması sakıncalıdır (Doğanay, 1993, Mutinelli ve Bagio, 2004, Daş, 2004.).

Varroa hastalığının sağaltımında koumafos, malatyon, fluvalinat, flumetrin gibi insektisidler kullanılabilir. Kullanılan insektisitlerin belirlenen AKS (Azami Kalıntı Seviyesi)'leri çeşitlilik göstermektedir (Adıbeş, 1993, Spreafico ve ark., 1993, Sokol, 1996, Londzin ve Sledinski, 1996, Goodwin ve Van Eaton, 1999, Kaya ve ark. 2002a, Piro ve Mutinelli 2003, Mutinelli ve Bagio 2004).

Nosemaiasiste ise fumagillin nosemaların vegetatif şekillerine DNA replikasyonunu inhibe ederek etki gösterir. İlacın kullanımı ve sakıncalarıyla ilgili çeşitli bilgiler verilmiştir (İnal ve Güçlü, 1998, Chioveanu ve ark., 2004, Mutinelli ve Bagio, 2004).

Trake Akarı'nın kontrolünde yaygın olarak nitrobenzen, petrol ve safrol yağı içeren terapötik formülasyonun kasım ya da şubatta kovanın inaktive olduğu dönemde yavruların üstüne tütsü edilmekte iken; günümüzde, metil salisilat ya da wintergreen yağı ile yapılan fumigasyonu güvenli olduğu belirtilmektedir. Seçici akarisitlerden klorbenzilat ve bromopropylate, geri alım zamanından sonra dahi balmumunda birikmeye neden olabilmektedirler. Mentolün, Birleşik Devletler'de kışın bal arısı kolonilerinde kullanıldığı bildirilmektedir. Hastalığın kontrolünde diğer akarisit ilaçlar ve esansiyel yağlar da kullanılmaktadır (İnal ve Güçlü,1998, Kevan ve ark., 1999, Anonim, 2005d, Williams, 2000, Anonim, 2005e).

Amerikan Yavru Çürüklüğü için Alippi ve ark. (1999), enfekte arılarda, oksitetrasiklin, tilosin ve eritromisin karşılaştırmalı olarak etkinlikleri ve toksisitelerini çalışmışlardır. Amerikanın bazı bölgelerinde oksitetrasiklinin yavrularda kayıba neden olduğu, klortetrasiklin de benzer ölümlere neden olduğu ve oral uygulamadan sonra larvalarda büyümenin yavaşladığı bildirilmektedir (Peng ve ark., 1996). Laboratuvar çalışmalarında penisilin ve makrolit grubu antibakteriyellerin tetrasiklinden daha etkili olduğu görülmüştür. Makrolitlerden tilosinin oldukça etkili olduğu belirtilmektedir (Peng ve ark., 1996). Kochansky ve ark. (2001), oksitetrasikline duyarlı ve dirençli *Paenibacillus* larvae'ya karşı alternatif olarak 27 farklı antibakteriyel denemesinde, eritromisin, linkomisin, monensin, ve tilosinin oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Feldlaufer ve ark. (2001), linkomisin hidroklorid antibiyotığının toksisite testinde farklı dozlardaki dokuz uygulama sonucunda yetişkin ve larva grupları arasındaki ölümlerde herhangi bir farklılığa rastlamamışlardır. Bu antibiyotığın 3 kez uygulandıktan 45 gün sonra hastalık

belirtilerinin tamamen yok olduğunu bildirmişlerdir. Pettis ve ark., (2005), tilosin ve linkomisin, üç haftalık kullanımında hastalığın kontrolünde başarılı olduğunu saptamışlardır. Çeşitli antibakteriyeller Amerikan yavru çürüğü ve Avrupa yavru çürüğü etkenlerinin sporlarını inaktive ederek bu hastalıkların kontrolü ve önlenmesinde kullanılmaktadır (Çizelge 1.1.3.3), (Mutinelli, 2003). Avrupa Yavru çürüklüğü'nde arıların temizleme davranışları hastalığın atlatılmasında etkili olabilmektedir (Spivak, 1996).

Çizelge 1.1.3.3. Yavru çürüklüğü'ne karşı kullanılan antibakteriyellerin uygulama protokolü (Mutinelli, 2003).

Aktif madde/Ticari adı	Tedavi zamanı	Tedavi metodu	Geri çekme zamanı
Oksitetrasiklin HCL (Teramisin-25, TM-25, TSP=Teramisin Çözünebilir Toz)	Erken İlkbahar	Toz şekere 200 mg	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Oksitetrasiklin HCL (TM, Oxytet-25-s)	İlkbahar /Sonbahar	1 kısım TM ile 5 kısım toz şekeri karıştır 5-10 gün 1 –3 tablet interval olarak besle	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Oksitetrasiklin HCL TM-25	Erken İlkbahar	OTC dozu: 200 - 1240 mg/pasta; 700 den 1000 mg/pasta / OTC konsantrasyonu: 1 mg/g dan 5.9 mg/g'a.	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Streptomisin sülfat ya da dihidrostreptomisin sülfat	İlkbahar	2.1'lik şurubun (2 oz./100 gals) her galonuna (3,8 l) / 0.6 g (600 mg)'lık bir yoğunlukta sıvı olarak 2 haftalık periyotta 3 uygulama	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Tilosin	İlkbahar / Sonbahar	Toz şekere 100-200 mg karıştır (800 mg/7 g şeker'e kadar)	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Oksitetrasiklin HCL (Teramisin-25)	Erken İlkbahar	Toz olarak 8 kısım Toz şekere 1 kısım. TM 25 karıştır. 4-5 gün boyunca 4-5 tablet ile interval olarak beslenir	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce
Sodyum sülfatiazol	İlkbahar	Sıvı olarak 2:1'lik şeker şurubun (her galona 1 g sodyum sülfathiazole 4-5 gün boyunca 3 kere uygulanır.	Bal arısı uçuşundan en az dört hafta önce

Kireç hastalığının kontrolünde çok sayıda kimyasal kullanılır. Sporların hastalığa ısrarı tedaviyi zorlaştırır. İngiltere’de timol jel hastalığın kontrolünde kullanılmaktadır (Williams 2000).

Aydın (2001), ilaç niteliğindeki maddelerin kullanım ölçütlerine değinirken ruhsatlandırmanın ve veteriner hekim kontrolünde reçete karşılığında uygulamanın önemine değinmektedir. Ayrıca toksisiteye, verim düşüşüne neden olmaması ve kovan dengesini olumsuz etkilememesi gerektiği bildirilmektedir.

Bilinçli ve güvenli ilaç kullanımındaki ana hedefler Şanlı (1998), tarafından aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır:

1. Kalite; ilaç niteliğinde maddeler ruhsatlı olmalı, etken madde uygun taşıyıcı ile saklama koşullarını içermeli ve prospektüs saha çalışmaları için uygun olmalıdır.

2. Etkinlik; ilaç hedeflediği yararı sağlayabilmeli etkinlik % 90’nın altına düşmemeli, kullanım dozunda direnç görülmemelidir.

3. Güvenlik; ilaç niteliğindeki maddeler, insan ve arı sağlığını tehdit etmemeli, sağaltım dozu ile toksik doz (LD₅₀) arasındaki tolerans yüksek olmalıdır.

4. Ekonomi; ucuz olmalı, kullanımı ve temini kolay olmalıdır.

Avrupa’da tüm antibakteriyeller (Fumagillin bazı ülkelerde kullanımdadır), veteriner (diğer evcil hayvanlar için üretilen), tıp ve zirai ilaçlar, klorlu hidrokarbonlar, hasat zamanı yapılan ruhsatlı arı ilaçları, özellikle parafin ve naftalin kullanımının sakıncalı olduğu deklare edilmiştir (Aydın ve Girişgin 2003, Mutinelli ve Rademacher 2003).

Avrupa Birliği tarafından son yıllarda yapılan çalışmalarda da görüleceği üzere özellikle organik asitler ve esansiyel yağların kullanılması önerilmekte olup; diğer yandan sentetik pretroidler, kumafos, amitrazın kullanımı olumlu karşılanmaktadır (Aydın ve Girişgin 2003, Mutinelli ve Rademacher 2003, Mutinelli Ve Baggio 2004). Arıcılıkta kullanılan ilaçlar özellikle varroasis olmak üzere Ağustos ve Eylül periyodunda ve geç sonbaharda uygulanmalıdır. Özellikle kontrol önlemleri alınmalı, erken ilkbaharda ilaç kullanımında organik asitler ve esansiyel yağlar tercih edilmelidir (Mutinelli Ve Baggio 2004).

Arı hastalıklarında kullanılan kimyasallara karşı hastalık etkenlerinin direnç kazanması, balda kalıntı problemlerine yol açması nedeni ile arı hastalıklarında alternatif

olarak organik asitler ve esansiyel yağların kullanımı gündeme gelmiştir. Son yıllarda bu konu üzerinde araştırmalara yoğunluk verilmiştir.

Kevan ve ark. (1999), arı bitlerinin kontrolünde esansiyel yağların, trake akarı için mentol kristallerinin kullanıldığını belirtmişlerdir. Varroa kontrolü için ise çoğunlukla timol, ökaliptüs (sıtma ağacı), ve Güney Amerika'da yetişen bitki wintergreenin kullanıldığını ifade etmişlerdir. Çizelge 1.1.3.4.'te Varroa (V), Trake Akarı (T) ve Amerikan Yavru Çürüklüğü'nün (AYÇ) kontrolü için bir projede kullanılan esansiyel yağlar sunulmuştur (Anonim, 2007b).

Çizelge 1.1.3.4. Varroa (V), Trake Akarı (T) ve Amerikan Yavru Çürüklüğü'nün (AYÇ) kontrolünde esansiyel yağlar (Anonim, 2007b).

Bitki	Hastalıklar			Bitki	Hastalıklar		
Limon otu yağı	V	T	AYÇ	Kafur yağı	V		AYÇ
Kekik yağı (timol)	V	T	AYÇ	Sarımsak	V		
Biberiye yağı	V		AYÇ	Neem	V	T	
Keklikotu yağı	V		AYÇ	Tütün	V		
Rezene yağı	V			Tarçın	V		AYÇ
Adaçayı yağı	V			Küçük Hindistan cevizi	V		
Sarımsak	V			Karvakrol		T	
Biber	V			Terpin		T	
Limon yağı	V	T	AYÇ	Lavanta yağı			AYÇ
Ökalüptüs yağı	V		AYÇ	Kimyon yağı			AYÇ
Mentol	V	T	AYÇ	Vintergreen yağı	V		

Floris ve ark. (1996), 6 farklı güçlü *Bacillus larvae* etkenine karşı 21 tane esansiyel yağ kullanmışlardır. Williams ve ark. (1998), uzun yıllardır arı hastalıklarında kullanılan oksitetrasikline karşı *Paenibacillus larvae*'nin direnç kazanmasına değinerek, alternatif sağaltım yöntemlerini araştırmışlardır. Azadirachtin içeren tropikal neem ağacından faydalanarak bu bakteri ile birlikte *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*'ye karşı etkinliğini araştırmışlardır.

Belirli uçucu yağlar uzun yıllardır zararlılara karşı repellent olarak kullanılmıştır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkisel yağların sadece repellent değil, temas ve solunum yoluyla da etkili zehirler olduğunu göstermiştir. Bu etkilerin ise içerdikleri fenol ve terpenoid yapıları maddelerden kaynaklandığı bulunmuştur (Isman, 2000).

Melathopoulos ve ark. (2000), laboratuvar şartlarında bal arıları (*Hymenoptera: Apidae*), *Varroa jacobsoni* (Akar: Varroidae), *Acarapis woodi* (Akar: Tarsonemidae), larva çürüklüğü patojeni *Paenibacillus larvae* ve *Ascospaera apis*'te kullanılan neem pestisitlerinin karşılaştırmalı toksitelerini araştırmışlardır. Zenginleştirilmiş Azadirachtin (neem-aza) ekstraktının *P. larvae* etkenine karşı ham neem yağından (neem oil) 10 kez daha etkili olduğunu ve azadirachtinin neem içindeki ana bileşik olduğunu belirtmişlerdir. Arı parazitlerinde ise t- fluvalinate kadar seçici olmadığını belirtmişlerdir.

Eguaras ve ark. (2005) ilaç kullanımındaki olumsuzluklara bağlı olarak arıcılıkta alternatif ilaç kullanımı üzerine çalışmalarda bulunmuşlardır. Arıcılıkta karşılaşılan başlıca parazitlere karşı, sağlık açısından güvenli olan *Tagetes minuta* esansiyel yağını kullanmışlardır. Melathopoulos ve ark. (2004) ise Amerikan yavru çürüklüğü ve Kireç çürüklüğü hastalığının kontrolünde petek, polenlerde gamma radyasyonun arıcılıkta kullanımını çalışmışlardır. Chioveanu ve ark. (2004) doğal bitkilerden (*Taraxacum officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Achiella millefolium*, *Ocimum basilicum*) alkol ile ekstraksiyon sonucu elde edilen ve aynı zamanda B kompleks vitaminleri içeren protofil adlı ürün ile iki farklı arı kolonisinde *Nosema apis* etkeni ile invaze edilen arılar 5 yıl boyunca iki grup halinde gözlenmiştir. Protofil ürünün arılar için toleransı yüksek olduğu balda ya da her hangi bir arı ürününde kalıntı sorunuyla karşılaşılmadığı tespit edilmiştir. Ürünün bitkisel karakteristik özelliğinden dolayı *Nosema apis*'in gelişimini durdurduğu ifade edilmektedir. İlk sene kullanımında hastalığın klinik belirtilerini azalttığı devamında ise daha etkili hale geldiği görülmüştür. İki farklı kolonideki denemede *Nosema apis* etkeninin sporlarında ilk kolonide % 74 ve ikinci kolonide ise % 89 azalma görülmüştür. 40ml/kg şeker pasta ve ya 20 ml/l dozunda şurup şeklinde her koloniye verilmesi önerilmiştir. Sonbaharda şurup ve ilkbaharda şurup ve şeker pastası şeklinde verilerek uygulanmıştır. Protofilin sonbahar ve ilkbaharda toplam 50–80 ml/sezon dozunda verilmesi gerektiği bildirilmiştir.

1.1.4. Balda ilaç kalıntısı ve yasal düzenlemeler

Son yıllarda arıcılıkta ilaç kullanımı konusunda birçok düzenleme getirilmeye başlamıştır. Arı ürünlerinde kalıntı (rezidü) sorunu hala problem oluşturmaya devam etmektedir. Avrupa Birliği İlaç Değerlendirme ve Danışma Merkezi (EMEA) oluşturulmuştur. Bu merkeze bağlı olarak Veteriner İlaç Ürünleri Komitesi (CVMP) bünyesinde AKS belirlenmiştir (Milani 2001, Ellis 2001). Avrupa birliği uyum yasaları ile birlikte ülkemiz de bu düzenlemelere tabii olmuştur.

Avrupada balların kalıntılardan arındırılmış ve saf olarak nitelendirilmesi, BSE (Sığırların Süngerimsi Beyin Hastalığı), şap ve son zamanlardaki dioksin skandalından sonra tüketiciler için yıllarca gıda güvenliği açısından endişe oluşturmuştur. Tüketici ve arıcılar bu konu üzerine hızla artan hassasiyet göstermişlerdir. Başlangıçta dikkatler çevre kirlenmesine (ağır metaller) ve tarımda pestisit kullanıma yöneltmiştir. Sonradan Avrupa'daki şiddetli varroasis krizleri tekrarlanan ilaç uygulamalarında varrosit ürünlerinin kalıntılarının kontrol altında tutulmasını göz önüne çıkarmıştır. Çok yakın zamanlarda arıcıların değişik ilaç kullanımına yönelmeleri antibakteriyel ve sulfonamid kalıntılarının varlığını ortaya çıkarmıştır.

Bu kalıntılar, hükümet kontrollerinin artması ve analitik metotların geliştirilmesi ile bal ürünlerine dikkati çekmiştir. Avrupa Birliği yasal bakış açısı karmaşık bir yapı içermekte ve her zaman anlaşılır bir bütünlük arz etmemektedir. Bazen zorunlu olarak diğer gıdaların yasalarından yararlanılarak bal ile ilgili yasalar çıkarılmıştır. Bununla ilgili olarak birkaç ofis limiti belirlenmiştir. Aslında veteriner medikal ürünleri piyasaya çıkmadan önce izin verilmesi için (Avrupa Birliği 2377/90 sayılı yönetmelik) bunların toksikolojik çalışmalarla AKS belirlenmesini zorunlu kılmıştır (Piro ve Mutinelli 2003).

Bu yasalarda aşağıdaki tanımlar uygulanmaktadır:

Veteriner ilaç kalıntıları : Bütün farmakolojik aktif maddelerin, kendileri, koruyucu ve bağlayıcı maddeleri, parçalanma ürünlerinin ve onların metabolitlerinin hayvansal orjinli gıdalarda artakalan miktarıdır.

Azami kalıntı seviyeleri : Komisyon tarafından gıdalarda bulunmasına izin verilen kabul edilmiş en yüksek kalıntı seviyesidir. Bu hesaplama için bir çok güvenlik faktörü KGA (Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı) veya NOEL (Etkisiz Miktar) başlangıç olarak içermiştir. AKS'nin güven seviyesi olarak değerlendirilemeyeceği belirtilmiştir.

Çizelge. 1.1.4.1 EMEA tarafından değerlendirilen arı hastalıklarında kullanılabilen kimyasal maddeler (Piro ve Mutinelli 2003).

Kullanılan İlaçlar	AKS (ng/ml)	Gıda Maddeleri	Liste
Tau-Fluvalinate (APISTAN)	-	-	II
Flumetrin (Bayvarol)	-	-	II
Formik asit	-	-	II
Laktik asit	-	-	II
Mentol	-	-	II
Timol	-	-	II
Ökalyptol	-	-	II
Kamfor	-	-	II
Kimazol (Apitol)	1000	Bal	III
Amitraz (Apivar)	200	Bal	I
Kumafos (Perizin)	100	Bal	I

Liste I: Azami kalıntı seviyesi belli olan farmakolojik etkili maddeler, Liste II: Azami kalıntı seviyesine gerek olmayan farmakolojik maddeler, Liste III : Veteriner ilaçlarında azami kalıntı seviyesi geçici olarak belirlenen farmakolojik etkili maddeler, Liste IV : Gıdalarda hiçbir seviyede bulunmaması gereken farmakolojik etkili maddeler.

2377/90 Avrupa Birliği yönetmeliğine göre listelenmeyen ilaçlar izinli olmayan ilaçlardır. 96/23 AB direktifi ilaç kalıntılarının hayvansal gıdalarda (bal dahil) ulusal izleme programlarının nasıl yapılacağını, örnekleme prosedürlerini ve diğer istenilen bilgilere ışık tutacak şekilde rehberlik etmektedir. Her ilacın izlenebilmesi için sınıflara bölünmüş ve belli bir sınıfa dahil edilmiştir. Maddeler 2 ana gruba ayrılarak sınıflandırılmıştır.

Grup A İlaçlar: Yasaklanmış ve anabolik etkili maddeler

- 1) Stilbenler, stilben türevleri, tuzları ve esterleri,
- 2) Antitroit ajanlar,
- 3) Stereoidler,
- 4) Zeronoluda içeren rezorsilik asit laktonları,
- 5) Beta-agonistler,
- 6) AB 2377/90 No'lu Konsey Düzenlemesi'nde yer alan bileşikler, (Kloramfenikol, Nitrofuran vb.),

Grup B İlaçlar: Veteriner ilaçlar ve kontaminantları (Piro ve Mutinelli 2003)

1) Sülfonamid ve kinolonları da içeren antibakteriyel maddeler

2) Diğer Veteriner İlaçları

- a) Antelmentikler,
- b) Nitroimidazoller de içeren antikoksidiyaller,
- c) Karbamatlar ve piretroitler,
- d) Sedatifler,
- e) Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAIDs),
- f) Diğer farmakolojik aktif maddeler,

3) Diğer Maddeler ve Çevre Kontaminantları

- a) Poliklorlu bifenilleri (PCB) de içeren organik klorlu bileşikler,
- b) Organik fosforlu bileşikler,
- c) Kimyasal elementler,
- d) Mikotoksinler,
- e) Boyalar,
- f) Diğerleri,

Ülkemizde de Avrupa müktesebatına uyum kapsamında ilk olarak 1999 yılında balda antibiyotiklerin ulusal kalıntı izleme programlarına başlanmıştır (Erdoğan 2007). Ulusal Kalıntı İzleme Programı'nın Avrupa Birliği uyum kapsamında birliğin, 96/23 yönetmeliğinden yararlanılarak düzenlenmiştir.

19 Ocak 2005 tarih ve 25705 sayılı resmi gazetede yayımlanan "*Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemler*" e dair yönetmelik ile 2006/05 sayılı genelgeye istinaden antibakteriyeller ile bunların kalıntılarının izlenmesinden sorumlu Ulusal Referans Laboratuvarı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'dür (Anonim 2005f, Demirözü 2007).

“Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemler” e dair yönetmelik içerisinde bal için numune alma şartları ve seviyesi;

“Bölüm 4

A- Numune alma şartları:

Balda Numune miktarı kullanılan analitik metoda bağlı olacaktır.

Numuneler üretim zincirinin herhangi bir noktasından orijinal üreticiye doğru geri izlemeyi sağlayacak şekilde alınacaktır.

B-Numune alma seviyesi ve sıklığı:

Numune sayısı, ülke bal üretiminin ilk 3000 tonu için en az 10 numune bu sayıya ilâve olarak her 300 ton bal üretimi için 1 numune olacak şekilde hesaplanacaktır.” şeklinde belirtilmiştir. Numuneler Tarım İl Müdürlüğü Kontrol Şube personelleri tarafından alınmaktadır (Anonim 2005f).

Bu yönetmeliğe istinaden izleme ve geri izleme olmak üzere iki aşamada yürütülür. İzleme ve geri izleme basamağının her birinde cezai yaptırımlar bulunmaktadır.

17.12.2005/26026 sayı ile resmi gazetede yayımlanan Bal Tebliği’nde Veteriner ilaçları kalıntı seviyeleri ile ilgili olarak madde 10’da “*Bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerde bulunabilecek veteriner ilaçları kalıntı miktarları Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği’nin Veteriner İlaçları Tolerans Düzeyleri bölümüne uygun olmalıdır.*” İfadesiyle kalıntı limitleri tebliğine atıfta bulunulmuş; ancak balda antibiotiklerin kalıntı limitleriyle ilgili olarak bu tebliğde bilginin yer almadığı açıktır. Bununla ilgili olarak bakanlığın diğer düzenlemeleri incelendiğinde (Anonim 2005a);

1. Ruhsatsız ilaç kullanımı ve yasaklanmış maddeler ilgili Tarım Bakanlığı’nın 2007-18 sayılı genelgesinin 7. maddesinde, “*Veteriner ilaçları ruhsatlandırma esaslarını düzenleyen Veteriner İspençiyari ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliği (R.G.: 23 Ekim 2002–24915) ve 2. Madde’de bahsedilen azami kalıntı seviyelerini belirleyen tebliğler ile uyumlu olarak I., II. ve III. Liste’de (=Eklerde) yer alan ilaç etkin maddelerini içeren veteriner müstahzarlarının hayvan türlerine göre hangi verim dönemlerinde ve belirtilen “ilaç kalıntı arınma sürelerine (=i.k.a.s.)” uyularak kullanılacakları hususları yeniden değerlendirilmek suretiyle etiket ve prospektüsleri onaylanmıştır.” Ve “İlgililerin kontrol ve takip etmesini kolaylaştırmak amacıyla da 02.03.2004 tarih ve 25390 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan ve Veteriner İspençiyari ve Tıbbi Müstahzarlar Ruhsat Yönetmeliği’nin Geçici 1. Maddesini Değiştiren Yönetmelik gereğince 31 Aralık 2004 tarihinden sonra imal edilmiş tüm veteriner müstahzarlarının Bakanlığımız web sitesinde yayınlanan listede yer almış olması ve*

onaylanmış etiket ve prospektüslerle piyasaya arz edilmiş olmaları gerekmektedir.” ibareleri yer almakta,

2. Aynı genelgenin 10. maddesinde ise *“7. Madde’de bahsedilen mevzuat gereği prospektüslerin yeniden düzenlenmesi ruhsatın iptal edilmeden endikasyon sahasından bazı hayvan türlerinin çıkarılmasına da sebep olmuştur. Örneğin eritromisin arılarda kullanımı kaldırılmıştır. Bu durumda arılarda kullanılmak üzere antibiyotik içeren veteriner müstahzar bulunmadığından ve bal içinde ilaç metabolize olmadığından ya da bu konuda veri olmadığından söz konusu kovanların hijyen ve bakımına önem verilmesi ve gerektiğinde itlaf edilmesi gerekmektedir (Arıcılıkta antibiyotik kullanılamaz).”* ibaresi ile antibiyotiklerin arıcılıkta kullanımının yasak olduğu Tarım Bakanlığı’nın resmi internet sitesinde yayımlanmıştır (Anonim 2007c).

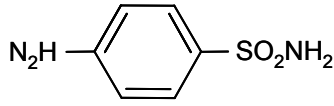
Bu bağlamda ballarda antibiyotiklerin kullanımının ülkemizde yasak olduğu açık olarak görülmektedir.

1.1.5. Sülfonamidler ve arıcılıkta yasadışı kullanımı

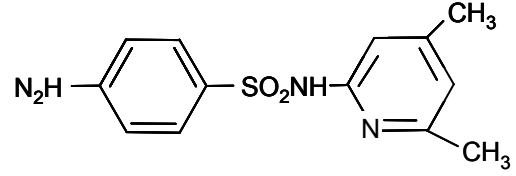
Sülfonamidler insanların sistemik enfeksiyonlarında ilk olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Sülfonamidler ve streptococcuslar karşı kullanımla ilgili araştırmaları sonucu 1938 yılında ilaçlar için Nobel ödülünü Gerhard Domagk’ın almasını sağlamıştır (Campbell 1999).

Penisilinler sağaltımda kullanıma girinceye kadar, bulaşıcı hastalıkların sağaltımında geniş ölçüde uygulama alanı bulmuşlardır; penisilinler ve diğer antibakteriyellerin bulunması ve sağaltıma sokulmaları ile kullanımları zaman içinde giderek azalmıştır. Özellikle trimetoprim, ormetoprim gibi 2,4-diaminoprimidin (DAP) türevleriyle birlikte hazırlanan müstahzarları başta olmak üzere, bazıları bugün bile birçok bakteriyel ve protozoon hastalıkların kontrolünde hala geniş şekilde kullanılmaktadır (Kaya, 2002b).

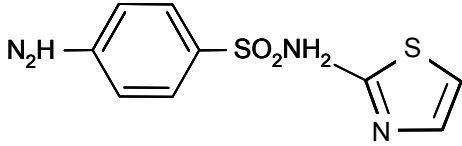
Sülfonamidler para-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) türevleridirler (Şekil 1.1.5.1.), (Campbell 1999). Tüm sülfonamidler benzer kimyasal yapıya sahiptir; bakteriler üzerinde etkinlik için molekülde N4-para-amino grubunun bulunması esastır; yalnız, buraya vücutta amino grubuna çevrilebilen yapılar bağlanabilir. Hidrolizle ayrışıp ana sülfonamid serbest kalır ve etkisini oluşturur (Kaya, 2002b).



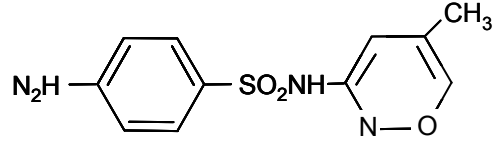
Sülfanilamid



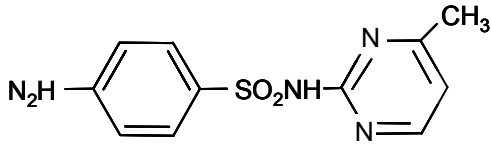
Sülfametazin



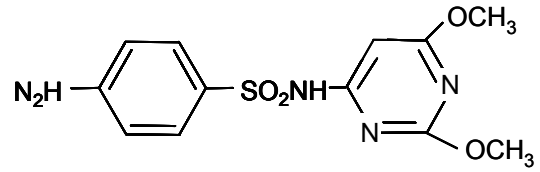
Sülfatiazol



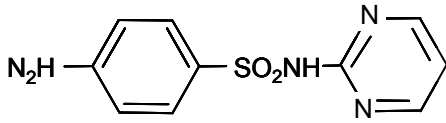
Sülfametoksazol



Sülfomerazin



Sülfadimetoksin



Sülfadiazin

Şekil 1.1.5.1. Bazı sülfonamidlerin kimyasal yapıları.

Sülfonamidler para-aminobenzoik asidin (PABA) yapısal olarak analogları ve yarışmalı antogonistleri olması sebebi ile PABA'nın kullanımını engelleyerek folik asit sentezlenmesini önlerler (Champbell 1999). Amid azotuna (N1) bağlanan gruplar bileşiğin farmakokinetiğini ve etki gücünü değiştirir. Buraya heterosiklik aromatik bir grubun geçmesi en etkili sülfonamid türevlerini oluşturur; bu yönden en güçlü etkinlik sülfatiazol ve sülfadiazinle elde edilir. Benzen halkasına herhangi bir grubun bağlanması genellikle etki kaybıyla sonuçlanır. Sülfonamidler grup olarak suda hemen hiç çözünmeyen ve ışıpta kararar, beyaz renkte, kokusuz, lezzetsiz, kristalize toz halinde bulunurlar. Işığa duyarlı olmaları dışında, genellikle dayanıklıdırlar; toz ve çözelti halinde ısıtılarak mikropsuzlaştırılabilirler. Amfoterik özellik taşıyan sülfonamidler asit ve bazik maddelerle

tuzlar yaparlar. Sodyumlu tuzları ana bileşiklere göre suda daha iyi çözünür ve şiddetli alkali tepkimelidirler. Örneğin, sülfatiazolun sudaki çözünürlüğü 3 mg/ml iken, sülfatiazol sodyum 400 mg/ml miktarda çözünür. Ortamın pH'sı yükseldikçe sudaki çözünürlükleri de artar.

İki veya daha fazla sayıdaki sülfonamidin sudaki toplam çözünme oranı ortama katılan bileşiklerin ayrı ayrı çözünme oranlarından fazladır; bu sebeple, ikili veya üçlü karışımlar halinde bulunan müstahzarların böbreklerde kristal şekillendirme tehlikesi daha azdır. İlaçların asit tepkimeli idrardaki çözünürlükleri sudakine benzerken, alkali idrarda çözünürlükleri daha iyidir. Primidin türevlerinin (sülfadimidin, sülfamerazin, sülfadiazin) dışındaki N4-asetilli sülfonamidlerin sudaki çözünürlükleri ana maddelerden daha azdır. pKa değerleri 4,9-8,56 arasında değişir; zayıf organik asit özelliği taşırlar fakat sodyumlu tuzları alkalidir; bunlardan iki sodyumlu tuzlarının pH'sı 8 dolayındadır ve tüm parenteral yollarla verilebilirler. Tek sodyumlu tuzlarıyla hazırlanan çözeltileri şiddetli alkali (pH 9-11) tepkimelidir; bunların damar içi yolla verilmesi tavsiye edilir. Özellikle sülfadimidin (sülfametazin) olmak üzere, bazı sülfonamidler tiroid bezinde büyüme ve adenosarkoma yol açarlar. Bezdeki büyümenin tiroid uyarıcı hormon salıverilmesini artırmalarıyla ilgili görülmektedir. Tiroid bezine olan etkileri çok uzun süreyle (24 ay gibi) ve fazla miktarlarda (>1200 ppm) verilmeleri durumunda dikkat çeker. Sülfafurazol sülfametoksazol ve sülfametazin IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)'nin listesinde Grup-3 de yer alırlar.

Sülfonamidler arıcılıkta gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalarda bakteriyostatik etkili olmalarından dolayı kullanılmıştır. Günümüzde sülfonamidlerden yalnızca sülfatiazolun arı yetiştiriciliğinde Amerika Birleşik Devletleri'nde uygulanması serbestken, Avrupa Birliği'nde sülfonamidler izinli değildir. 1990 yılında çıkan 2377/90 Avrupa Birliği yönetmeliğine göre listelenmeyen ilaçlar izinli olmayan ilaçlardır. Ülkemizde balda sülfonamidlerin azami kalıntı seviyesi bir önceki bal tebliğinde 10 ng/ml iken, 17.12.2005/26026 sayı ile resmi gazetede yayımlanan Bal Tebliği'nde kalıntı limitleri ile ilgili yönetmeliğe atıf yapılmış ve kalıntı limitleriyle ilgili listelerde baldaki sülfonamidler listelenmemiştir.

İngiltere'de, ithal edilen ballarda 2002 yılında 105 adet balda sülfonamid kalıntılarının analizinde 44 ng/ml ve 11000 ng/ml düzeyinde 2 adet pozitif numune bulunmuştur (Anonim, 2007d).

Fransa'da yapılan 148 adet balın sülfonamid kalıntılarının analizinde 10 ng/ml ile 6127 ng/ml arasında değişen düzeylerde 19 adet numune pozitif olarak bulunmuştur (Martel ve Zeggane, 2003).

Belçika'da 2000-2002 yıllarında ülkesel programda 72 adet balın sülfonamid analizleri yapılmış ve 3 adet pozitif numune bulunmuştur. İthal edilen 98 numunenin ise 31'inin pozitif olduğu belirtilmiştir (Reybroeck, 2003).

Türkiye'de 2003 yılında ballarda yapılan kalıntı inceleme çalışmalarında analiz edilen 163 bal numunesi sülfametazin, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin ve sülfadimetoksin yönünden incelenmiş, 39 numunede 10 ng/ml'in üzerinde sülfametazinin kalıntısı tespit edilmiştir (Anonim, 2004).

2003-2006 yıllarında Ege Üniversitesi İlaç Araştırma Laboratuvarı'nda yapılan sülfonamidler yönünden yapılan kalıntı analizlerinde sırasıyla % 43, 21, 30, 27 oranında pozitif numunelere rastlanılmıştır (Üzümçü, 2007).

Ülkemizde 2006 yılında yapılan bir çalışmada 1714 adet numunenin % 25'inde sülfadimidin (sülfametazin) tespit edilmiştir (Sunay, 2006).

Tarım Bakanlığı resmi internet sitesinde 2006 yılı Ulusal Kalıntı İzleme sonuçları verilerinde 105 numunenin 36'sında sülfametazin, 4'ünde sülfamerazinin tespit edildiği belirtilmiştir (Anonim, 2007c).

1.1.6. Sülfonamid Kalıntılarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Sülfonamid kantitatif analizlerinin özütlemesi, genellikle solvent uygulamasını takiben bir veya daha çok temizleme (clean-up) işlemini içermektedir. Halihazırda geniş spektrumlu sülfonamidler için HPLC, İTK (İnce tabaka Kromatografisi), ELISA (Enzim Linkid Immune Sorbent Assay), biosensor ve mikrobiyolojik inhibisyon yöntemleri kullanılabilir. Bunların içinde HPLC sıklıkla kullanılan, çok duyarlı seçici olmasına karşın, oldukça zahmetli, yorucu ve pahalı analizlerdir (Wang ve ark 2006). Türevlendirici aracılığı ile GC-MS'de de (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi) kantitatif analiz yapılabilmektedir (Cannavan ve ark. 1996).

İTK ile yapılan sülfonamid kalıntı analizinde sülfadiazin, sülfamerazin, sülfametazin, sülfadimetoksin, sülfapridin olmak üzere beş etken maddenin kalıntıları araştırılmıştır.

Som balığı kasındaki metot geliştirme çalışmasında, tespit limiti sırasıyla; 0,11, 0,44, 0,07, 0,13, 0,13 ppm (milyonda bir), geri alım ise; % 57, 63, 60, 63, ve 61 bulunmuştur (Reimer ve Suarez 1991).

Cannavan ve ark. (1996) domuz kasından sülfametazinin tespitinde, metil/trimetilsilil'i türevlendirici olarak kullanarak GC-MS ile tespit etmişlerdir. Özütlemeye aseton ve kloroformu kullanmışlardır. Geri alım değerleri kas, böbrek ve karaciğer için % 86-114, tespit limiti ise 0,01- 0,02 ppm aralığındadır..

Pastor ve ark. (2004) ballarda ELISA tekniği ile özütleme, temizleme işlemleri olmadan sadece seyreltme ile sülfatiazol taramışlardır. Tespit limitini 0,03 ppm olarak belirtmişlerdir.

Martel ve Zeggane (2003), balda sülfatiazol kalıntılarının rutin tespiti için HPLC ile florimetrik tespit yöntemi kullanmışlardır. Örnekleri 1 M (molar) hidroklorik asit ile çözüp kolon öncesi türevlendirmeye HPLC sistemine aktarmışlardır. Mobil faz olarak % 2 asetik asit-asetonitril (60:40 v/v) kullanmışlardır. Değerlendirme limitini 10 ng/ml olarak belirtmişlerdir.

Zotou ve Vasiliadou (2006) katı-faz ile sülfasetamid, sülfatiazol, sülfapiridin, sülfamerazin, sülfametoksipridazin, sülfametoksazolun baldaki kalıntılarını HPLC UV ile 263 nm'de (nanometre) araştırmışlardır.. Katı-faz için abselut nexus kartuj kullanmışlardır. Kafein iç standart olarak kullanılmıştır. Geri alım oranı % 80 -117 arasında ve tespit limiti de 20-25 ng/ml olarak belirtilmiştir.

Gallina ve ark. (2005) balda sülfanilin, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfadoksin, sülfometoksazol, sülfadimetoksin, sülfametazin kalıntılarını 5 ml 2 M hidroklorik asit, aseton, diklormetan ve 2 g sodyum sülfat ile yaptıkları özütleme ile kolon öncesi türevlendirme yaparak HPLC sisteminde floresan detektör ile tespit çalışması yapmışlardır. % 95- 102 gerialım ve 1 ng/ml tespit limiti elde etmişlerdir.

Posyniak ve ark. (2003), balda sülfasetamid, sülfatiazol, sülfametazin kalıntıları için asetik asit tampon ile özütleme yapıp; oktadesil kartuş ile temizleme işlemi yapıp kolon öncesi türevlendirme ile HPLC sistemine aktarmışlardır. % 81,7- 83,4 geri alım ve tespit limitini de 0,1- 0,2 ppb olarak belirlemişlerdir.

Maudens ve ark. (2004), balda sülfaguanidin, sülfanilamid, sülfasetamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfapiridin, sülfamerazin, sülfameter, sülfametazin, sülfametoksipridazin, sülfaklorpidazin asit hidrolizi takiben sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-faz katyon değiştirici kartuj ile temizleme yapıp HPLC sistemine kolon sonrası türevlendirme ile HPLC floresan detektörde analiz etmişlerdir. Asetat tampon ve asetonitrili mobil faz olarak kullanmışlardır. Eksitasyon ve emisyon değerleri sırasıyla; 420-485'te % 40-67 geri kazanım oranında 5 ng/ml değerlendirme limitini metod performansı olarak değerlendirmişlerdir.

Pang ve ark. (2003) balda sülfanilamid, sülfapridin, sülfamerazin, sülfametoksipridazin, sülfameter, sülfaklorpidazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin kalıntılarını pH 2'de fosforik asitle çözdürdükten sonra sülfonik katyon değiştirici kartujden geçirip HPLC sisteminde analiz etmişlerdir. Eksitasyon, emisyon dalga boyları sırasıyla 405 ve 495 nanometrede, floresan detektörde %73,5- 94 gerilim ile 2-5 ng/ml arasında tespit limiti belirtilmiştir.

Kaufmann ve Kaenzigb (2004), HPLC-MS-MS ile sülfonamid kalıntılarının ve balda metabolit oluşturan herbisit ilaçlardan asulamın kalıntılarını araştırmışlardır. Analiz için, 7,5 g bal kullanılıp asidik hidrolizden sonra kartuştan geçirilip, cihaza enjeksiyon yapılmıştır. Mobilfaz olarak formik asit ilave edilmiş asetonitril ile su kullanılmıştır.

Huq ve Kallury (2006), balda sülfatiazol, sülfamerazin, sülfometoksazol kalıntıları için, 1 g bal alınıp asitlendirme yapıp katı-faz kartuşlama yaptıktan sonra LC-MS-MS sistemine vermişlerdir. Mobil faz olarak formik asit ilave edilmiş su ve asetonitril kullanılmıştır.

Thompson ve Noot (2005), LC-MS-MS tekniği ile sülfonamid kalıntılarını araştırmışlardır. Diğer metotlardan farklı olarak asidifikasyondan sonra filtrasyon yapıp cihaza direk enjeksiyon yapılmıştır. Örnek temizleme işlemini otomatik olarak cihaza yaptırılmıştır.

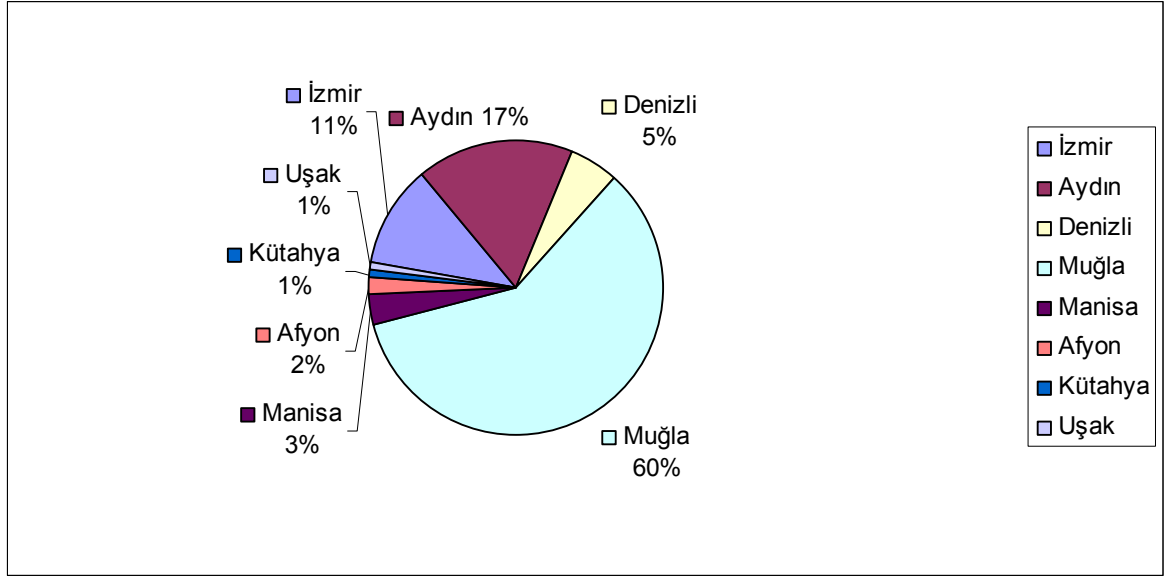
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada bal örneklerin toplanması, tabakalı örnekleme yönteminde orantılı dağıtım yaklaşımı kullanılarak yapılmıştır (Anonim, 2007e). Çalışmada Ege Bölgesi'nde bal üretimi fazla olan illerden toplanan 103 bal araştırmanın materyalini oluşturmuştur. Yerinde arıcılardan toplanan 42 adet örnek ile Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Toksikoloji Laboratuvarı'na gelen 61 adet bal, örnekleri teşkil etmiştir. Toplanan örnekler, ışığa kapalı ortamda oda ısısında ve ambalajların ağzı ortam nemini almayacak şekilde kapatılarak muhafaza edilmiştir. Örneklerin her birinin üzerinde numuneyi temsil eden etiketler yer almış ya da silinmeyen kalemle bilgileri ambalajlar üzerlerine yazılmıştır (Çizelge 2.1.1., Şekil 2.1.1.).

Çizelge 2.1.1: Ege Bölgesi 2006 arıcılık verileri ve toplanan numune sayısı (Anonim 2007f).

İller	Köy sayısı	Bal üretimi (ton)	Toplanan Numune Sayısı
İzmir	374	2,272	27
Aydın	293	3,547	10
Denizli	214	1,084	6
Muğla	349	12,072	47
Manisa	393	657	5
Kütahya	318	208	7
Uşak	199	155	1
Afyon	92	393	-



Şekil 2.1.1: Ege bölgesi bal üretim miktarlarının oransal dağılımı.

Analiz verilerinin aritmetik ortalama, standart sapma ve % standart sapma (Relatif Standart Sapma) hesaplamaları Microsoft Office Professional Excel 2003 programı ile yapılmıştır.

2.1.1. Kullanılan cihaz ve laboratuvar malzemeleri

2.1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihaz (Agilent 1100 serisi) bileşenleri:

- Mobil faz gaz giderici (Agilent 1100).
- LC Pompa, (Agilent, 1100).
- Floresan detektör (Agilent, 1100).
- Otomatik örnekleyici (Agilent, 1100).
- Kolon sonrası türevlendirme ünitesi, (PCX 5200, Pickering Laboratoires).
- Kolon: Ters faz (RP) C₁₈, 5 μ , 150 mm x 4,6 mm (H5 ODS Hichrom).

Laboratuvar araçları

- Hassas terazi, CP 423 S (Sartorius).
- Mikro pipetler 10–100 ve 100-1000 μ l'lik, (Greiner, Ependorf).
- Karıştırıcı, KS 250 KIKA (Labortechnik).
- pH metre, pH 526 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten).
- Soğutmalı santrifüj (Rotina 35 R, Hettich).
- Çoklu Vorteks (Heidolph).
- Vorteks, Velp 2x3 (Scientifica).
- Rotary evaporatör (Heidolph).
- Ultrasonik Su Banyosu, (Beco, Technic).

Kimyasallar

- Asetik Asit, (Merck, 1.00056).
- Asetonitril, (HPLC saflıkta, Merck, 1.00030).
- n-propanol (HPLC saflıkta, Merck, 3692021)
- Metanol, (HPLC saflıkta, Merck, 6009).

- Diklorometan, (Merck, 1.06044).
- Di sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 , (Merck 1.06586.0500).
- Fluoresamine, (Applichem, A2164).
- Triklor Asetik Asit, (Merck, 1.00810).
- Sülfanilamid analitik standart, (%99,9, Sigma, S-9251).
- Sülfadiazin analitik standart, (%99,6, S-8626).
- Sülfatiazol analitik standart, (%99,9, Merck, 8.17031).
- Sülfamerazin analitik standart, (%99, Sigma, S-800).
- Sülfametazin analitik standart, (%99,9, Sigma, S-6256).
- Sülfametaksazol analitik standart, (%99,9, Sigma, S-7507).
- Sülfadimetoksin analitik standart, (%99,4, Fluka, 86026).

Cam malzemeler

- Dereceli Pipetler, 1 ml, 5 ml ve 10 ml.
- Santrifüj Tüpleri, 50 ml.
- Mezür, 25 ml, 50 ml, 100 ml ve 500 ml.
- Beher, 10 ml, 25 ml ve 50 ml.
- Cam huniler, 5cm ve 10 cm Ø.
- Ölçülü balonlar, 250, 500 ve 1000 ml.
- Balon joje, 5, 10, 25, 50 ve 100 ml
- Dereceli pipetler, 1 ml, 5 ml ve 10 ml.

Solüsyonlar

- **% 10'luk Triklor asetik asit (TCA)'nın hazırlanması.**

10 g TCA, 50 ml ultra saf suda çözündürülüp son hacim 100 ml'ye tekrar ultra saf su ile tamamlanır.

- **1 M Disodyum hidrojen fosfat'ın hazırlanması.**

14,2 g di-sodyum hidrojen fosfat, ultra saf su ile çözüldürölüp, son hacim 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlanır.

- **Mobil Faz A'nın hazırlanması (% 1 asetik asit).**

5 ml asetik asit, son hacim 500 ml olana kadar bidistile su ile seyreltilir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilir.

- **Mobil Faz B'nin hazırlanması (% 80 Asetonitril).**

400 ml asetonitril, 100 ml ultra saf su ile seyreltilir. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilir.

- **Türevlendirme reaktifinin hazırlanması.**

0,100 g fluoresamine, 100 ml asetonitril ilave edilir eritilir ve üzerine 300 ml mobil faz A ilave edilir.

- **Standart seyreltme solüsyonu.**

Mobil faz A kullanılır.

- **Ana stok standart solüsyonları (1 mg/ml -1000 ppm).**

10'ar mg Sülfanilamid Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfametazin Sülfametoksazol Sülfadimetoksin standardından ayrı 10 ml'lik balonlara tartım yapılarak, balon çizgisine kadar asetonitril ile doldurulur. Sülfamerazin ise 10,1 mg tartılır. (4-8°C'de buzdolabında ve karanlıkta 1 ay saklanabilir).

- **Sülfonamidlerin ana stok karışık standard solüsyonu (10 µg /ml-10 ppm).**

Sülfanamid Ana Stok Solüsyonlarının her birinden ayrı ayrı 100'er µl alınarak, asetonitril ile 10 ml'lik balon joje içerisinde çizgisine kadar seyreltilir. (4-8°C'de buzdolabında ve karanlıkta 1 ay saklanabilir).

- **Sülfonamid ana stok karışık standard solüsyonu (1 µg /ml-1 ppm).**

Sülfonamid karışık Ara Standard Stok Solüsyonundan 100 µl alınarak, üzerine 900 µl standart seyreltme solüsyonu ilave edilir. Günlük hazırlanır.

2.2. Yöntem

Bal numunelerinden sülfonamidlerin özütlenmesinde ve HPLC cihazına uygulanmasında Diserens ve ark. (2002), Anonim (2002), Verzegnessi (2002), Horie ve ark.(1992), ile Shao ve ark.'nın (2005) kalıntı analiz yöntemlerinden yararlanılmıştır.

2.2.1. Kromatografik koşullar

- Akış hızı: 0.7 mL/min.
- Enjeksiyon miktarı: 70 µl.
- Analiz süresi: 36 dakika (Analiz sonrası 5 dakika şartlanma dahil).
- Flouresan detektör koşulları: Eksitasyon Dalga Boyu: 400, Emisyon Dalga Boyu: 495 nm.
- Pickering koşulları: Kolon ısısı: 45°C, Reaktör ısısı: 45°C.
- Mobil faz koşulları: Mobil Faz A: % 1 Asetik asit, Mobil Faz B: % 80 Asetonitril.
- Mobil faz değişim programı (Çizelge 2.2.1.1).

Çizelge 2.2.1.1. Mobil faz değişim programı.

Zaman (Dakika)	Mobil Faz A(%)	Mobil Faz B(%)
0	90	10
5,00	85,0	15,0
12,50	80,0	20,0
20,00	67,5	32,5
22,50	68,0	32,0
25,50	82,5	17,5
26,00	90,0	10,0
31,00	90,0	10,0

2.2.2. Sülfonamid standartlarının cihaza tanıtılması

10 mg sülfanilamid, sülfadiyazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin ayrı ayrı 10 ml'lik balon jodede asetonitril ile sulandırılarak 1000 µl/ml (ppm) ana stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonlardan ayrı ayrı 1/1000 seyreltme (1 µl/ml) yapılarak cihaza enjeksiyon yapılarak standartların çıkış zamanları belirlenmiştir.

Hazırlanan stok solüsyonlar 4°C muhafaza edilerek bir ay süreyle kullanılmıştır. Her solüsyondan 100'er µl alınarak asetonitril ile 10 ml'lik balon jodede seyreltilip 10 µl/ml'lik ara stok karışık standart solüsyonu hazırlanmıştır. 10 µl/ml'lik ara karışık standart stok solüsyonundan 1 ng/ml , 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml'lik standartlar hazırlanarak cihaza enjekte edilmiştir. Enjeksiyon her solüsyon için 3'er tekrarlı yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi çizilerek standartların doğruluğu ve cihazın tekrarlı enjeksiyonlardaki performansı test edilmiştir. Her gün yapılan enjeksiyonlarda ise günlük olarak mobil faz (0 ng/ml), 5 ng/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml'lik solüsyonlar cihaza enjekte edilerek 5 noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

2.2.3. Örneklerin ve geri alım çalışması için yükleme yapılacak balların hazırlanması

Numuneler ve daha önceden özütleme işleminden geçirilip cihaza verilen ve sülfonamid kalıntısı içermediği tespit edilen bal numunesinden pozitif numunenin hazırlanması için su banyosunda 35°C'de 10 dk karıştırılarak bir örnek hale getirilmiştir. Daha sonra 50 ml'lik tüplere 5'er gr tartım yapılmıştır. Geri alım çalışması için 1 ppm'lik karışık standart çalışma solüsyonundan mikropipet (10–100 µl aralığında) yardımıyla 50 µl, 75 µl, 100 µl ilave edilerek elde edilen 10, 15, 20 ng/g yüklü numuneler vorteksenerek 1 saat beklenmiştir. Aynı işlemler yükleme yapılmamış bir adet kör numune için de yapılmıştır. Mikropipet ucu değiştirilmeden standart çalışma solüsyonundan 100 µl viale alınarak 900 µl mobil faz A ilave edilmiş 100 ng/ml'lik standart elde edilmiştir. Mikropipet ucu değiştirildikten sonra 100 ng/ml standarttan sırasıyla 5, 10, 25, 50 ng/ml standartlar aynı pipet ucuyla ayrı ayrı viallerde hazırlanarak, günlük kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

2.2.4. Özütleme

5 g olarak tartılan numuneler ile gerialım çalışması yapılmak için hazırlanan yüklü numuneler üzerine %10'luk TCA'dan 5 ml ilave edilmiştir. Numuneler vorteks yardımı ile çözdürülmüştür. Çözdürülen bal örneği 65 °C de 15 dk'sı ses dalgalı olmak üzere, toplam 60 dk su banyosunda asidik hidroliz için bekletilmiştir. Karışımın pH'sı 1 M Na₂PO₄ ile 6,5'e ayarlanmıştır. Üzerine 20 ml asetonitril ve 5 ml diklorometan ilave edilerek 15 dk vortexte karıştırılmıştır. Ekstrakta 25 dk süre ile 4000 dakika/devir'de santrifüj işlemi uygulandıktan sonra üst fazdan 23 ml temiz bir balona aktarılmıştır. İçerisine 3,5 ml n-propanol ilave edilerek azot gazı altında uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra numuneye 2 ml mobil faz eklenip vorteks ve ultrasonik banyo yardımı ile numune çözdürülmüştür. Bu solüsyon 0,45µ filtreden geçirildikten sonra edildikten sonra 70 µl'si HPLC sistemine analiz edilmek üzere enjekte edilmiştir.

2.2.5. Metodun geçerlilik ve kesinliği

Pik çıkış süreleri için, 4 gün boyunca cihaza verilen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml olarak hazırlanan karışık standartların pik çıkış sürelerinin ortalamaları alınmıştır.

Validasyon çalışması için 10 ng/g, 15 ng/g ve 20 ng/g sülfonamid karışık standart yüklü bal numunelerinden geri alım çalışmaları yapılmıştır. 10 ng/g yüklü bal numunelerinden 4 farklı günde 6'şar ayrı özütleme yapıp geri kazanımları hesaplanmıştır. 15 ng/g yüklü bal numunelerinden 1. gün 3, 2. gün 6, 3. gün 5, 4. gün 6 tekrarlı çalışma yapılmıştır. 20 ng/g yüklü bal numuneleri için 1. gün 5, 2. gün 6, 3. gün 6, 4. gün 3 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Toplamda 10 ng/g'den 24, 15 ng/g'den 20, 20 ng/g'den 20 tekrarlı çalışma yapılmıştır.

Geri alım hesaplaması

Geri alım hesaplaması için 0,4 (5 g bal 2 ml mobil fazda toplanmaktadır), 1,09 (20 ml asetonitril ve 5 ml diklorometan karışımından oluşan üst fazın 23 ml'si alınmaktadır.) seyreltme faktörü olarak cihaza girilip hesaplatılmıştır.

Hesaplama: Seyreltme faktörü = 1,09 x 0,4 = 0,43

% Gerialım = Ölçülen değer X 0,43/Yüklenen değer

2.2.5.2. Gün içi tekrarlanabilirlik ve kesinlik

Gün içi tekrarlanabilirlik ve kesinlik hesaplamasında sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sulfometoksazol, sülfadimetoksin farmakolojik etkili maddelerinin 10 ppb, 15 ppb, 20 ppb seviyelerde 6'şar tekrar olmak üzere, toplam 18 özütleme yapılarak ölçülen yoğunlukların ortalamaları, standart sapmaları ve % standart sapmaları (Relatif standart sapma, RSD) hesaplanmıştır.

2.2.5.3. Günler arası tekrarlanabilirlik ve kesinlik (Tekrar üretilebilirlik)

Günler arası tekrarlanabilirlik ve kesinlik için her etken madde için 10 ppb,15 ppb, 20 ppb seviyede ölçülen yoğunluklarının farklı günlerdeki, ortalamaları, standart sapmaları, ve % standart sapmaları (RSD) hesaplanmıştır.

2.2.5.4. Tespit limiti (TL) ve değerlendirme limitinin (DL) hesaplanması

Sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin farmakolojik etkili maddelerinin, 29 ayrı özütleme yapılan 10 ng/g yüklü ballardaki kalıntılarının, ölçülen yoğunluklarının standart sapmasının 3 katı dedeksiyon limiti, 10 katı ise değerlendirme limiti olarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Yöntem için literatür taraması yapılmıştır. Literatür taramasından sonra laboratuvar şartlarına uygun yöntemler seçilmiştir. (Diserens ve ark. 2002, Anonim 2002, Verzeğnassi 2002, Horie ve ark.1992, Shao ve ark.2005). Seçilen yöntemlerden modifiye çalışmalarla uygun yöntem geliştirilip; uygulanabilir duruma getirildikten sonra analizlere başlanmıştır.

Çalışmada Ege bölgesinden sülfonamid kalıntıları incelenmek üzere 103 bal örneği toplanmıştır. Muğla'da 12072 ton, Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illerinde ise toplam 7923 ton bal üretimi yapılmaktadır. Üretim miktarlarına paralel olarak Muğla'dan toplanan 47 örnek ile Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illerinden toplanan 56 örnek ikiye ayrılarak değerlendirmede dikkate alınmıştır.

3.1. Pik çıkış süreleri

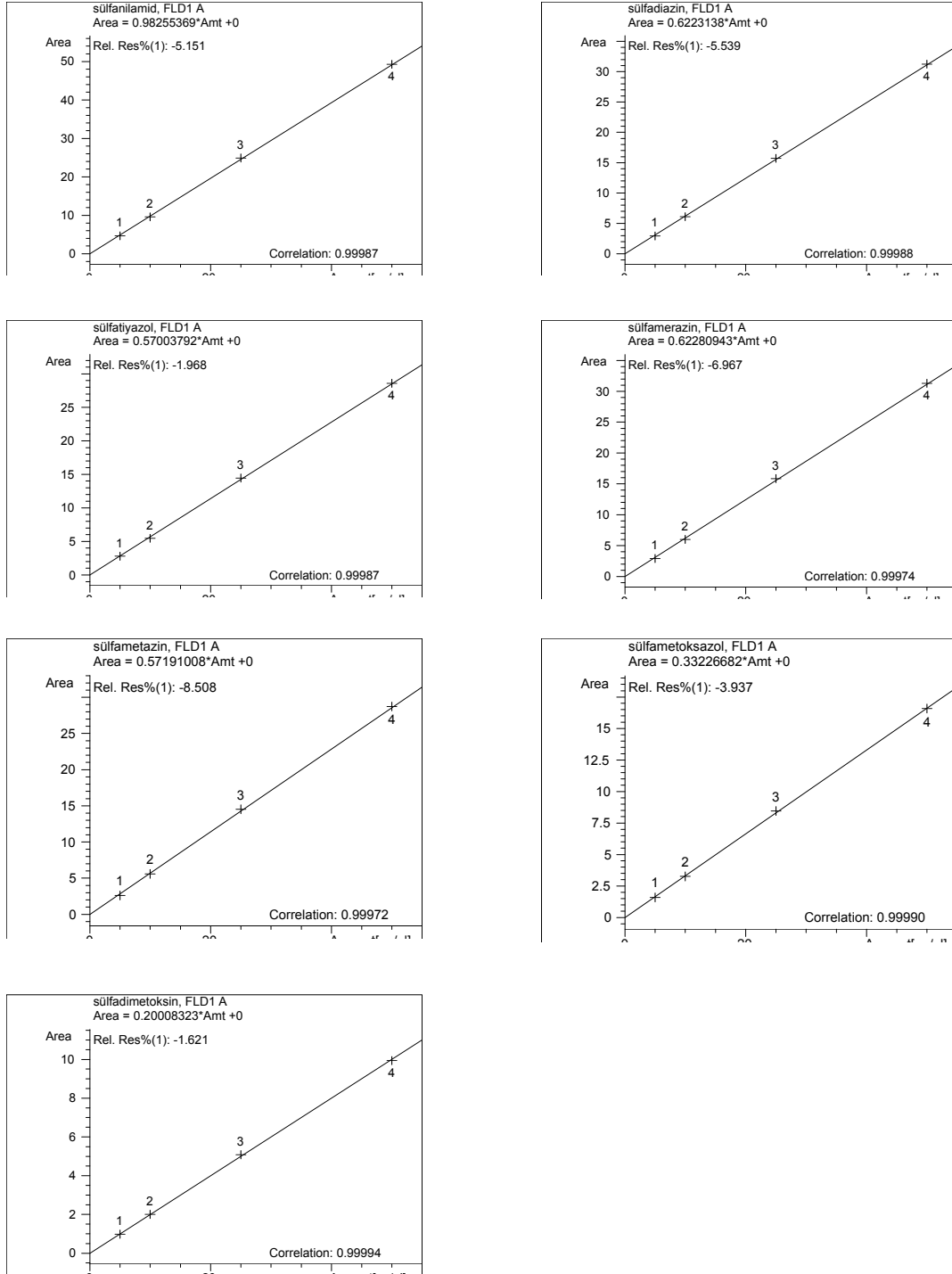
4 farklı günde cihaza verilen 5, 10, 25, 50 ng/ml konsantrasyonda yüklü standartların ortalama çıkış zamanları hesaplanmıştır. Pikler, 5,61-25,58 arasında değişen zamanlarda çıkmıştır. Kesinlikleri 0,01-014 arasında değişmektedir (Çizelge 3.1.1.).

Çizelge 3.1.1. Pik çıkış süreleri.

Analit	Standart Genel Ortalama Çıkış Zamanları (dk) (\pm SS) (n=4)
Sülfanilamid	5,61 \pm 0,01
Sülfadiazin	8,91 \pm 0,01
Sülfatiazol	10,37 \pm 0,02
Sülfamerazin	11,62 \pm 0,01
Sülfametazin	14,82 \pm 0,01
Sülfametoksazol	18,76 \pm 0,04
Sülfadimetoksin	25,58 \pm 0,14

3.2. Standart eğri

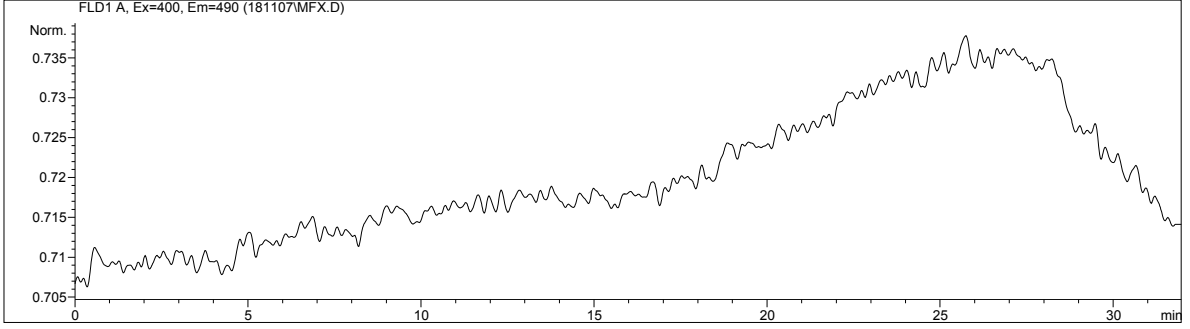
Sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin için 5, 10, 25 ve 50 ng/ml'deki kalibrasyon eğrileri çizilmiştir (Şekil 3.2.1.).



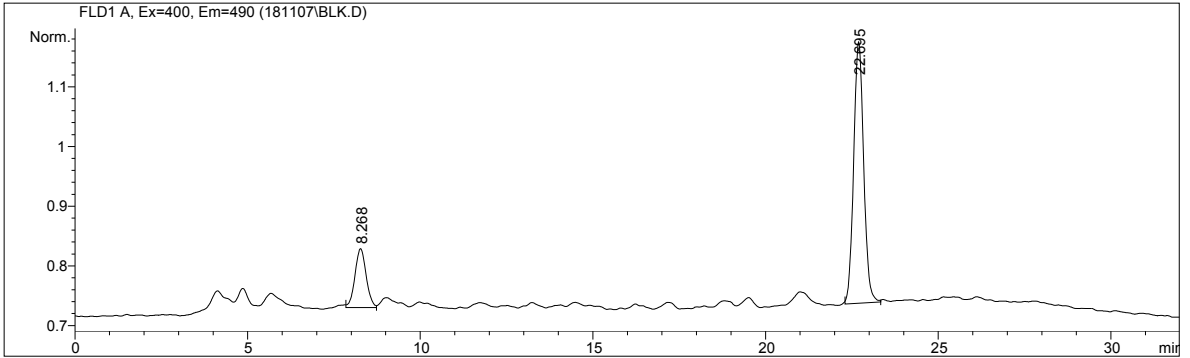
Şekil 3.2.1. Kalıntı analizi yapılan sülfonamid standartlarının kalibrasyon eğrileri.

3.3. Kromatogramlar

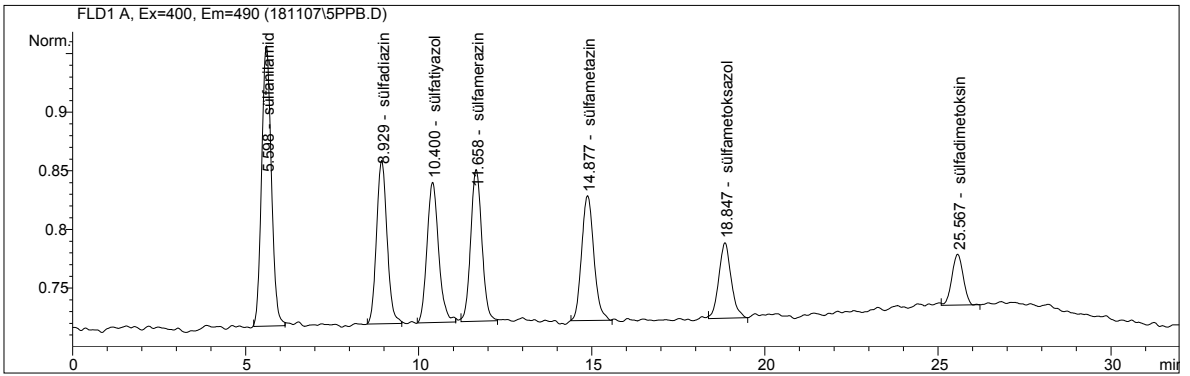
Cihazdan alınan mobil faz, 5 ng/ml sülfonamid standardı, boş bal, 15 ng/g karışık standart yüklü örnek, süfametazin pozitif bal örneği, sülfamerazin pozitif bal örneği, sülfametoksazol pozitif bal örneği kromatogramları sırasıyla Şekil 3.3.1., Şekil 3.3.2., Şekil 3.3.3., Şekil 3.3.4., Şekil 3.3.5., Şekil 3.3.6., Şekil 3.3.7.'de gösterilmiştir.



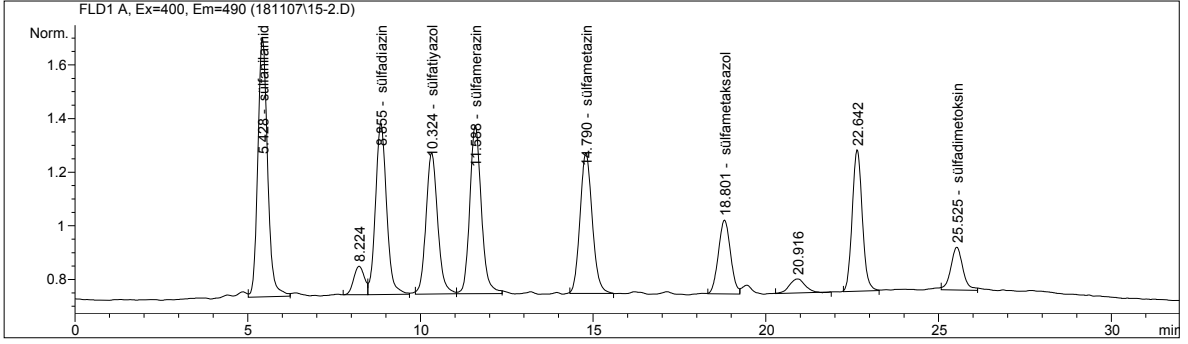
Şekil 3.3.1. Mobil faz kromatogramı



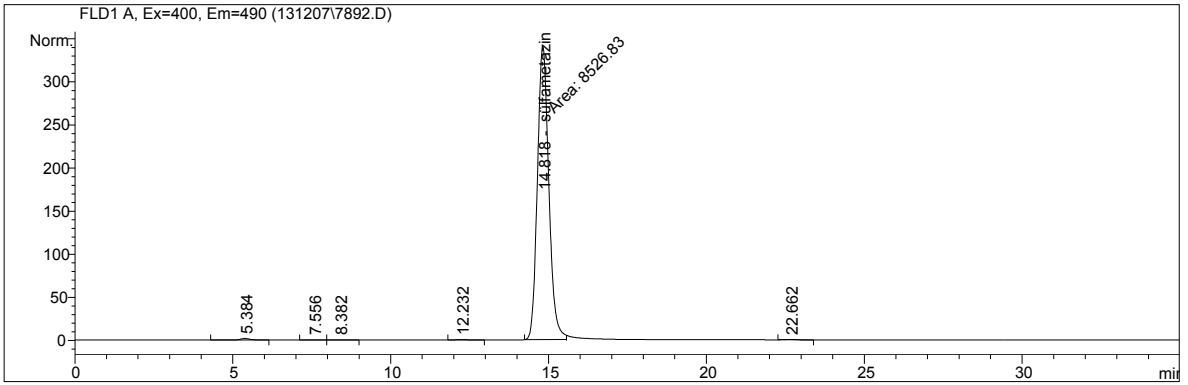
Şekil 3.3.2. Boş bal kromatogramı



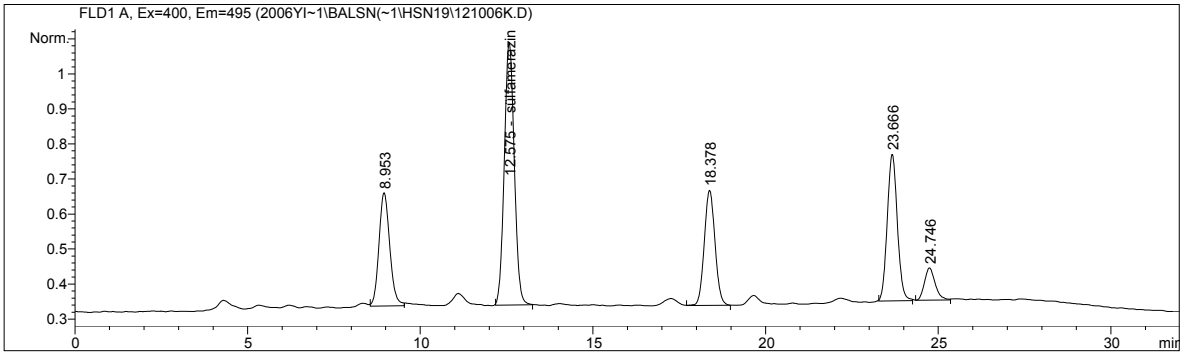
Şekil 3.3.3. 5 ng/ml. sülfonamid standardı kromatogramı.



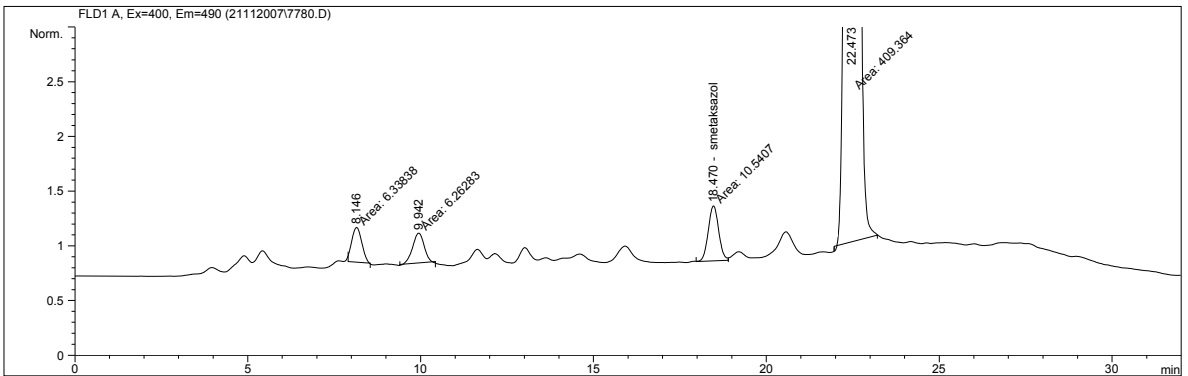
Şekil 3.3.4. 15 ng/g yüklü bal örneği kromatogramı.



Şekil 3.3.5. Sülfametazin pozitif bal örneği kromatogramı.



Şekil 3.3.6. Sülfamerazin pozitif bal örneği kromatogramı.



Şekil 3.3.7. Sülfametoksazol pozitif bal örneği kromatogramı.

3.4. Geri alım oranları

Dört farklı günde hazırlanan 10, 15, 20 ng/g karışık standart yüklü bal örneklerinin ölçülen miktarlarının geri alımları hesaplanarak ortalamaları Çizelge 3.4.1.'de verilmiştir. Kesinlikleri 1,10 ile 6,86 arasında değişiklik göstermiştir.

Çizelge 3.4.1. Geri alım oranları

Analit	İlave edilen yoğunluk (ng/g)	Geri alım ortalama % (\pm SS)	3 konsantrasyon için geri alım ortalama %
Sülfanilamid	10	66,05 \pm 6,86	62,37
	15	62,60 \pm 4,01	
	20	58,45 \pm 3,46	
Sülfadiazin	10	67,69 \pm 3,96	64,10
	15	64,05 \pm 2,52	
	20	60,56 \pm 5,43	
Sülfatiazol	10	65,78 \pm 3,31	62,57
	15	62,37 \pm 1,62	
	20	59,56 \pm 4,26	
Sülfamerazin	10	70,80 \pm 4,27	67,11
	15	66,77 \pm 2,04	
	20	63,77 \pm 4,27	
Sülfametazin	10	70,16 \pm 4,79	66,94
	15	66,98 \pm 2,47	
	20	63,67 \pm 4,83	
Sülfametazazol	10	61,20 \pm 3,78	57,31
	15	57,18 \pm 3,07	
	20	53,56 \pm 4,28	
Sülfadimetoksin	10	56,24 \pm 4,21	53,99
	15	54,22 \pm 1,10	
	20	51,52 \pm 3,34	

10 ng/g için n=24, 15 ng/g için n=20, 20 ng/g için n=20

3.5. Gün içi tekrarlanabilirlik ve kesinlik

Bir günde hazırlanan 10, 15, 20 ng/g karışık standart yüklü bal örneklerinin 6'şar tekrarlı olarak toplam 18 özütleme yapılarak analiz edilmiş; ölçülen miktarlarının kesinlikleri 0,07-0,3 aralığında, % standart sapmaları (RSD) ise 0,48 ile 6,03 aralığında hesaplanmıştır (Çizelge 3.5.1.).

Çizelge 3.5.1. Gün içi tekrarlanabilirlik ve kesinlik

Analit	İlave edilen yoğunluk (ng/g)	Ölçülen yoğunluk (n=6) (ng/g) (\pm SS)	(%) Standart sapma (RSD)	Ölçülen gerçek yoğunluk (n=6) (ng/g) (\pm SS)
Sülfanilamid	10	7,10 \pm 0,21	3,02	10,75 \pm 0,32
	15	9,94 \pm 0,21	2,12	15,87 \pm 0,34
	20	12,15 \pm 0,17	1,36	20,78 \pm 0,14
Sülfadiazin	10	7,11 \pm 0,20	2,76	10,50 \pm 0,29
	15	9,47 \pm 0,05	0,48	14,78 \pm 0,07
	20	11,99 \pm 0,12	0,96	19,78 \pm 0,24
Sülfatiazol	10	6,88 \pm 0,24	3,47	10,46 \pm 0,36
	15	9,20 \pm 0,14	1,51	14,75 \pm 0,22
	20	11,80 \pm 0,23	1,95	19,69 \pm 0,51
Sülfamerazin	10	7,49 \pm 0,23	3,11	10,58 \pm 0,33
	15	9,90 \pm 0,07	0,69	14,83 \pm 0,10
	20	12,69 \pm 0,16	1,23	19,99 \pm 0,32
Sülfametazin	10	7,38 \pm 0,15	2,03	10,52 \pm 0,21
	15	10,06 \pm 0,09	0,85	15,01 \pm 0,13
	20	12,83 \pm 0,13	1,03	20,17 \pm 0,26
Sülfametaksazol	10	6,68 \pm 0,17	2,48	10,91 \pm 0,27
	15	8,77 \pm 0,08	0,93	15,34 \pm 0,14
	20	11,03 \pm 0,07	0,60	20,69 \pm 0,07
Sülfadimetoksin	10	5,94 \pm 0,30	5,07	10,56 \pm 0,54
	15	8,36 \pm 0,50	6,03	15,43 \pm 0,93
	20	10,41 \pm 0,24	2,35	20,41 \pm 0,48

3.6. Günler arası tekrarlanabilirlik ve kesinlik

Dört günde hazırlanan 24 adet 10 ng/g, 20 adet 15 ng/g, 20 adet 20 ng/g karışık standart yüklü bal örnekleri analiz edilmiş; ölçülen miktarlarının kesinlikleri 0,36-0,98 aralığında, % standart sapmaları (RSD) ise 4,8-10 aralığında hesaplanmıştır (Çizelge 3.6.1.).

Çizelge 3.6.1. Günlerarası tekrarlanabilirlik ve kesinlik

Analit	İlave edilen yoğunluk (ng/g)	Ölçülen yoğunluk (ng/g) (\pm SS)	(%) Standart sapma (RSD)	Ölçülen gerçek yoğunluk (n=6) (ng/g) (\pm SS)
Sülfanilamid	10	6,61 \pm 0,66	10,04	10,00 \pm 1,00
	15	9,50 \pm 0,54	5,70	15,17 \pm 0,86
	20	11,69 \pm 0,84	7,17	19,83 \pm 1,52
Sülfadiazin	10	6,77 \pm 0,40	5,91	10,00 \pm 0,59
	15	9,55 \pm 0,55	5,81	14,92 \pm 0,87
	20	12,18 \pm 0,98	8,03	20,18 \pm 1,78
Sülfatiazol	10	6,58 \pm 0,34	5,23	10,00 \pm 0,52
	15	9,32 \pm 0,49	5,23	14,95 \pm 0,78
	20	11,93 \pm 0,86	7,19	20,05 \pm 1,59
Sülfamerazin	10	7,08 \pm 0,45	6,29	10,00 \pm 0,63
	15	9,97 \pm 0,42	4,17	14,94 \pm 0,62
	20	12,79 \pm 0,81	6,35	20,11 \pm 1,40
Sülfametazin	10	7,02 \pm 0,48	6,82	10,00 \pm 0,68
	15	10,03 \pm 0,49	4,88	14,97 \pm 0,73
	20	12,79 \pm 0,93	7,28	20,08 \pm 1,62
Sülfametaksazol	10	6,12 \pm 0,36	5,96	10,00 \pm 0,60
	15	8,51 \pm 0,49	5,77	14,88 \pm 0,86
	20	10,86 \pm 0,81	7,50	20,23 \pm 1,68
Sülfadimetoksin	10	5,62 \pm 0,45	7,99	10,00 \pm 0,60
	15	8,16 \pm 0,46	5,60	14,30 \pm 3,46
	20	10,37 \pm 0,63	6,11	20,16 \pm 1,36

10 ng/g için n=24, 15 ng/g için n=20, 20 ng/g için n=20

3.7. Tespit ve değerlendirme limitleri

10 ng/g karışık standart yüklü bal örnekleri 29 tekrarlı olarak çalışılmış 1,51 ile 1,61 aralığında tespit limiti ve 5,51 ile 7,34 aralığında değerlendirme limiti hesaplanmıştır (Çizelge 3.7.1.).

Çizelge 3.7.1. Tespit ve değerlendirme limitleri

Analit	Tespit limiti (ng/g)	Değerlendirme limiti (ng/g)
Sülfanilamid	2,05	6,83
Sülfadiazin	1,61	5,36
Sülfatiazol	1,65	5,51
Sülfamerazin	2,00	6,67
Sülfametazin	2,20	7,34
Sülfametaksazol	1,51	5,02
Sülfadimetoksin	2,02	6,73

3.8. Örneklerin analiz sonuçları

47 adet Muğla, 1 adet Uşak, 27 adet İzmir, 5 adet Manisa, 7 adet Kütahya, 10 adet Aydın, 6 adet Denizli menşei bal analiz edilerek sülfonamid kalıntıları aranmıştır (Çizelge 3.8.1., 3.8.2, 3.8.3., 3.8.4., 3.8.5., 3.8.6., 3.8.7.).

Çizelge 3.8.1. Muğla ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
M1	-	-	-	-	-	9,94	-
M2	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	65,85	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
M12	-	-	-	-	-	-	-
M13	-	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	-	-	-
M15	-	-	-	-	-	-	-
M16	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.8.1. (devam) Muğla ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
M17	-	-	-	-	-	-	-
M18	-	-	-	-	34,88	-	-
M19	-	-	-	-	-	-	-
M20	-	-	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	-	-
M22	-	-	-	-	-	-	-
M23	-	-	-	-	-	22,56	-
M24	-	-	-	-	-	-	-
M25	-	-	-	-	-	-	-
M26	-	-	-	-	-	-	-
M27	-	-	-	-	-	-	-
M28	-	-	-	-	-	-	-
M29	-	-	-	-	133	-	-
M30	-	-	-	-	1501	-	-
M31	-	-	-	-	-	-	-
M32	-	-	-	-	-	-	-
M33	-	-	-	-	213	-	-
M34	-	-	-	-	-	-	-
M35	-	-	-	-	9,2	-	-
M36	-	-	-	-	25,39	-	-
M37	-	-	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-	-	-
M39	-	-	-	-	-	-	-
M40	-	-	-	-	21,96	19,99	-
M41	-	-	-	-	-	-	-
M42	-	-	-	-	-	-	-
M43	-	-	-	-	-	-	-
M44	-	-	-	-	-	-	-
M45	-	-	-	-	-	-	-
M46	-	-	-	-	-	-	-
M47	-	-	-	-	28,69	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sülfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, M: Muğla, - : Tespit edilmedi..

Çizelge 3.8.2. Uşak ili örneğinin analiz sonucu (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
U1	-	-	-	-	-	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, U: Uşak, - : Tespit edilmedi.

Çizelge 3.8.3. İzmir ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
İ1	-	-	-	-	-	-	-
İ2	-	-	-	-	-	-	-
İ3	-	-	-	9,43	-	-	-
İ4	-	-	-	-	-	-	-
İ5	-	-	-	-	-	-	-
İ6	-	-	-	-	-	-	-
İ7	-	-	-	-	-	-	-
İ8	-	-	-	-	8,3	-	-
İ9	-	-	-	-	-	-	-
İ10	-	-	-	-	-	-	-
İ11	-	-	-	-	-	-	-
İ12	-	-	-	28,5	-	-	-
İ13	-	-	-	-	60	-	-
İ14	-	-	-	-	-	-	-
İ15	-	-	-	-	-	-	-
İ16	-	-	-	-	-	-	-
İ17	-	-	-	-	-	-	-
İ18	-	-	-	-	-	-	-
İ19	-	-	-	-	-	-	-
İ20	-	-	-	-	-	-	-
İ21	-	-	-	-	-	-	-
İ22	-	-	-	-	-	-	-
İ23	-	-	-	-	-	-	-
İ24	-	-	-	-	-	-	-
İ25	-	-	-	-	-	-	-
İ26	-	-	-	-	-	-	-
İ27	-	-	-	-	-	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, İ: İzmir, - : Tespit edilmedi.

Çizelge 3.8.4. Manisa ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
Mn1	-	-	-	-	-	-	-
Mn2	-	-	-	-	-	14,30	-
Mn3	-	-	-	-	-	-	-
Mn4	-	-	-	-	-	-	-
Mn5	-	-	-	-	-	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, Mn: Manisa:, - : Tespit edilmedi.

Çizelge 3.8.5. Kütahya ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
K1	-	-	-	-	100	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	20	-
K4	-	-	-	-	9901	-	-
K5	-	-	-	-	8670	-	-
K6	-	-	-	-	6930	-	-
K7	-	-	-	-	2686	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, K: Kütahya, - : Tespit edilmedi.

Çizelge 3.8.6. Aydın ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g)

Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	16,7	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	-	-	-	-
A7	-	-	-	-	-	-	-
A8	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	-	-	-	-	-	-

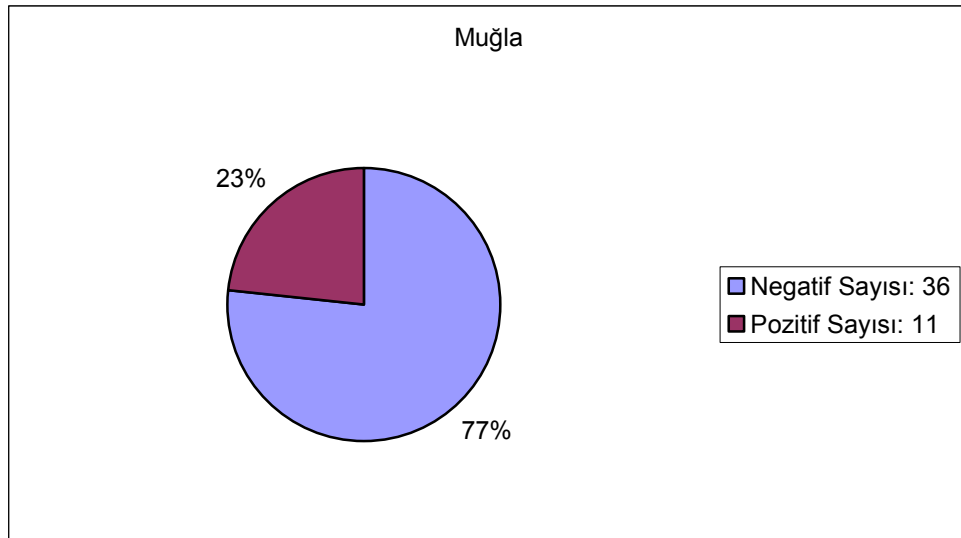
SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, A: Aydın, - : Tespit edilmedi.

Çizelge 3.8.7. Denizli ili örneklerinin analiz sonuçları (ng/g).

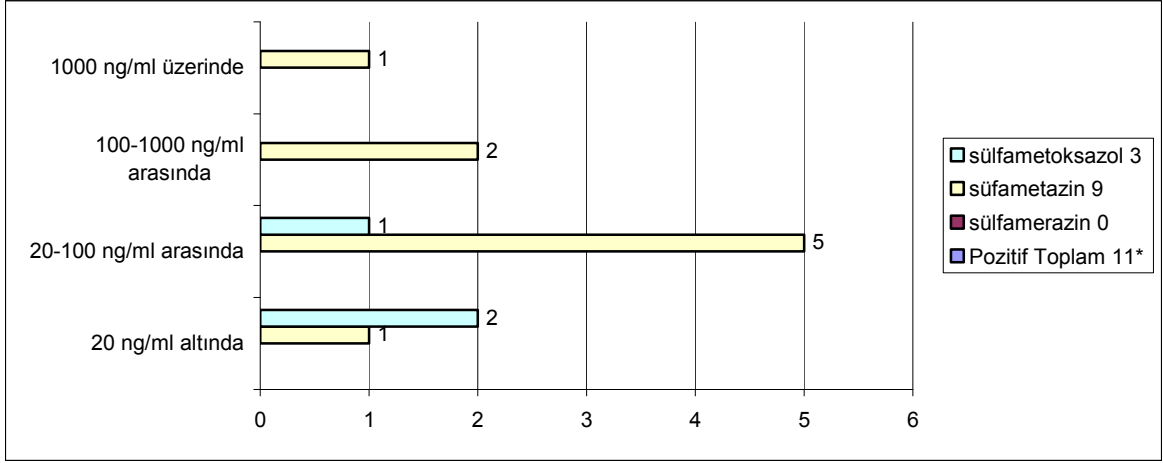
Örnekler	SA	SD	ST	SMR	SMT	SMX	SDX
D1	-	-	-	-	49,12	-	-
D2	-	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	-	-	-
D4	-	-	-	-	-	-	-
D5	-	-	-	-	-	-	-
D6	-	-	-	-	-	-	-

SA: Sulfonilamid, SD: Sülfadiazin, ST: Sülfatiazol, SMR:Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sulfometoksazol, SDX: Sülfadimetoksin, D: Denizli, - : Tespit edilmedi.

Ege bölgesi Muğla ilinde toplanan ballarda 47 örnekten 11 tanesinde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir (Şekil 3.8.1.). 11 Pozitif örneğin sekiz tanesinde sülfametazin, iki tanesinde sülfametoksazol, bir tanesinde ise sülfametoksazol ve sülfametazin kalıntısı belirlenmiştir. (Şekil 3.8.2.). 9,2 ile 1501 ng/g aralığında miktarlar ölçülmüştür.



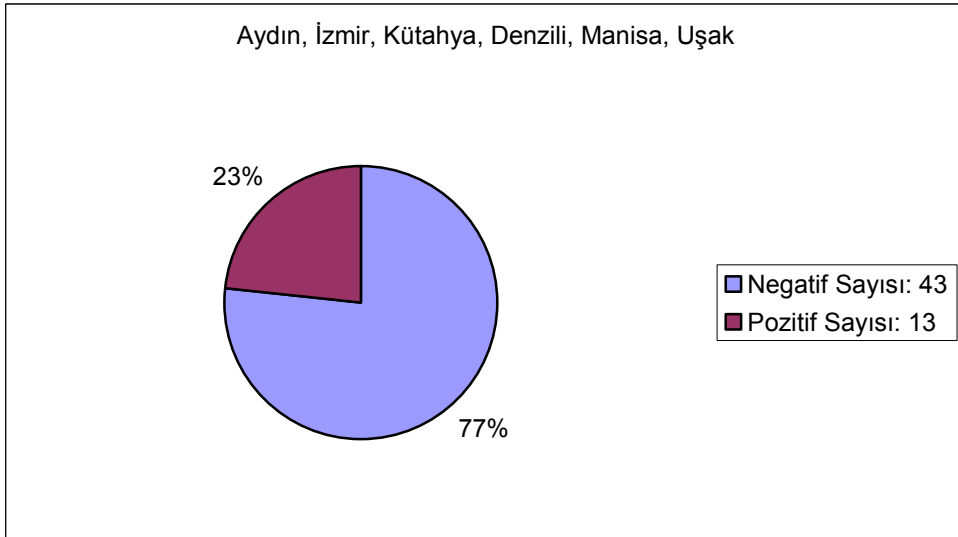
Şekil 3.8.1. Muğla ili pozitif örnek oranı.



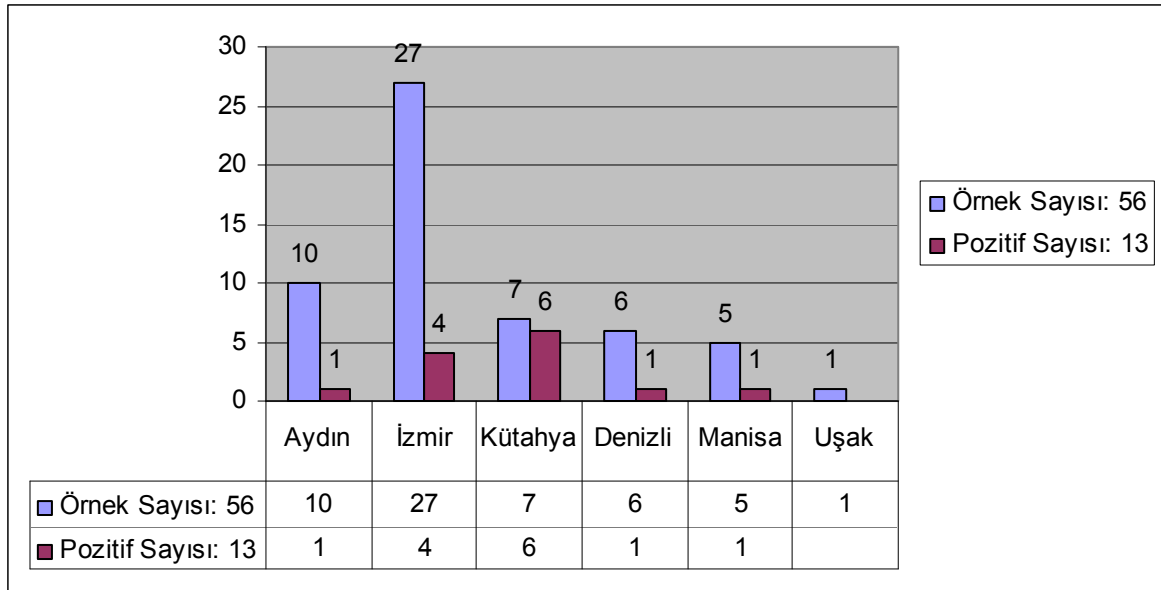
Şekil 3.8.2. Muğla ili örneklerindeki kalıntıların ölçülen miktarlarının dağılımı.

* : Örneklerin bir tanesinde sülfaetoksazol ve sülfaetazin kalıntısı birlikte tespit edilmiştir.

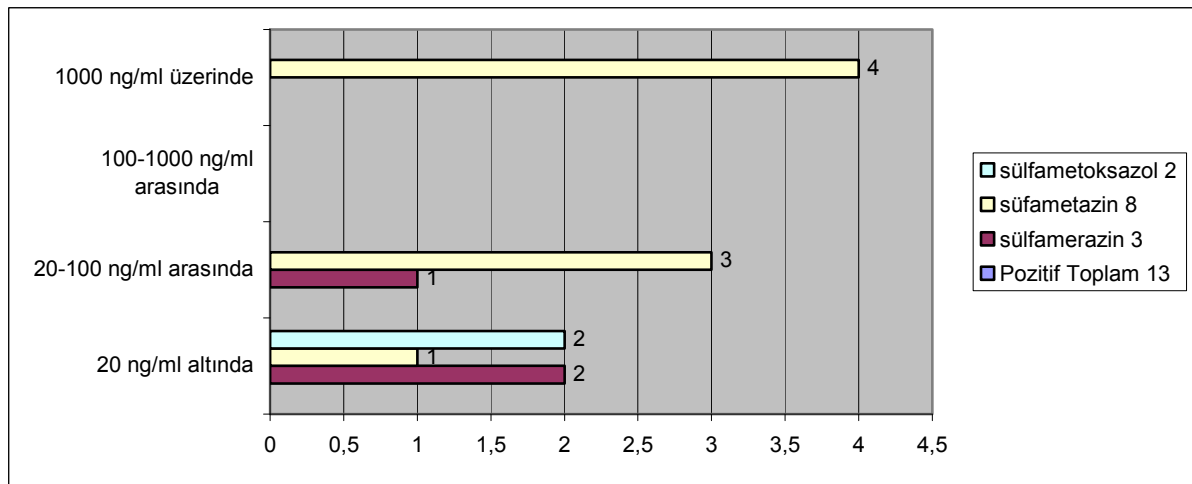
Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illerinden toplanan ballarda 56 örnekten 13 tanesinde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir (Şekil 3.8.3, Şekil 3.8.4.). Pozitif örneklerden üç tanesinde sülfamerazin, sekiz tanesinde sülfaetazin, iki tanesinde ise sülfaetoksazol kalıntısı belirlenmiştir. 8,3 ile 9901 ng/g aralığında miktarlar ölçülmüştür (Şekil 3.8.5.).



Şekil 3.8.3. Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illeri pozitif örnek oranı.

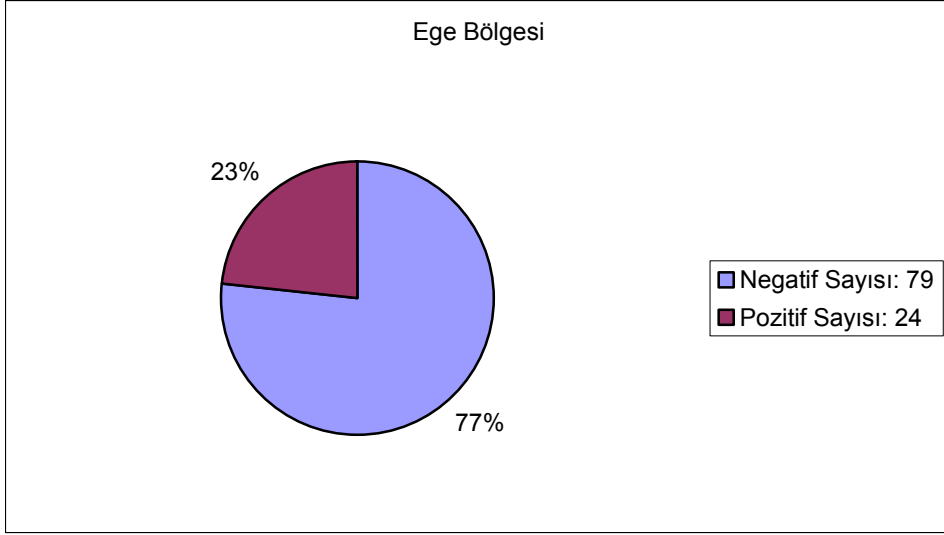


Şekil 3.8.4. Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illeri pozitif örnek sayısı.

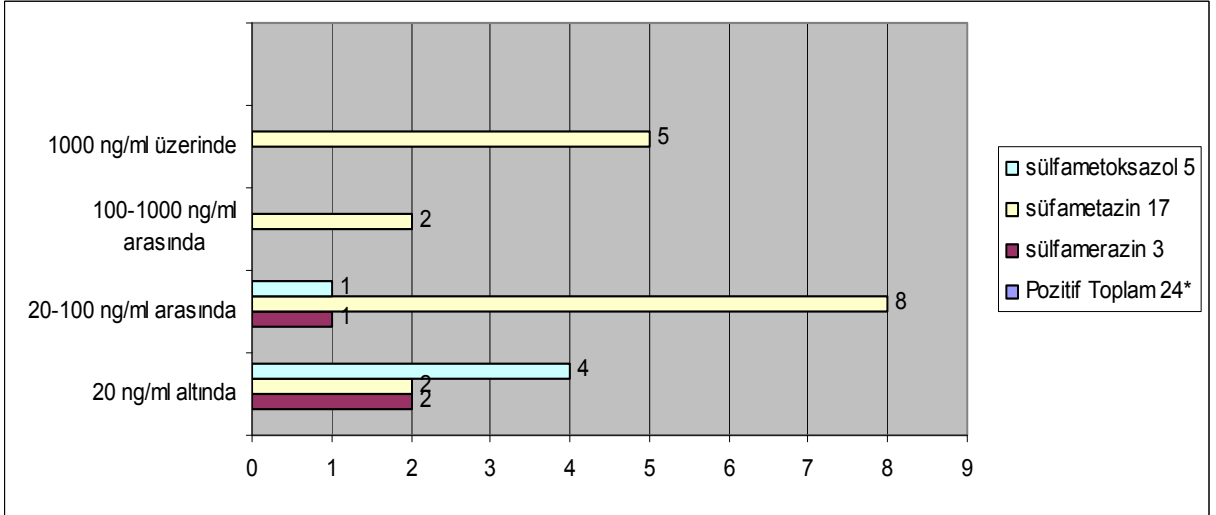


Şekil 3.8.5. Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak örneklerinin kalıntılarının ölçülen miktarlarının dağılımı.

Muğla ili ile Aydın, İzmir, Kütahya, Denizli, Manisa ve Uşak illerinden olmak üzere iki bölgeden toplanan ballardaki pozitiflik oranının ikisinde de % 23 olması dikkat çekicidir. Ege bölgesi yekün olarak değerlendirildiğinde ise toplanan ballarda 103 örneğin 24'ünde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir (Şekil 3.8.6.). Analiz edilen örneklerin üç tanesinde sülfamerazin, 17 tanesinde sülfametazin, beş tanesinde sülfametoksazol tespit edilmiştir (Şekil 3.8.7). Örneklerin bir tanesinde sülfametazin ve sülfametoksazol birlikte tespit edilmiştir. Sülfonamid kalıntısına sebep olan bileşiklerin oransal dağılımı Şekil 3.8.8.'de verilmiştir. Pozitif örneklerin ölçülen miktarları ise 9,2 ile 9901 ng/g aralığında değişiklik göstermiştir (Çizelge 3.8.8., Şekil 3.8.9.).

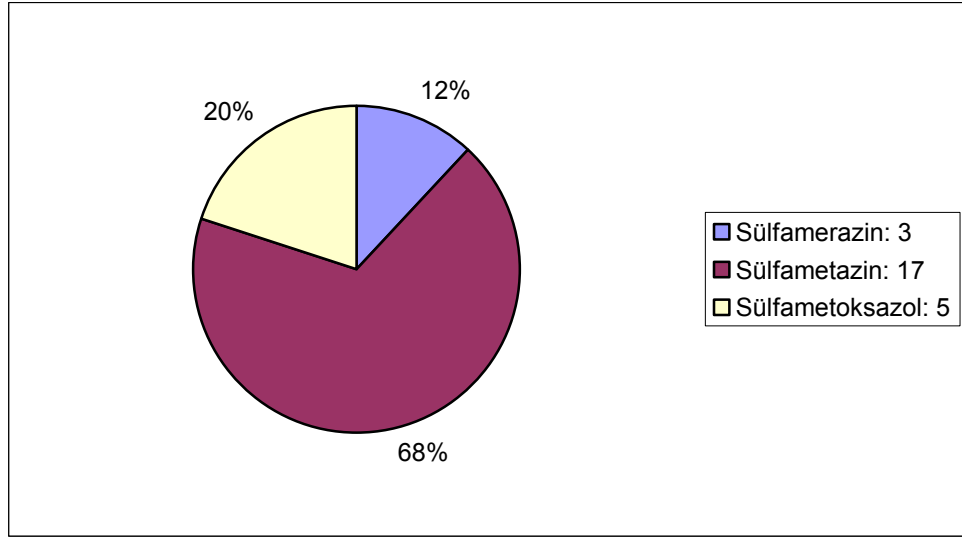


Şekil 3.8.6. Ege bölgesi pozitif örnek oranı.



Şekil 3.8.7. Ege bölgesi örneklerindeki kalıntıların ölçülen miktarlarının dağılımı.

* : Örneklerin bir tanesinde sulfametoksazol ve sulfametazin kalıntısı birlikte tespit edilmiştir.

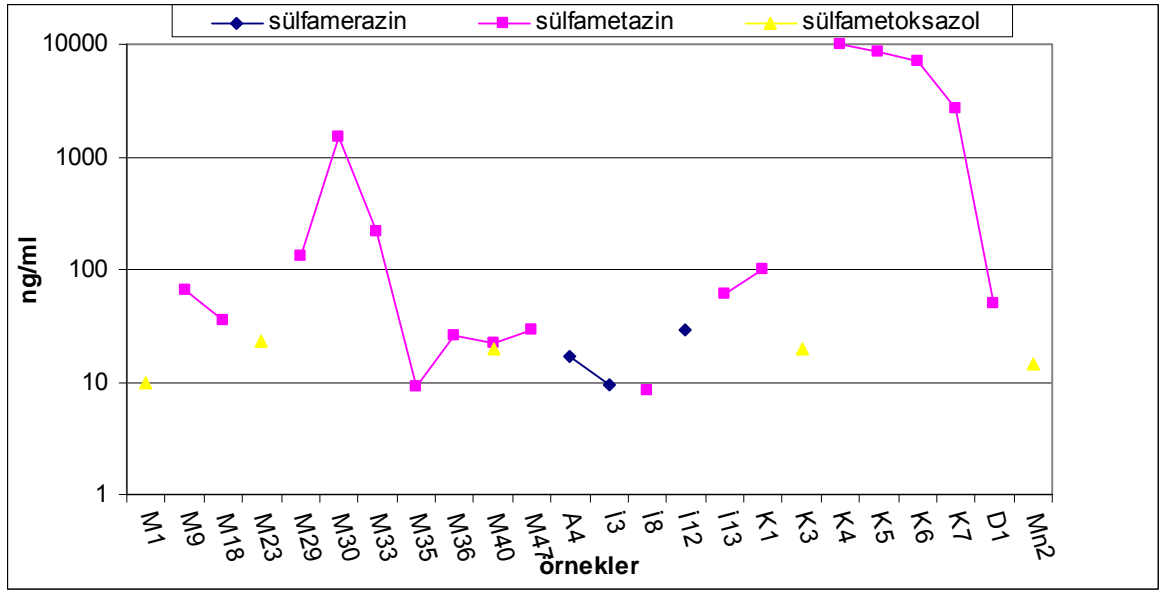


Şekil 3.8.8. Sülfonamid kalıntısına sebep olan bileşiklerin oransal dağılımı.

Çizelge 3.8.8. Ege bölgesi pozitif örneklerinin ölçülen miktarları.

Örnekler	SMR	SMT	SMX
M1	-	-	9,94
M9	-	65,85	-
M18	-	34,88	-
M23	-	-	22,56
M29	-	133	-
M30	-	1501	-
M33	-	213	-
M35	-	9,2	-
M36	-	25,39	-
M40	-	21,96	19,99
M47	-	28,69	-
A4	16,7	-	-
İ3	9,43	-	-
İ8	-	8,3	-
İ12	28,5	-	-
İ13	-	60	-
K1	-	100	-
K3	-	-	20
K4	-	9901	-
K5	-	8670	-
K6	-	6930	-
K7	-	2686	-
D1	-	49,12	-
Mn2	-	-	14,3

SMR: Sülfamerazin, SMT: Sülfametazin, SMX: Sülfametoksazol, M: Muğla, A: Aydın, İ: İzmir, K: Kütahya, D: Denizli, Mn: Manisa, - : Tespit edilmedi.



Şekil 3.8.9. Pozitif bileşiklerin ölçülen miktarlarının grafiksel dağılımı.
(M:Muğla, A: Aydın, İ: İzmir, K: Kütahya, D: Denizli, Mn: Manisa.)

4. TARTIŞMA

Günümüzde Veteriner ilaçların kullanılma zorunluluklarıyla birlikte bilinçsizce uygulanmaları, aynı zamanda besinlerin veteriner ilaç kalıntıları ile kirlenme riskini arttırmış, dolayısı ile tüketicilerde tedirginlik oluşturan; hafif bir alerjiden, ölüme kadar değişen şiddetlerde zehirlenmelere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere, üreme bozukluklarına, teratojenik, mutajenik, karsinojenik etkilere ve dirençli suşların ortaya çıkması ile ilaçların sağaltıcı etkilerinin azalması gibi olumsuzluklara sebebiyet verebileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerden ötürü son yıllarda hayvan yetiştiriciliği ve arıcılıkta ilaç kullanımı konusunda Dünya Sağlık Örgütü, Gıda ve Tarım Örgütü, Avrupa Birliği İlaç Değerlendirme ve Danışma Merkezi, Avrupa Birliği Veteriner İlaç Komitesi, Amerika'daki Besin ve İlaç İdaresi, ülkemizde Tarım Bakanlığı gibi kuruluşlar tarafından olumsuzlukların önlenmesi amacıyla, bir yandan veteriner ilaçların kullanımı alanında etkin bir kontrolü sağlamayı hedeflerken, bir yandan da tüm ülkelerde aynı konularda sürdürülen çalışmalar arasında uyumun sağlanmasını hedefleyen düzenlemeler getirilmeye başlanmıştır (Kaya ve ark.2002a, Milani 2001, Ellis 2001, Piro ve Mutinelli 2003).

Avrupa'da, kalıntılarında arındırılmış ve saf olarak nitelendirilmiş balların üretimi ile ilgili olarak üzerinde hassasiyet gösterilen kalıntı çalışmaları başlamıştır. Başlangıçta dikkatler çevre kirlenmesine (ağır metaller) ve tarımda pestisit kullanıma yöneltilmiştir. Sonradan Avrupa'daki şiddetli varroasis krizleri tekrarlanan ilaç uygulamalarında varrosit ürünlerinin kalıntılarının kontrol altında tutulmasını gözler önüne çıkarmıştır. Çok yakın zamanlarda ise tüketici ve arıcıların ilgilerindeki sapmalar antibakteriyel ve sulfonamid kalıntılarının varlığını ortaya çıkarmıştır (Piro ve Mutinelli 2003).

Sulfonamid kalıntılarının tespiti amacıyla yapılan bu çalışmada üretim miktarlarına paralel olarak, Muğla 60, Aydın 17, İzmir 11, Denizli 5, Manisa 3, Afyon 2, Kütahya ve Uşak'tan ise 1'er adet numune alınması hedeflenmiştir (Çizelge 2.1.1.). Ancak Muğla 47,

İzmir 27, Aydın 10 Kütahya 7, Denizli 6, Manisa 5, Uşak'tan ise 1 adet numune toplanabilmiştir. Bu örneklerden 42 tanesi üreticilerden yerinde toplanmış, diğerleri ise, Bornova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Toksikoloji laboratuvarına gelen örneklerden analiz yapılmıştır. Hedeflenen örnek dağılımı sağlanamamıştır. Hedeflenen illerde örnek dağılımındaki sayıya ulaşılmasının nedeni, arılarda bu sene gelişen ölüm vakalarının artması neticesinde bal üretiminin düşmesi ve bazı arı yetiştiricilerinin bal vermek istememesidir. Ancak 100 olarak hedeflenen analiz adedi 103 örnek miktarına ulaşmıştır.

Sheth ve ark. (1990) ballarda sülfatiazolun şekerlerle olan reaksiyonundan bahsederek sülfonamid kalıntı analizlerinde konunun önemine dikkatleri çekmişlerdir. Zaman içerisinde şekerin sülfonamid gruplarıyla bağlandığını fakat sülfonamidin zaman içerisinde yok olmadığını belirtmişlerdir. Asidifikasyonla şekerden ayrılabilceğini ifade etmişlerdir. Daha sonra Schwaiger ve Schuch (2000), sülfonamid kalıntılarının analitik yöntemlerle tespiti için mutlaka asit hidrolizasyon aşaması gerektiğini belirtmişlerdir. Maudens ve ark. (2004) sülfonamid kalıntılarının tespitinde süregelen yıllarda ELISA, Charm II, GC MS, HPLC gibi birçok analitik yöntemin kullanılırken; bazı yöntemlerin özütlemelerinde asidik hidroliz aşamasının kullanılmadığına dikkati çekmişlerdir.. Bu durumun dikkate alınmaması halinde gerçek kontaminasyonun fark edilememesi ve mide asidinde sülfonamidlerin serbest hale gelerek tüketicilerin maruz kalabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız yöntemin özütlemesinde asidik hidrolizasyon aşaması % 10'luk triklor asetik asit ile ultrasonik banyoda 65°C'de 1 saat olmak üzere yapılmıştır.

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği çalışmada yedi adet sülfonamid için geri alım ortalama değeri 10 ng/g, 15 ng/g ve 20 ng/g seviyelerinde yüklemelerde % 51,5±3,34-71,8±4,27 aralığında bulunmuştur. Gün içi tekrar edilebilirlik ve kesinlik çalışmada % standart sapma (RSD) % 0,85-6,03 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik (tekrar üretilebilirlik) ve kesinlik çalışmada ise, % standart sapma (RSD) % 4,17-10,04 aralığı olarak hesaplanmıştır. Akdağ (2006), Arlington (1993)'ün derişime bağı kesinlikte % standart sapmayı (RSD) en fazla %30 ve derişime bağı geri alım oranını ise % 40-120 aralığında kriter olarak belirttiğini ifade etmiştir. 2002/657 AB yönetmeliğinde ise tekrar üretilebilirlik % standart sapma (RSD) değer kriteri en fazla % 23 olarak verilmiştir. Bu yönetmelikte antibiyotikler için, floresans verme yada türevlendirmeye bu özelliğı kazanabilme koşuluyla, floresan detektörle tespitinin doğrulama

yöntemi olarak kullanılabilceği belirtilmiştir. Çalışmamızın asgari şartlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

İngiltere’de, ithal edilen ballarda 2002 yılında 105 adet örnekte sülfonamid kalıntılarının analizinde 44 ng/ml ve 11000 ng/ml düzeyinde 2 adet pozitif numune bulunması (Anonim, 2007d), Fransa’da yapılan 148 adet balın sülfonamid kalıntılarının analizinde 10 ng/ml ile 6127 ng/ml arasında değişen düzeylerde 19 adet numunenin pozitif olarak bulunması (Martel ve Zeggane, 2003), Belçika’da 2000-2002 yıllarında ülkesel programda 72 adet balın sülfonamid kalıntı analizlerinde 3 adet pozitif numune tespit edilmesi, ithal edilen 98 numunenin ise 31’inin pozitif olduğu belirtilmesi (Reybroeck, 2003), arı yetiştiriciliğinde sülfonamidlerin yasadışı kullanımıyla ilgili olarak bu çalışmanın sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Kaufman ve Kaenzig (2004) İsviçre’de yapılan sülfonamid kalıntı analizinde 8000 ng/ml civarı sülfatiazol kalıntısı bulunduğunu belirtmişlerdir. Sülfatiazolün de sülfametazin gibi yoğun olarak tespit edilebilmesi önemlidir. Yurtdışındaki çalışmalarda sülfatiazolün tespit edilmesi dikkatleri çekmektedir. Ülkemizde ve çalışmamızda çoğunlukla sülfametazinin tespit edilmesi farklılık göstermektedir. Bu durum ülkemizde arı yetiştiricilerinin bu etken maddeye kolay ulaşması ve uygulama kolaylığıyla birlikte alışkanlık göstergesi olarak düşünülebilir. Ülkemizdeki kimyasal kullanımındaki benzer alışkanlık naftalinde de görülmüştür.

2003-2006 yıllarında Ege Üniversitesi İlaç Araştırma Laboratuvarı’nda 403 balda yapılan sülfonamidler yönünden yapılan kalıntı analizlerinde, sülfonamid kalıntısına sebep olan bileşiklerin dağılımı sırasıyla; % 65, 25, 4, 2, 2, 1, 1 oranında sülfametazin, sülfametazol, sülfametoksipirazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametoksazol, süfadiyazin yönünden pozitif numunelere rastlanılması (Üzümcü, 2007), Ege bölgesindeki bu çalışmada sülfametazinin % 68 oranında bulunmasıyla benzerlik göstermektedir. Bu oran, aynı zamanda Ege bölgesi arı yetiştiricilerinin yaygın sülfametazin kullanımı eğiliminin göstergesidir.

2006 yılında yapılan bir çalışmada sülfametazin, sülfaguanidin, sülfanilamid, sülfasetamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamepridazin, sülfadoksin, sülfametoksazol, sülfadimetoksin ve sülfakinoksolon da dahil 1714 adet numunenin % 25’inde sülfonamid kalıntılarında sadece sülfametazin tespit edilmesi (Sunay, 2006), çalışmamızda bulunan %23 pozitiflik oranı ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada Ege bölgesi ballarında tespit edilen sülfonamid kalıntılarının ölçülen miktarlarının dağılımında, süfametazinin 8,3-9901 ng/g aralığının fazla olduğu görülmektedir. Bu aralığın geniş olması, yasadışı kullanımın yanı sıra bileşiğin uygulanması ile hasat arasındaki zamanı, değişen dozlarda kullanılması ile bağlantılı olabileceği ve bilinçsiz ilaç uygulamasının göstergesi şeklinde değerlendirilebilir. Yapılan anketlerde de erken ilkbaharda ve geç sonbaharda arı larvalarının olmadığı dönemlerde başlayan ilaçlamaların arı bal uçuşuna geçtiği dönemden altı haftaya kadar devam ettiği bilgileri alınmıştır. Hastalık durumunda ise zaman gözetmeksizin ilaç uygulamasının yapılabildiği bazı arı yetiştiricileri tarafından ifade edilmiştir.

Sülfametoksazol ile sülfamerazin dağılımının sırasıyla 9,43-28,5 ng/g, 9,94-22,56 ng/g aralığında süfametazin kadar geniş olmaması, bu bileşiklerin başka bileşiklerin metaboliti olarak kontaminasyon sonucu ortaya çıkması, yada aynı zamanlarda benzer dozlarda kullanılan ilaçların göstergesi olma ihtimali değerlendirilebilir (Çizelge 3.8.8., Şekil 3.8.9.). Kaufman ve Kaenzig (2004) İsviçre’de yapılan tarama analizlerinde 350 örneğin 16’sında tespit edilen sülfanilamide değinmişlerdir. Bu örneklerin LC MS MS ile analizinde Asulam adlı herbisit ile birlikte bulunduğunu, bu sülfanilamidlerin Asulam’ın degradasyonu sonucu oluştuğunu belirtmişlerdir.

Gıdalarda azami kalıntı seviyeleri belirlenirken, etkisiz miktar, güven faktörü, kabul edilebilir günlük alım miktarı, tüketilen gıda miktarı ve canlı ağırlık dikkate alınmaktadır. Bir ilaç veya maddenin etkisiz miktarı uyarı eşik değeri altındaki miktarı, başka bir ifadeyle memelilerde zararlı etkilere yol açmayan, fizyolojik veya biyokimyasal olayların hızını ve seyrini etkilemeyen, gelişme hızında, organ ya da doku ağırlıklarında değişikliklere yol açmayan, hücrelerde enzimatik etkinlik ve yapısal bozukluklara sebep olmayan miktarını ifade eder. En az 2 memeli hayvanda yapılan yedirme ve deneme sonuçlarına göre bulunur. Güven faktörü, Dünya Sağlık Örgütü ve Gıda Tarım Örgütü zehir bilgisi uzmanları tarafından teratojenik ve karsinojenik etkisi bulunmayan bileşikler için 100, teratojenik bileşikler için 1000, ihmal edilebilir tolerans dikkate alındığında ise 2000 olarak kabul ettiği ifade edilmektedir. Kabul edilebilir günlük alım miktarı, yaşam boyunca ve günlük olarak hiçbir olumsuz etkisi olmaksızın alınacak miktarı ifade ettiği belirtilmektedir. Bileşikler için toksikolojik kabul edilebilir miktar olarak tanımlanan bu terime, antibiyotikler için ilaveten mikrobiyolojik kabul edilebilir günlük alım miktarı teriminin bulunduğu ifade edilmektedir (Kaya ve ark.2002b, Piro ve Mutinelli 2003).

Kabul edilebilir günlük alım miktarı, etkisiz miktar, gıdaların tüketim miktarları ve canlı ağırlık dikkate alınarak yapılan çalışmalarla tüm sülfonamidler için azami kalıntı seviyesi et, süt, karaciğer, böbrekte 100 ng/g olarak belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, yumurtada sülfametazinin yumurtaya fazla miktarda geçmesi sebebiyle yumurtacı tavuklarda kullanılması uygun görülmediği ve azami kalıntı seviyesi belirlenmediği belirtilmiştir. Benzer şekilde ballarda da Avrupa Birliği İlaç Komisyonu tarafından azami kalıntı seviyesi belirlenmemiştir. (Kaya ve ark.2002b, Piro ve Mutinelli 2003). Arılarda, hayvanlardaki gibi antibiyotiğin metabolize olarak ıtrahı olmaması ve çalışmamız sonuçlarında ölçülen 9901 ng/ml miktarındaki sülfametazin kalıntısı alınan bu kararı destekler niteliktedir.

Dünya Kanser Ajansı'nda grup 3'de yer alan bazı sülfonamidlerin fare ve sıçanlarda özellikle tiroid bezinde büyüme ve tümör sıklığında artışa sebep olduğu belirtilmektedir (Anonim 2007g, Kaya ve ark 2002). Benzeri etkilerin insanlarda oluşturabileceği dikkate alındığında, bunun yanında alerjik reaksiyonlarında görülebileceği değerlendirildiğinde bulunan sonuçların halk sağlığı açısından tedirginlik yaratabilecek düzeylerde olduğu açıktır.

5. SONUÇ

Çalışmada Ege bölgesi illerindeki ballarda sülfonamid kalıntılarının incelenmesi HPLC flöresan detektör ile kolon sonrası türevlendirme yöntemiyle yapılmıştır.

Bu yöntemle Ege bölgesinden toplanan 103 bal örneğinin % 23'ünde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin % 68'inin sülfametazin, % 12'sinin sülfamerazin, % 20'sinin sülfametoksazol kalıntılarında olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde arı yetiştiriciliğinde bilinçsiz veya yasadışı sülfonamid kullanımının olduğu açıktır. Bu sorunun giderilmesi için kontrol önlemlerinin yanında AB veterinerlik müktesebatına uyum kapsamında ülkemize adapte edilmeye çalışılan AB yasalarının yayım çalışmalarının daha etkin yapılması önemlidir. Mevzuatlarda yer alan veteriner ilaç satışının kontrol altına alınması, kayıtlarının tutulması yanlış uygulamaların tespitinde yaptırımların uygulanmaya başlaması aksaklıkların önüne geçilmesinde faydalı olacağı değerlendirilmektedir. Kalıntı çalışmalarının ve mevzuatının ülkemizde 8-10 yıllık bir süreçte uygulanmaya başladığı düşünülürse kamuoyunun ve arı yetiştiricilerinin hatta veteriner hekimlerin konu hakkında yeterince bilgi sahibi olmadığı kanısına varılabilir. Bu bağlamda arı yetiştiricilerinin ve veteriner hekimlerin eğitim çalışmalarının hızlandırılması halk sağlığını tehdit eden kalıntıların önlenmesine büyük katkı sağlayacaktır.

Ülkemiz arı yetiştiriciliği gözden geçirildiğinde, veteriner hekimlerin arı yetiştiriciliğinde profilakside, hastalıkların teşhis ve sağaltımında yeterince yer almadığı görülmektedir. Veteriner hekimlerin ve arı yetiştiricilerinin ekonomik kaygıları bu durumun oluşmasındaki önemli nedenlerdendir. Veteriner hekimlerin arı yetiştiriciliğinde aktif rol almasını sağlayabilecek bir sistemin oluşturulması sorunun çözümünü kolaylaştıracaktır. Bu kapsamda veteriner hekim arı yetiştiricileri organizasyonlu teşviklerin oluşturulması fayda sağlayabilir. Bu tür uygulamaların en azından geçiş dönemi süresince uygulanması sorunların çözümüne katkı sağlayabilir.

Bununla birlikte arı yetiştiriciliği ile ilgili AB projelerin oluşturulmasıyla AB'den kaynak girdisi sağlanabileceği de düşünülmelidir. 2006 yılında AB birliğinden projelerle ilgili olarak aktarılan bütçenin büyük bölümünün proje üretilmemesi nedeniyle geri döndüğü bilinmektedir. Seçilebilecek bir pilot bölgede zootechnistlerle birlikte veteriner hekimlerin yer alacağı arı yetiştiriciliği eğitimi, hastalıkların kontrolü ve balların kalitelerinin incelenmesiyle, ihracatçı birliklerinin de yer alacağı bir proje üretilmesi fayda sağlayacaktır. Ekonomik kalkınma, eğitim ve gıda güvenliğine önem veren AB'nin, bahse konu benzer projeler üretilmesi durumunda kalkınma, eğitim ve gıda güvenliğini içereceğinden bu konuyla ilgili çalışmalarda destek verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Arı hastalılarında antibakteriyellere alternatif ilaçların ve biyoteknik sağaltım yöntemlerinin kullanılmasıyla ilgili projelerin yapılmasının gereği de gözden geçirilmelidir.

Sonuç olarak ülkemizde, arı yetiştiriciliğinde sülfonamidler yasadışı olarak bilinçli yada bilinçsiz kullanıldığı gerçeği benzer ilaçlarında kullanım olasılıklarını ortaya koymaktadır. Dünya sağlık örgütü ve AB'nin de kalıntı konularını halksağlığı açısından önemle izlediğini göz önünde bulundurulduğunda ve ülkemizde konuya daha fazla önem verilerek, denetimlerin sıklaştırılması gerekmektedir.

ÖZET

Ege Bölgesinde Tüketime Sunulan Ballarda Sülfonamid Kalıntılarının Araştırılması

Avrupa Birliği düzenlemelerine göre antimikrobiyel ajanlar için ‘azami kalıntı seviyesi (AKS)’ belirlenmemiş olup, bal üretimi yapılırken antibiyotik kullanılmasına müsaade edilmemektedir. Ülkemizde sülfonamid grubu antibiyotikler bal üreticileri tarafından illegal olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Ege Bölgesi’nde tüketime sunulan balların sülfonamid grubu antibiyotik kalıntıları yönünden araştırılmasıdır. Bu amaçla, üretim miktarları göz önünde tutularak bölge illerinden toplam 103 adet bal örneği toplanmıştır. Bu örnekler, metot geliştirme ve validasyonu takiben sıvı-sıvı faz yöntemi ile özütleme sonrası Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazında, florasan detektör aracılığında, kolon sonrası türevlendirme metodu ile 7 sülfonamid türevi (sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol ve sülfadimetoksin) yönünden analiz edilmişlerdir.

Yöntemde, sülfanilamid, sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfametoksazol sülfadimetoksinin sırasıyla; ortalama % geri alımları; 62,37, 64,10, 62,57, 67,11, 66,94, 57,31, 53,99, % standart sapmaları (RSD); 8,01, 7,02, 6,83, 6,57, 7,57, 7,06, 7,88, değerlendirme seviyeleri; 6,83, 5,36, 5,51, 6,67, 7,34, 5,02, 6,73 ng/g olarak hesaplanmıştır. Ege bölgesinden toplanan 103 balın % 23’ünde sülfonamid kalıntısı tespit edilmiş olup, pozitif örneklerin % 68’inin sülfametazin, % 12’sinin sülfamerazin, ve % 20’sinin de sülfametoksazol ile kontamine olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, toplanan bal örneklerinde yaygın olarak sülfonamid kalıntılarında rastlanmıştır olup Ege Bölgesi arı yetiştiricilerinin yasadışı olarak bu ilaçları kullandıkları anlaşılmaktadır. Bu sorunu önlemek için yetiştiricilerin eğitilmesi, denetimlerin artırılması ve caydırıcı cezai işlemlerin yürürlüğe sokulması fayda sağlayabileceği gibi toplum sağlığı korunacak ve ülke ekonomisine de katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler; HPLC-FLD, sülfonamid, kalıntı, bal.

SUMMARY

Investigation of Sulphonamide Residues within Honey Consumed in Aegean Region

Following The European legislation Maximum Residue Limits are fixes for anti-infectious agents in honey and therefore the use of antibiotics is not acceptable in apiculture. It is already known that the illegal use of “sulphonamid group antibiotics” is common in beekeeping in Turkey.

The aim of this study was to investigate the sulphonamide residues within honey consumed in the Aegean region. For this purpose, total 103 honey samples were collected from 7 cites of the Aegean region considering with the production of honey. Following method development and validation, the samples were extracted with liquid-liquid phase extraction procedure and then analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with post-column derivatization for the selected sulphonamides (sulphonilamide, sulphadiazine, sulphathiazole, sulphamerazine, sulphamethazine, sulphametoxazole, sulphadimetoxine).

The mean recoveries (%) were $62,37 \pm 8,01$, $64,10 \pm 7,02$, $62,57 \pm 6,83$, $67,11 \pm 6,57$, $66,94 \pm 7,57$, $57,31 \pm 7,06$, $53,99 \pm 7,88$ and the limit of quantifications were 6,83, 5,36, 5,51, 6,67, 7,34, 5,02, 6,73 ng/g for sulphonilamide, sulphadiazine, sulphathiazole, sulphamerazine, sulphamethazine, sulphametoxazole, sulphadimetoxine, respectively. According to the results, sulphonamide residues were detected in 23% of the total 103 honey samples collected in Aegean Region. The residues detected were 68% sulphamethazine, 12% sulphamerazine, 20% sulfametoksazole in positive honey samples.

In conclusion, the presence of the sulphonamide residues was high in honey samples collected in the present study. This shows that the beekeepers in Aegean Region probably use sulphonamids commonly for prophylaxis or treatment of bacterial bee diseases. To prevent this problem, the training of beekeepers, controlling of drug use and application of punishment may be useful and therefore these may contribute to the protection of public health and the economy as well.

Key Words; HPLC-FLD, sulphonamide, residue, honey.

KAYNAKLAR

Adıbeş M (1993) *Arı ve balın Varroa mücadelesinde kullanılan malatyon ile kontaminasyonu*, Hay. Aş. Kont. Mrk. Müd. Derg. 17(31): 105-114.

Akdağ İ (2006) *Metot validasyonu ve kimyasal analizlerde belirsizlik hesaplamaları eğitim notları*, sayfa 44.

Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE (1999) *Comparative study of tylosin, erythromycin ve oxytetracycline to control American foulbrood of honey bees*, Journal of Apicultural Research 38 (3-4): 149-158.

Anonim (2002) *Sulphonamides* Erişim:[<http://www.pickeringlabs.de/englisch/pickering/technik/pickframes.htm>] Erişim tarihi:03.09.2002

Anonim (2004) *The results and evaluation for 2003 in the residue monitoring program implemented for the live animals and primary animal products in Turkey*, Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Protection and Control. Akay Cad. No: 3 06100 Bakanlıklar Ankara-TURKEY.

Anonim (2005a) *Türk Gıda Kodeksi, Bal Tebliği (Tebliğ No:2005/49)* 17 Aralık 2005 ve 26026 sayılı Resmi gazete.

Anonim (2005b) Erişim: [<http://www.ordutb.org.tr/dokumanlar/ARICILIK.doc>.] Erişim tarihi: 10.09.2005.

Anonim (2005c) *Ruhsatlı arı ürünleri* Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü İlaçlandırma Ruhsatlandırma Daire Başkanlığı Dr. Selçuk PEKKAYA kişisel görüşme.

Anonim (2005d) [<http://maarec.cas.psu.edu/maarecresource/MAARECManual2.htm>] Erişim tarihi: 11.10.2005.

Anonim (2005e) Erişim: [<http://www.fao.org/docrep/x0083e/X0083E08.htm>] Erişim tarihi: 22.10.2006.

Anonim (2005f) *Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemler*, Resmi gazete 19 Ocak 2005 tarih ve 25705 sayı.

- Anonim** (2006a) Erişim: [<http://www.goodfoodproject.org>], Erişim tarihi: 10.08.2006.
- Anonim** (2006b) *Diserens JM (2005) Honey contamination with antibiotic*, Erişim [<http://www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00563/index.html?lang=en>] Erişim tarihi :23.12.2006.
- Anonim** (2007a) Erişim: [<http://www.beevenom.com/ApitherOrganizations.htm>], Erişim tarihi: 11.12.2007.
- Anonim** (2007b). *Botanicals for mite control* Erişim: [<http://www.honeycouncil.ca/users/folder.asp?folderID=5214>] Erişim tarihi: 11.12.2007.
- Anonim** (2007c) Erişim [<http://www.kkgm.gov.tr>] Erişim tarihi: 10.12.2007.
- Anonim** (2007d) *Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in Food in the UK, 2002* Erişim: [<http://www.noah.co.uk/papers/vrcresrep02.pdf>] Erişim tarihi: 10.12.2007.
- Anonim** (2007e) 2006 arıcılık verileri, Devlet İstatistik Enstitüsü.
- Anonim** (2007f) Erişim: [www.aof.edu.tr/kitap/IOLTP/2294/unite03.pdf] Erişim tarihi: 11.12.2007.
- Anonim** (2007g) *Sulphonamides* Erişim: [<http://www.apvma.gov.au/chemrev/downloads/sulphonamides.pdfcc>] Erişim tarihi: 29.12.2007.
- Anonim**,(2005e)Erişim:[<http://maarec.cas.psu.edu/maarecresource/MAARECManual2.htm>] Erişim tarihi: 22.10.2005.
- Aydın L** (2001) *Arıcılıkta İlaç Kullanımı*, Uludağ Arıcılık Dergisi 1 (2) 32–34.
- Aydın L ve Girişgin O** (2003) *Arıcılıkta İlaç Kullanımı ve Avrupa Birliğine Uyum*, II. Marmara Arıcılık Kongresi Bildirileri Kitabı 28-30 Nisan 133-139.
- Bogdanov S, Kilchenmann V, and Imdorf A**, (1998) *Acaricide Residue in some Bee Products*, Journal of Apicultural Research 37: 57-67.
- Campbell LK** (1999) *Sulphonamides: Updates On Veterinary Medicine*, Veterinary Dermatology 10, 205-215.
- Cannavan A, Hewitt SA, Blanchflower WJ, and Kennedy D.G**, (1996) *Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Determination Of Sulfamethazine In Animal Tissues Using A Methyl/Trimethylsilyl Derivative*, Analyst, 121, 1457-1461.
- Chioveanu G, Ionescu DM, and Marderaca A**, (2004) *Control of Nosemosis-The Treatment With “Protofil”*, Apiacta 39, 31-38.
- Coffman RJ and Beran GW** (1999) *Use of drugs in food animals, Benefits and Risks. Committee on drug use in food animal*, Panel on animal health, Food Safety and PublicHealth. National academic press, Washington D.C, p 87.

- Çeliker S A** (2002) *TEAE-Bakış*, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, Sayı 1-9.
- Das YK** (2004) *Türkiye’de Üretilen Ballarda Bazı Organik Fosforlu ve Sentetik Piretroid İsektisit Kalıntılarının İncelenmesi*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Demirözü B** (2007) *Ulusal kalıntı izleme programı ve yasal zemini*, Antibiyotik kullanımı stratejileri ve kalıntıları sempozyumu, Bornova Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Diserens J.M, Savoy-Perroud MC** (2002) *Determination of sülfanamide residues in honey*. Ghent University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Held at Province of Antwerp House, BELGIUM. June 4-7, 2002, Poster No: W 46. (Nestle Research Center).
- Doğanay A** (1993) *Varroaosis*, Türk Veteriner Hekimleri Dergisi **5**(3): 34–35, 58–61.
- Eddy JJ and Gideonsen MD** (2005) *Topical honey for diabetic foot ulcers*, J Fam Pract. 54, 863.
- Efem SE, Udoh KT, and Iwara CI**, (1992) *The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance* Infection 20 (4) 227-229.
- Eguaras MJ, Fuselli S, Gende L, Fritz R, Ruffinengo SR, Clemente G, Gonzalez AC, Bailac PN, and Ponzi MI** (2005) *An in vitro evaluation of Tagetes minuta essential oil for the control of the honeybee pathogens Paenibacillus larvae ve Ascosphaera apis, and the parasitic mite Varroa destructor*, Journal of Essential Oil Research 17 (3): 336–340.
- Ellis M** (2001) *Chemical Control Of Varroa Mites, Mites of the Honey Bee*, Edited by Webster TC. Delaplane KS. Dadant Publication pp.179–204
- Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M and Wilson WT**, (2000) *Control of Varroa Jacobsini Oud. Resistant to fluvilanate and amitraz using kumafos*, Apidologie 31, 437–441.
- Erdoğdu AT** (2007) *Toksikoloji laboratuvarında yürütölen analiz çalışmaları*, Antibiyotik kullanımı stratejileri ve kalıntıları sempozyumu, Bornova Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky JP, Stiles G** (2001) *Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees*, Apidologie 32 (6): 547-554.
- Floris I, Carta C, and Moretti MDL** (1996) *Activity of various essential oils against Bacillus larvae White in vitro ve in apiary trials*, Apidologie 27 (2): 111-119.
- Gallina A, Benetti C, Biancotto C, Baggio A, Manzinello C, Dainese N, Mutinelli F** (2005) *Honey Analytical Method Validation*, Apiacta, 40, page 45-49.

Goodwin M, Eaton VC (1999). *Control of varroa: A guide for New Zealand beekeepers*. New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry. Erişim:[<http://www.maf.govt.nz/biosecurity/pests-diseases/animals/varroa/guidelines/control-of-varroa-guide.pdf>] Erişim tarihi: 11.08.2006.

Horie M, Satio K, Nose N, Nakazawa H (1992) *Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography*. Journal of AOAC International, Vol. 75, NO. 5.

Huq S, and Kallury K. (2006) *Extraction and Analysis of Sulfonamides from Honey by LC-MS-MS Using strata X-C Polymeric SPE Sorbent and Gemini™ C18 HPLC Column*, The Application Notebook – September, Advertising Supplement Food and Beverage, 42.

Isman MB (2000) *Plant essential oils for pest ve disease management*, Crop protection 19:pp 603–608.

İnal ř. ve Güçlü F (1998) *Arı Yetiştiriciliği ve Hastalıkları*, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya, 82 sayfa.

Kaufmann A and Kaenzig A (2004) *Contamination of honey by the herbicide asulam and its antibacterial active metabolite sulfanilamide* Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 6 June, pp. 564–571

Kaya S, Pirinçci İ, Traş B, Ünsal A, Bilgili A, Akar F, Doğan A, Yarsan E (2002a) *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji 2*. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.

Kaya S, Pirinçci İ, Ünsal İa, Karaer Z, Traş B, Bilgili A, Akar F, Doğan A (2002b) *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji 2*. Cilt, 3. Baskı, Medisan Yayınevi. Ankara.

Kevan Pg and Nasr M (1999) *Botanicals for Mite Control ve Novel Means of Administering them for Greater Efficacy and Safety* Published in *Hivelights*, Vol 12 #4, Nov. PHASE I Department Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1.

Kochansky J, Knox D, Shimanuki H (1999) *Comparative stability of oxytetracycline ve tylosin in sugar syrup*, Apidologie 30 (4): 321-326 JUL-AUG.

Kochansky J, Knox DA, Feldlaufer M and Pettis JS, (2001) *Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible ve -resistant Paenibacillus larvae*, Apidologie 32 (3): 215-222 MAY-JUN.

Koeniger N and Fuchs S (1988) *Control of Varroa jacobsoni in Honeybee Colonies Containing Sealed Brood*, Apidologie. 19(2): 117–130.

Londzin W and Sledzinski B (1996) *Resistance of the honey bee parasitic mite Varroa jacobsoni to varroacides containing tau-fluvalinate*, Medycyna Weterynaryjna 52, 526/8.

Martel AC and Zeggane S (2003) *HPLC Determination of Sulfathiazole in French Honeys*, Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies, Vol. 26, No. 6, pp. 953–961.

Maudens KE, Zhang GF, Lambert WE (2004) *Quantitative analysis of twelve sulphonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection*, Journal of Chromatography 1047: 85–92.

Melathopoulos AP, Nelson D and Clark K (2004) *High velocity electron-beam radiation of pollen ve comb for the control of Paenibacillus larvae subspecies larvae ve Ascospaera apis*, American Bee Journal 144 (9): 714-720 SEP.

Melathopoulos AP, Winston ML, Whittington R, Smith T, Lindberg C, Mukai A and Moore M, (2000) *Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera : Apidae), their mite parasites Varroa jacobsoni (Acari : Varroidae) and Acarapis woodi (Acari : Tarsonemidae) and brood pathogens Paenibacillus larvae and Ascospaera apis*, Journal of Economic Entomology 93 (2): 199-209 APR.

Milani N (1995) *The resistance of Varroa to pyrethroids: a laboratory assay*, Apidologie 26, 415-429.

Milani N (1999) *The resistance of Varroa Jacobsini Oud. To acarides*, Apidologie 30, 229–234.

Milani N (2001) *Managment of the Resistance of Varroa Mites to Acarides. Mites of the honey Bee*, Edited by Webster TC. Delaplane KS. Dadant Publication 241-251.

Mutinelli F. and Baggio A (2004) *Use Of Medical Drugs Aggainst Varroosis*, Apiacta-39, 53-62.

Mutinelli F. and Rademacher E, (2003) *The use of drugs control Varroosis in honey bee colonies ve European legislation the current situation*, Apiacta 84(2): 55-59.

Okeniyi JA, Olubanjo OO, Ogunlesi TA, and Oyelami, OA, (2005) *Comparison of healing of incised abscess wounds with honey ve EUSOL dressing.*. J Altern Complement Med. Jun;11, 511-3.

Öztürk Aİ (2002) *2002 Yılı Hayvancılık Grubu Bilgi Alışveriş Toplantısı Bildirileri*, 167-173.

Öztürk Aİ, (2001) *Arıcılık Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi*, Yayın Serisi, Ankara, Yayın No: 33.

Pang GF, Cao YZ, Fan CL, Zhang JJ, Li XM, Li ZY, Jia GQ, (2003) *Liquid Chromatography–Fluorescence Detection For Simultaneous Analysis Of Sulphonamide Residues İn Honey*, Annals of Bioanalytical Chemistry 376: 534–541.

Pastor NN, Garcia CR, Maquieira A, Puchades R (2004) *Specific Polyclonal-Based Immunoassays For Sulphathiazole*, Annals of Bioanalytical Chemistry 379:1088–1099.

Paulson GD, Fiel VJ, Giddings JM, Lamoreux CH (1992) *Lactose conjugation of sulphonamide drugs in the lactating dairy cow*, Xenobiotica 22: 925-939.

Peng CYS, Mussen E, Fong A, Cheng P, Wong G and Monague MA (1996) *Laboratory ve field studies of the effects of the antibiotic tylosin on honey bee Apis*

mellifera L. (Hymenoptera: apidae) development ve prevention of American foulbrood disease, Journal of Invertebrate Pathology 67, 65–71.

Pettis JS and Feldlaufer MI (2005) *Efficacy of lincomycin ve tylosin in controlling American foulbrood in honey bee colonies*, Journal Of Apicultural Research 44 (3): 106–108.

Piro R, Mutinelli F (2003) *The EU legislation for honey residue control*, Apiacta 38: 15-20.

Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J, Sniegocki T, Grzebalska A (2003) *Sulfonamide Residues In Honey Control and Development Of Analytical Procedure*, APIACTA, 38,249-256.

Reimer GJ, Suarez A (1991) *Development of a screening method for five sulfonamides in salmon muscle tissue using thin-layer chromatography*, Journal of Chromatography Volume 555, Issue 1-2, Pages 315-320.

Reybroeck W (2003) *Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian Market*, Apiacta 28, 23-30.

Schwaiger I, Schuch R (2000) *Bound sulfathiazole residues in honey - Need of a hydrolysis step for the analytical determination of total sulfathiazole content in honey*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau Volume 96, Issue 3, March, Pages 93-98.

Shao B, Dong D, Wu Y, Hu J, Meng J, Tu X, Xu S, (2005) *Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta 546, 174-181.

Sheth HB, Yaylayan VA, Low NH, Stiles ME, Sporns P (1990) *Reaction of Reducing Sugars with Sulfathiazole and Importance of This Reaction to Sulfonamide Residue Analysis Using Chromatographic, Colorimetric, Microbiologic or ELISA Methods*, J. Agric. Food Chem. 38 1125-1130.

Sokol R (1996) *Effects of long-term persistence of Fluwarol (fluvalinate) on honey bee colonies*, Medycyna Weterynaryjna 52, 718–20.

Spivak M (1996) *Honey bee hygienic behaviour ve defense against Varroa jacobsoni*, Apidologie 27, 245–60.

Spivak M and Reuter GS (2001) *Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies Apis mellifera bred for hygienic behavior*, Apidologie 32, 555–565.

Spreatico M and Lodesani M, Colombo M (1993) *Infectiveness Apistant Treatment Against Mite Of Varroa Jacobsisini Oud. Inseveral Disticts Lombardy (Italy) Resistant To Kumafos Results Of Laboratory Test Ve Field Trials*, Apidologie 24, 67-72.

Spreatico M, Eordegh FR, Bernardinelli I, and Colombo M (2001) *First detection strains of varroa destructor resistant to kumafos, Result of the laboratuary test ve field trials*, Apidologie 32, 49-55.

Sunay AE (2006) *Balıda antibiyotik kalıntısı sorunu*, Uludağ Arıcılık Dergisi-Kasım 143-148.

Şanlı Y (1998). *Veteriner ilaç rehberi ve bilinçli ilaç kullanımı el kitabı*,. Ankara.

Thompson ST, and Noot DK (2005) *Determination of sülfonamides in honey by liquidchromatography–tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 551, 168–176

Thomson CA, Sporns P (1995) *Direct ELISAs for sülfathiazole in milk and honey with special emphasis on enzyme conjugate preparation*, Journal Food Sci. 60: 409-414.

Threlfall E J, Frost JA, Ward LR and Rowe B (1994) *Epidemic in cattle and humans of Salmonella typhimurium DT104 with chromosomally integrated drug resistance*, Veterinary Record 134, 577

Üzümcü İ (2007) *Ulusal kalıntı izleme programı ve yasal zemini*, Antibiyotik kullanımı stratejileri ve kalıntıları sempozyumu, Bornova Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.

Van Der Weyden E.A, (2005) Treatment of a venous leg ulcer with a honey alginate dressing. Br J Community Nurs. Suppl: S26-7.

Verzegnassi L, Savoy-Perroud MC, Stadler RH (2002): Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulphanamides in honey. Journal of Chromatography A, 977, 77-87.

Wang S, Zhang HY, Wang L, Duan ZJ, and Kennedy I (2006) *Analysis of sulphonamide residues in edible animal products*, Food Additives and Contaminants, April; 23(4): 362–384.

Williams DL (2000) *Veterinary Approach to the European Honey Bee (Apis Mellifera)*, The Veterinary Journal 160, 61-73

Williams JR, Peng CYS, Chuang RY, Doi RH and Mussen EC (1998) *The inhibitory effect of azadirachtin on Bacillus subtilis, Escherichia coli, ve Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood in the honeybee Apis mellifera L.*, Journal Of Invertebrate Pathology 72 (3): 252-257 NOV.

Zotou A, and Vasiliadou C (2006) *Selective Determination of Sülfonamide Residues in Honey by SPE-RP-LC with UV Detection*, Laboratory of Analytical Chemistry, Chromatographia, 307–311.

ÖZGEÇMİŞ

Isparta ilinin Şarkikaraağaç ilçesinde 1977 yılında doğdu. İlkokulu, Antalya A.Ferda Kahraman İlkokulu'nda, ortaokulu, Antalya Merkez Ortaokulu'nda, liseyi, Şarkikaraağaç Veteriner Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladı. 1995 yılında Antalya Tarım İl Müdürlüğü'ne Veteriner Sağlık Teknisyeni olarak atandı. Aynı yıl Konya Tarım İl Müdürlüğü'ne atandı. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden 2001 yılında mezun oldu ve aynı yıl Konya Tarım İl Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak intibağı yapıldı. 2002'de Karabük Tarım İl Müdürlüğü'ne atandı. 2002-2003 yılları arasında Çanakkale Boğaz Komutanlığı Muayene Komisyon Başkanlığı'nda muayene komisyon üyesi olarak görev yaptı. 2004'te Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Toksikoloji Laboratuvarı'nda göreve başladı. 2005 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Toksikoloji Laboratuvarı'nda bölüm akreditasyon, ballarda sülfonamid kalıntı analizleri, aşılarda formaldehit analizleri ve zehirlenme olgularında pesitisit analizleri sorumlusu olarak görevini sürdürmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda mesai saatleri dışına taşan saatlerde dahi ilgi, sonsuz destek ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT'a, ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve araştırma görevlilerine, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BVKAE) idaresine, Toksikoloji Laboratuar Şefi Veteriner Hekim A.Turan ERDOĞDU'ya, BVKAE Toksikoloji laboratuvarı personellerine yardım ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

İsmi anamadığım, tez çalışmamda yardımları geçen herkesle birlikte, bu günkü dünya görüşümün temellerini atan tüm öğretmenlerime, üniversite hocalarıma ve aileme minnettarlıklarımı sunar; ev arkadaşlarım Hakan ÖRNEK ve Ömer ÖZÇELİK'e sabır, özveri ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.