



**T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ (NKÜBAP)**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

Protokol No: NKUBAP.00.23.AR.14.05

**TEKİRDAĞ İLİ ÇEVRESİNDE
TOPLANAN BAL ÖRNEKLERİNDE
NEONİKOTİNOİD PESTİSİT KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI**

Yürütücü: Yard. Doç. Dr. Nurullah ÖZDEMİR

2016

ÖNSÖZ

Son yıllarda memelilerde daha az toksikasyon yapması nedeniyle neonikotinoid pestisit türü bitki koruma ürünleri kullanımında bir artış görülmektedir. Ancak yeni geliştirilen neonikotinoid pestisit türü bitki koruma ürünleri, memelilerde ve kuşlarda daha az toksikasyon yapmasına karşın, arı ve diğer böcek türlerinde daha fazla toksik etkilere neden olmaktadır. Bu tür neonikotinoid pestisitlerin, arı koloni sağlığı üzerinde olumsuz etkilerini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır.

Bal arıları, çevrede kullanılmış olan bitki koruma ürünleri gibi toksik maddelerin varlığını ortaya çıkarabilen biomarkerlar olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışma, Tekirdağ ili ve bağlı ilçe merkezlerinde neonikotinoid pestisit türü bitki koruma ürünlerinin kullanımını ortaya çıkarmak ve olası arı koloni sağlığı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla toplanan 33 adet bal örneklerinde gerçekleştirilmiştir.

Bu proje, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından NKUBAP.00.23.AR.14.05 Protokol No'su ile desteklenmiş, toplanan bal örneklerinin analizleri, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Enstrümantal Analiz Laboratuvarında mevcut olan Yüksek Basıncılı Likit Kromatografisi Kütle Spektrometri (HPLC-MS/MS) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Projeye destek veren Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Enstrümantal Analiz Laboratuvarında çalışan uzman arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yard. Doç. Dr. Nurullah ÖZDEMİR

ÖZET

Tekirdağ İli Çevresinde Toplanan Bal Örneklerinde Neonikotinoid Pestisit Kalıntılarının Araştırılması

Proje kapsamında, Tekirdağ ili çevresinde toplanan bal örneklerinde neonikotinoid pestisit kalıntılarının araştırılması amaçlanmıştır. Tekirdağ ve bağlı ilçe merkezlerindeki bal üreticilerinden 33 adet bal örneği toplanmıştır. Toplanan bal örnekleri, likit-likit ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edildikten sonra, analizler Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezindeki Yüksek Basınçlı Likit Kromatografi-Kütle Spektrofotometri (HPLC-MS/MS) cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, analizi gerçekleştirilen ballarda, maksimum kalıntı limiti üzerinde herhangi bir neonikotinoid pestisit kalıntısı tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler: Bal, HPLC-MS/MS, Kalıntı, Neonikotinoid pestisit, Tekirdağ,

ABSTRACT

Investigation of Neonicotinoid Pesticide Residues In Honey Samples Collected Around Tekirdag Province

In this project, the honey samples collected around Tekirdag province aimed to investigate the neonicotinoid pesticide residues. 33 honey samples of honey producers in Tekirdag and its districts were collected. The collected honey samples, then extracted using liquid-liquid extraction methods, analysis Namık Kemal University in Scientific and Technological Research and Application Research Center of High Pressure Liquid Chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS / MS) was performed on the device. According to the obtained results, the analysis carried out in the honey, the maximum residue limit has not identified any neonicotinoid pesticide residues.

Keywords: HPLC-MS/MS, Honey, Neonicotinoid pesticide, Residue, Tekirdag.

İÇİNDEKİLER

1. GENEL BİLGİLER.....	6
1.1 Neonikotinoid Pestisitler	6
1.2. Neonikotinoid Pestisitlerin Kullanım	6
1.3. Tarihçe	7
1.4. Toksikite.....	7
1.4.1. Arı kolonilerinde kayıplar	7
1.4.2. Diğer yaban hayatı üzerindeki etkileri	9
2. MATERYAL VE METOT.....	9
2.1 Kimyasallar ve Standart Maddeler	9
2.2. Çözeltiler ve Standart çözeltileri	9
2.3. Ekipman.....	10
2.4. Örneklerin Toplanması	10
2.5. Örneklerin ekstraksiyonu	11
2.6. UHPLC Şartları	11
2.7. MS/MS Şartları.....	12
2.8. Hesaplamalar	13
3. SONUÇLAR 14	
3.1. Metot Validasyonu	14
3.2. Bal örneklerinin analiz sonuçları	20
4. TARTIŞMA	21
5. SONUÇ	23
6. KAYNAKLAR.....	23

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: Maksimum Kalıntı Limiti düzeyinde yükleme yapılan bal örneğinden elde edilen kromatogram	15
Tablo 1: Bal örneklerinin alındığı ilçeler	11
Tablo 2: Mobil faz gradient akış programı.....	11
Tablo 3: MS/MS dedektör parametreleri ve tutunma zamanları (RT)	122
Tablo 4: Neonikotinoid pestisitlerin LOD, LOQ, CC _α ve CC _β değerleri.....	13
Tablo 5: Neonikotinoid pestisitlerin doğruluk, geri kazanım ve iyon oranları	19
Tablo 6: Bal numuneleri analiz sonuçları.....	20

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Neonikotinoid Pestisitler

Neonikotinoidler, MSS'nde nikotinic asetilkolin reseptörlerine bağlanarak nikotin benzeri uyarıcı etkiler gösteren insektisitlerdir. Nikotinic reseptörler, memelilerde hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde bulunurken, böceklerde sadece merkezi sinir sisteminde bulunur. Neonikotinoidler, böceklerde merkezi sinir sistemi reseptörlerine memelilere göre daha sıkı ve geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır. Bu nedenle kuşlar ve memeliler üzerinde toksik etkileri, böceklerden daha düşük toksisiteye sahip olmakla birlikte, bazı yıkımlanma ürünleri toksiktir [1]. Bu grupta; İmidakloprid (dünyada en yaygın kullanılan), asetamiprid, klotiyamid, nitenpiram, nitiazin, tiyakloprid, ve tiametoksam yer almaktadır [2].

Neonikotinoidlerin kullanımına bağlı olarak görülen olumsuz ekolojik etkiler, arı kolonilerinde ve böcek popülasyonunda azalma ve buna bağlı olarak kuşların sayısındaki azalma gibi nedenlerle, Avrupa Birliği ve diğer ülkelerde kullanımına kısıtlama ve yasaklamalar getirilmiştir [3].

Son yıllarda Neonikotinoidler 120'den fazla ülkede ruhsatlandırılmıştır. 2008 yılı verilerine göre 1.5 milyar € ciroluk insektisit pazarında %24 oranında paya sahiptir. Özellikle tohumlar için kullanılan insektisitler arasında satışların %80'i neonikotinoidler teşkil etmektedir. 1990 yılında piyasaya ilk girdiğinde 150 milyon € olan pazar payı, 2008 yılı itibariyle 957 milyon € ciroya ulaşmıştır [4].

1.2. Neonikotinoid Pestisitlerin Kullanım

Neonikotinoid insektisitler, ABD'de mısır ve kanola üretiminde %95 oranında, soya üretiminin yarısında, şeker pancarı, sorgum ve pamuk üretiminin büyük bir kısmında, ayrıca sebze ve meyve üretiminde, pirinç, fındık ve şaraplık üzüm üretiminde de uygulanmaktadır [5].

İmidakloprid, topraktaki emici böceklere karşı etkili bir maddedir, aynı zamanda evcil hayvanlarda pire ile mücadele de kullanılmaktadır. Dünyada en yaygın olarak kullanılan neonikotinoid pestisitlerdir [6]. Tahıl, pamuk, buğday, baklagiller, patates, bazı meyveler, çim ve sebze gibi yapraklı bitkilerde yaprak tedavisinde, toprak, tohum, ağaç ve hayvanlardaki zararlı böceklere karşı da uygulanmaktadır. Ayrıca sulama sistemine de katılarak uygulanabilir. Sudaki kontrollü salınım formülasyonları, suda %50'sinin salınımı 2-10 gün içerisinde gerçekleşmektedir [7].

Zararlı mücadelesinde, neonikotinoid tohum tedavilerinin faydası, dikim zamanlamasına ve haşerelerin ulaşımına bağlıdır. Neonikotinoid tohum tedavilerinde, zararlı mücadelesi için herhangi bir yarar görünmemektedir [8]. Soya fasulyesinde, neonikotinoid tohum tedavisi, soya bitine karşı etkili değildir, çünkü dikimden 35-42 gün sonra bileşikler yıkımlandığında, soya biti henüz mevcut değildir veya zarar verebilecek popülasyona ulaşmamıştır [8, 9, 10]. Neonikotinoid tohum tedavileri, geç ekilen alanlarda veya erken büyüme sezonlarında geniş enfestasyonların görüldüğü alanlarda verimi koruyabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde soya zararlılarına karşı toplam verim kazançları dikkate alındığında, neonikotinoidlerin tohum tedavileri yerine yaprak böceklerine karşı kullanımı önerilmektedir [8].

1.3. Tarihçe

Nikotinic bileşikler, başlangıç çalışmalarında insektisit etki bakımından başarılı değildi. Purdue Üniversitesi'nde bir kimyacı tarafından sentezlenen nithiazin ön maddesinin, Shell araştırmacıları tarafından yapılan bir taramada insektisit potansiyelinin olduğu tespit edilerek nithiazin maddesi geliştirildi. Nithiazin, organik fosforlu ve karbamat insektisitlerin aksine asetilkolinesterazı inhibitörü olarak hareket etmez. Nithiazin, memelilerde düşük toksisite gibi istenilen özelliklerde olmasına karşın, ışığa karşı duyarlı olduğu için ticari alanda uygulama alanı bulamamıştır [11].

İlk ticari neonikotinoid, 1985 yılında Bayer tarafından patenti alınan imidakloprid'tir [12].

Neonikotinoidlerin çoğu suda çözünür ve çevrede yıkımlanması yavaştır, böylece bitki tarafından alınır ve bitki büyüdükçe böceklere karşı koruma sağlanmış olur. 1990'lı yılların sonlarında pestisitlerin bu sınıfı, özellikle imidakloprid, yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 2000'li yılların başlarında, diğer iki neonikotinoid, klotianid ve tiametokzam pazara girmiştir. 2013 yılı itibarıyla Amerika'da ekilen tüm mısırlar, bu iki neonikotinoid ile işlem görmüş durumdadır. 2014 yılı itibarıyla soya ekim alanlarının yaklaşık üçte birinde, genellikle imidakloprid veya tiametokzam türü neonikotinoid insektisit ile işlem görmüş tohumlar kullanılmıştır [13].

1.4. Toksikite

1.4.1. Arı kolonilerinde kayıplar

2006 yılında arı kayıplarındaki dramatik artış, arı koloni sağlığını etkileyen potansiyel faktörler konusunda ilgi uyandırmıştır [14]. Neonikotinoidler, birçok böcek türü için düşük toksisiteli olarak tanıtılmış, ancak son araştırmalarda düşük temas düzeylerinde bal arıları ve diğer faydalı böcek türleri için potansiyel toksik etkili olduğu öne sürülmüştür.

Neonikotinoidler, arıların gıda kaynaklarına ulaşma yollarını öğrenme ve hatırlama gibi beslenme amaçlı uçuş kabiliyetlerini etkileyebilmektedir. Neonikotinoid maruziyetine bağlı letal ve subletal etkilerden ayrı olarak, akarlar ve diğer patojenlerle kombinasyonları da araştırılmaktadır [15]. Neonikotinoidler, kraliçe üretimi ve arı koloni büyümesinde zararlı etkilerden sorumlu olabilirler [16].

Arılar için önceden tespit edilemeyen maruziyet yollar arasında nektar, polen ve küçük partiküller sayılabilir [17]. Koloni çöküş bozukluğunun primer semptomu, arıların subnanogram düzeylerde toksisiteye bağlı letalite oluşmaksızın kovana dönüşlerin başarısız olmasıdır [18].

Neonikotinoid pestisitler, toprakta ve sulama kanallarında kalıcı olduğu ve çevresel kirlenmeye neden olduğu bir araştırmada ortaya konmuştur [19].

2012 yılında yapılan bir araştırmada, tarım alanı yakınlarına konuşlandırılan kovanların etrafındaki ölü arılarda, tiametoksam ve klotianidin saptanmıştır. Kovandaki diğer arılarda, kasılmalar, hareketlerde koordinasyon bozukluğu ve kasılmalar gibi insektisit zehirlenmesinin tüm belirtileri görülmüştür. Neonikotinoid insektisitlerle işlem görmüş tohumların ekildiği topraklarda ve bu alanda yetişen bitkilerin çiçeklerinde iki yıl boyunca düşük düzeylerde kalıntılar bulunabilir ve bu kalıntılar arılar tarafından kovana taşınabilir. İnsektisitlerle işlem yapılan tohumlar, çevreye salınımı kontrol etmek için yapışkan bir maddeyle kaplanır, daha sonrada makine ile dikimi kolaylaştırmak için bir talk ile kaplanır. Bu talk, büyük miktarlarda çevreye salınmış olabilir. Çevreye salınan talklardaki insektisit düzeylerinin, arılar için letal dozun yaklaşık 700 000 kat kadar fazla olduğu tespit edilmiştir. İnsektisit içeren talklar, o kadar yoğundur ki bitkilerin çiçeklerindeki küçük miktarlar bile arıları öldürebilir yada kontamine polenlerin kovana taşınmasına neden olabilir. Testler, neonikotinoid pestisitlerin, polenlerle kovanlara taşındığını, yaklaşık 100 ppb altındaki düzeylerin pozitif kabul edildiği, bu miktarların akut toksisite için yeterli olmadığı ancak yeter miktarda tüketen arılar için öldürücü olabileceğini göstermiştir [20].

2013 yılında yapılan bir çalışmada, neonikotinoidlerin genel kullanım miktarlarının arılar için zararlı olduğu ve acilen güvenli alternatiflere ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır [21]. Yine İtalyan araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada, neonikotinoid insektisitlerin arıların immun sistemini bozabileceği ve bu durumda normalde viral etkenlere dirençli olan arıların, viral enfeksiyonlara duyarlı hale geldiği belirtilmiştir [22].

1.4.2. Diğer yaban hayatı üzerindeki etkileri

2013 Mart ayında, American Bird Conservancy’de yayınlanan 200’e yakın bir makale yorumlarında, kuşlar akuatik omurgasız canlılar ve diğer yabani hayat üzerindeki toksik etkilerinden dolayı tohum işlenmesinde neonikotinoid pestisit kullanımının yasaklanması çağrısında bulunulmuştur [23].

Nature dergisinin Temmuz 2014 sayısında, Hollanda’da neonikotinoid insektisit kullanımı ve bazı kuş popülasyonlarındaki azalma arasında korelasyon gözlemlendiği çalışmada, çevresel örneklerde tespit edilen neonikotinoid insektisit düzeyleri ile böcek yiyen kuşların popülasyonlarındaki azalma arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Aynı sayıdaki diğer bir editör, neonikotinoid pestisit kullanımına bağlı olarak kuş sayısındaki azalma arasındaki olası bağlantı bulunmuştur ki bu endişe verici bir durumdur. Neonikotinoid bileşiklerin kalıcı (yarılanma ömrü 1000 gün) olduğu ve doğrudan düşük toksik etkileri nedeniyle, kuş sayısındaki azalmanın muhtemel sorumlusu olarak, bu bileşiklerin çevreye yaygın bir şekilde dağılması ve kuşların besin kaynağı olan böceklerin tükenmesi olarak gösterilebilir [24].

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Kimyasallar ve Standart Maddeler

- a) *Neonikotinoid pestisit standartları:* İmidacloprid (%99.9), asetamiprid (%99.9), klotianidin (%99.9), nitenpiram (%99.9), tiyakloprid (%99.9), dinotefuran (%98.8) ve tiametoksam (%99.6). Standart maddeler, Sigma-Aldrich firmasından sertifikalı olarak alınmıştır, her bir standart maddenin saflığı %98.8’in üzerindedir.
- b) *İnternal standart:* Klotianid-d₃ Sigma-Aldrich firmasından sertifikalı olarak alınmıştır, standart maddenin saflığı %97’nin üzerindedir.
- c) *Asetonitiril:* Analiz amaçlı, Fluka
- d) *Diklorometan:* Analiz amaçlı, Merck
- e) *Asetik asit (glacial):* %100, Anhidri, analiz için, Merck

2.2. Çözeltiler ve Standart çözeltileri

- a) *Mobil faz A:* Asetonitiril
- b) *Mobil faz B:* Asidifiye su (%0.2 Asetik asit): 1 L balon joje içerisine 2 mL asetik asit alınır ve 1 L çizgisine kadar distile su ile tamamlanır.
- c) Mobil fazlar hazırlandıktan sonra 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edildi.

- d) Stok Standart çözeltisi (S₀):* Her bir standart maddeden ayrı ayrı olmak üzere, 10 mL'lik balon jöjelere 10 mg tartıldı ve üzeri 10 mL çizgisine kadar metanolle tamamlandı. Bütün stok standart çözeltiler, -18 °C'de muhafaza edildi.
- e) S₂-Çalışma standart çözeltisi (10 µg/mL):* Her bir stok standart çözeltiden 0.1 mL alınarak üzeri metanolle 10 mL'e tamamlandı. Çalışma standart çözeltileri buzdolabı sıcaklığında muhafaza edildi.
- f) S₄-Çalışma standart çözeltisi (0.1 µg/mL):* S₂ çalışma standart çözeltisinden 0.1 mL alınarak üzeri metanolle 10 mL'e tamamlandı. Bu çözelti aynı zamanda HPLC-MS/MS dedektörde, standart maddelerin tanımlanmasında kullanıldı.
- g) Standart spike çözeltisi karışımı:* Her bir referans standart maddenin baldaki Maksimum Kalıntı Düzeylerine uygun olarak, konsantrasyonları klotianidin, dinotefuran, nitenpiram, tiametoksam 10 µg/kg, asetamiprid ve imidakloprid 50 µg/kg, tikloprid 200 µg/kg düzeyinde hazırlandı. Bu amaçla, klotianidin, dinotefuran, nitenpiram, tiametoksama ait S₄ standart çalışma çözeltisinden 1 mL, asetamiprid ve imidaklopride ait S₄ standart çalışma çözeltisinde 5 mL, tiaklopride ait S₂ standart çalışma çözeltisinde 0.2 mL alınarak üzeri metanolle 10 mL'e kadar tamamlandı.
- h) İnternal standart çözeltisi:* İnternal standart olarak kullanılan clotianidin-d₃'e ait S₂ çalışma standart çözeltisi kullanıldı.

2.3. Ekipman

- a)* Mutireaks (Çoklu karıştırıcı) (Heidolph Instruments, Germany)
- b)* Ultrasonik banyo
- c)* Santrifüj
- d)* UHPLC sistem. Eksigent, ekspert UltraLC 100.
- e)* Analitik kolon; Agilent Proshell 120 SB:C18 2,7µm 100x3,0 mm.
- f)* Tandem quadrapol mass spectrometer (MS/MS). —AB Sciex 3200 QTRAP
- g)* Software: Analyst 1.6.1

2.4. Örneklerin Toplanması

Bal örnekleri, bal hasadının tamamlanmasının ardından Ekim ve Kasım ayları içerisinde Tekirdağ ili merkez ve bağlı ilçe merkezlerindeki bal üreticilerinden 33 adet bal örneği toplanmıştır. Örneklerin dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1:Bal örneklerinin alındığı ilçeler

Alındığı yer	Alınan miktar
Tekirdağ Merkez	4
Çerkezköy	10
Çorlu	3
Saray	6
Hayrabolu	3
Şarköy	4
Malkara	3
Toplam	33

2.5. Örneklerin ekstraksiyonu

Bal örneklerinin ekstraksiyonu amacıyla Jovanov P. ve ark. (25) kullandığı ekstraksiyon metodu kullanıldı. 2 g bal numunesi 15 mL PPE tüplere alınarak üzerine 100 uL internal standart ilave edildi. 0.5 mL asetonitril ve 2.0 mL diklorometan ilave edildi. 1 dakika vortekste karıştırıldı, 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi, tekrar 1 dakika boyunca vortekste karıştırıldı. Daha sonra 2500 rpm de 5 dakika santrifüj yapılarak üst faz alındı. Azot akımı altında 40 °C’de uçuruldu. 0.2 mL mobil faz A/B (50/50) karışımı ile çözdürüldü ve 2 dakika vorteksle karıştırıldı. 0.22 µ enjektör filtrelerden geçirilerek insört viallere aktarıldı.

2.6. UHPLC Şartları

UHPLC, direkt kütle spektrofotometri dedektörüne bağlı olarak çalışmaktadır. Mobil faz gradient akış programı tablo 2’de gösterilmiştir. Analitik ayırım için Agilent Proshell 120 SB:C18 2,7µm 100x3,0 mm. kolonu kullanıldı. Akış hızı 0.3 mL/dakikadır.

Tablo 2: Mobil faz gradient akış programı

Zaman	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Akış hızı
00:00	80	20	0.30
01:00	80	20	0.30
01:10	50	50	0.30
03:30	50	50	0.30
03:40	80	20	0.30
06:00	80	20	0.30

2.7. MS/MS Şartları

Kütle spektrofotometri dedektörü olarak AB Sciex 3200 QTRAP (AB Sciex, Foster City, USA) kullanıldı. İyonizasyon, pozitif iyon modunda ve elektrosprey ionizasyon (ESI) modülü kullanılarak gerçekleştirildi. Tarama tipi, MRM (Multiple Reaction Monitoring) olarak ayarlandı. Kapillar voltaj 5500 V, azot gazının kullanıldığı nebuliser gaz (7 psi), curtain gaz (30 psi), heater gas (50 psi) ve collision gas (50 psi) olarak ayarlandı. TurboIonSprey modülünün sıcaklığı 400 °C’de sabitlendi. Analite bağımlı parametreler; DP (declustering potansiyeli), CE (çarpışma enerjisi) ve CXP (hücre çıkış potansiyeli) için her bir standart maddenin S2 çalışma standart çözeltisi kullanıldı. Her bir analite ait MS/MS iyonları, tutunma süresi (RT) ve diğer enstrüman parametreleri tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3: MS/MS dedektör parametreleri ve tutunma zamanları (RT)

Analitler	Retention Time	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Dinotefuran	2.4	203.08	129.1*	36	8	18	15	4
			114.1	36	8	18	17	4
Nitenpyram	2.8	271.12	225.20*	36	5.5	16	15	4
			56.00	36	5.5	16	49	4
Thiametoxam	3.0	292.00	211.10*	31	11.5	16	15	4
			132.10	31	11.5	16	25	4
Clothianidin	3.2	250.07	132.00*	41	7.5	14	19	4
			169.10	41	7.5	14	15	4
Clothianidin-d3 (IS)	3.2	253.01	132.00	41	8	14	23	4
Imidacloprid	3.3	256.10	290.10*	36	9	14	19	4
			175.10	36	9	14	21	4
Acetamiprid	3.4	223.07	126.20	41	9	12	27	4
			99.20	41	9	12	47	4
Thiacloprid	3.7	253.06	126.20	46	12	14	29	4
			99.10	46	12	14	53	4

*Konfirmasyon iyonu

DP: Declustering potential, **EP:** Entrance Potential, **CEP:** Cell exit potential, **CE:** Collision energy, **CXP:** Collision Cell Exit Potential

2.8. Hesaplamalar

Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm limiti (LOQ)'nin hesaplanması

0.5MRL düzeyinde 6 paralel analizler yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Tayin limiti ve ölçüm limiti aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Tayin limiti, $LOD=C+3SD$

Ölçüm limiti, $LOQ=C+10SD$

C=Standart konsantrasyonu

SD=Standart sapma

CC_α Karar limiti ve CC_β tespit limitinin hesaplanması:

0.5, 1.0, 1.5, 2.0 MRL düzeyinde olmak üzere blank dahil 5 farklı konsantrasyon düzeyinde 6 paralel analizler yapılmış, CC_α ve CC_β değerleri hesaplanarak tablo 4'de gösterilmiştir.

CC_α ve CC_β değerleri, lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$CC_{\alpha} = MRL + 1,64 \times SD_{wIR, MRL}$$

$$CC_{\beta} = MRL + 3.28 \times SD_{wIR,}$$

Tablo 4: Neonikotinoid pestisitlerin LOD, LOQ, CC_α ve CC_β değerleri

Analit	Kalibrasyon aralığı	Linearite	Tespit Limiti (LOD)	Ölçüm Limiti (LOQ)	Karar Limiti (CC _α)	Tespit Limiti (CC _β)	MRL (EU) µg/kg
Dinotefuran	5-20	0.9908	6.25	9.45	10.74	11.50	10
Nitenpyram	5-20	0.9984	8.15	12.77	11.08	12.17	10
Thiametoxam	5-20	0.9963	6.42	12.72	11.48	12.94	10
Clothianidin	5-20	0.9910	5.42	8.70	10.94	11.88	10
Imidacloprid	25-100	0.9956	26.63	36.94	57.18	64.37	50
Acetamiprid	25-100	0.9954	29.18	43.20	56.86	63.73	50
Thiacloprid	100-400	0.9922	102.67	155.34	221.11	242.22	200

3. SONUÇLAR

3.1. Metot Validasyonu

Çalışma kapsamında metot validasyonu amacıyla, selektivite/sensitivite, linearite, tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ), CC_{α} ve CC_{β} değerleri, doğruluk (accuracy) ve geri kazanım (recovery) parametreleri hesaplanmıştır.

Selektivite/sensitivite: Blank örnekler farklı standart maddelerle yükleme yapılarak analiz edildi, tutunma sürelerinde herhangi bir interferasyon gözlemlenmedi. Metotun selektive/sensitivite yönünden uygun olduğuna karar verildi. MRL düzeyinde yapılan yüklemeden elde edilen kromatogram şekil 1’de gösterilmiştir.

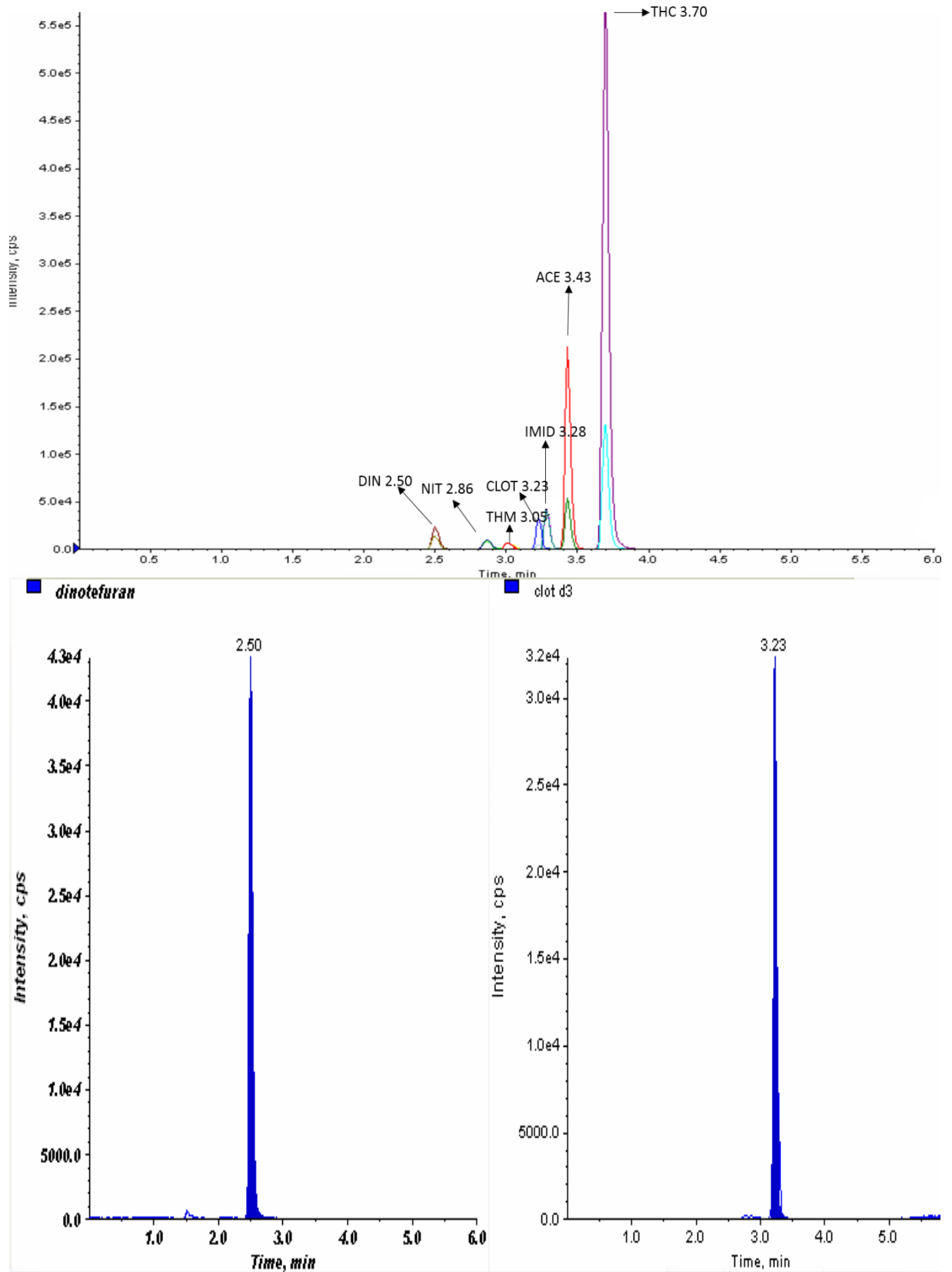
Linearite (doğrusallık): Metodun linearitesini belirlemek amacıyla, standart maddelerin balda tespit edilen MRL düzeyine uygun olarak 0.5, 1, 1.5 ve 2 MRL seviyelerinde 4 farklı konsantrasyon noktası kullanılarak 6 paralel analiz gerçekleştirildi. Her bir standart maddeye ait kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Her bir standart maddeye ait kalibrasyon eğrisindeki r^2 değerinin 0.9908-0.9984 arasına olduğu görüldü.

Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ): Tespit limiti ve ölçüm limitini belirlemek amacıyla 0.5 MRL düzeyinde 10 paralel analiz gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar tablo 4’te gösterilmiştir.

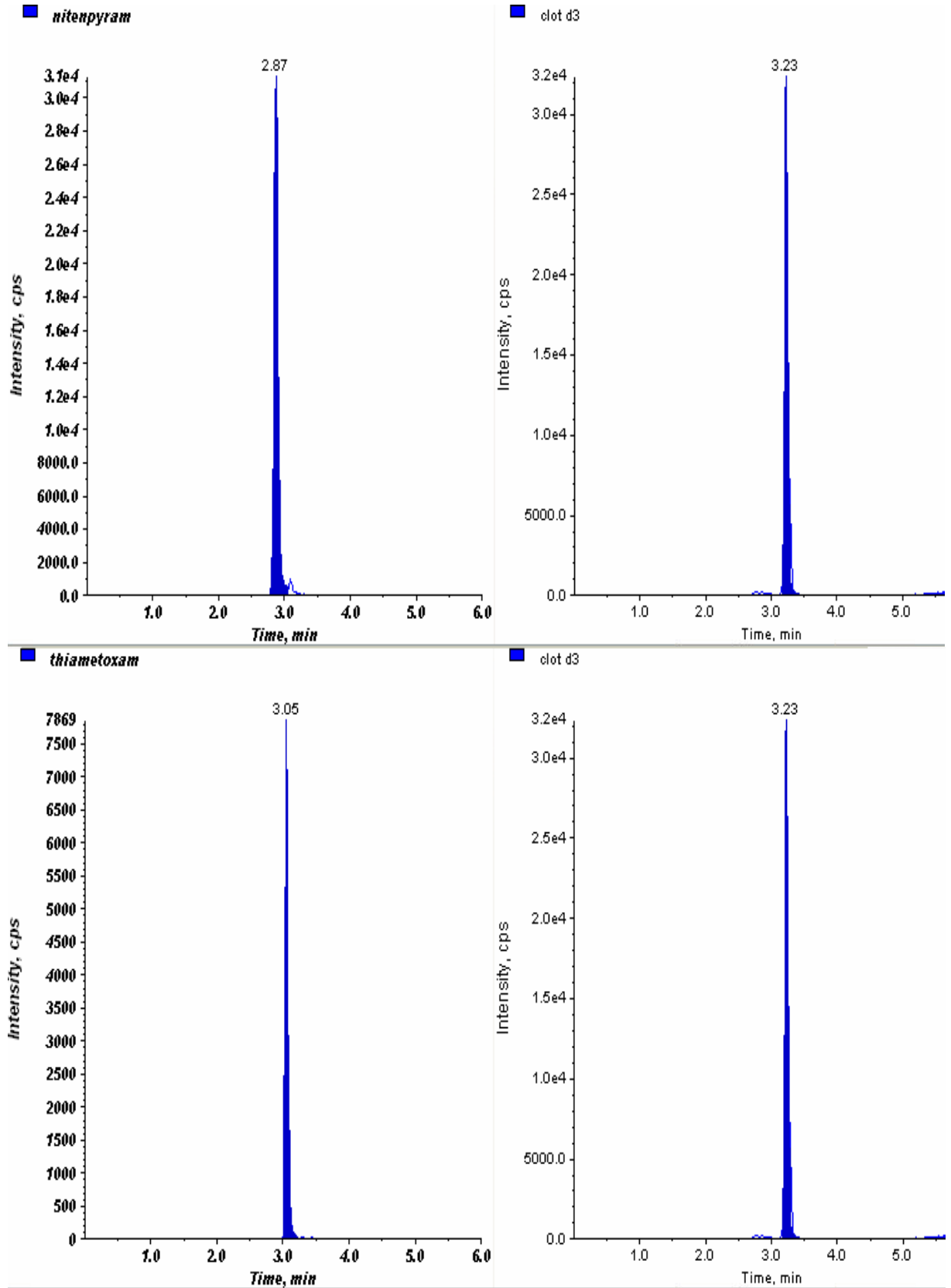
CC_{α} Karar limiti ve CC_{β} tespit limiti: Linearite çalışmalarından elde edilen sonuçlar kullanılarak CC_{α} Karar limiti ve CC_{β} tespit limit değerleri hesaplanmış ve tablo 4’te gösterilmiştir.

Doğruluk (Accuracy): Linearite ve geri kazanım çalışmalarından elde edilen değerleri kullanılarak elde edilmiştir ve tablo 5’da gösterilmiştir.

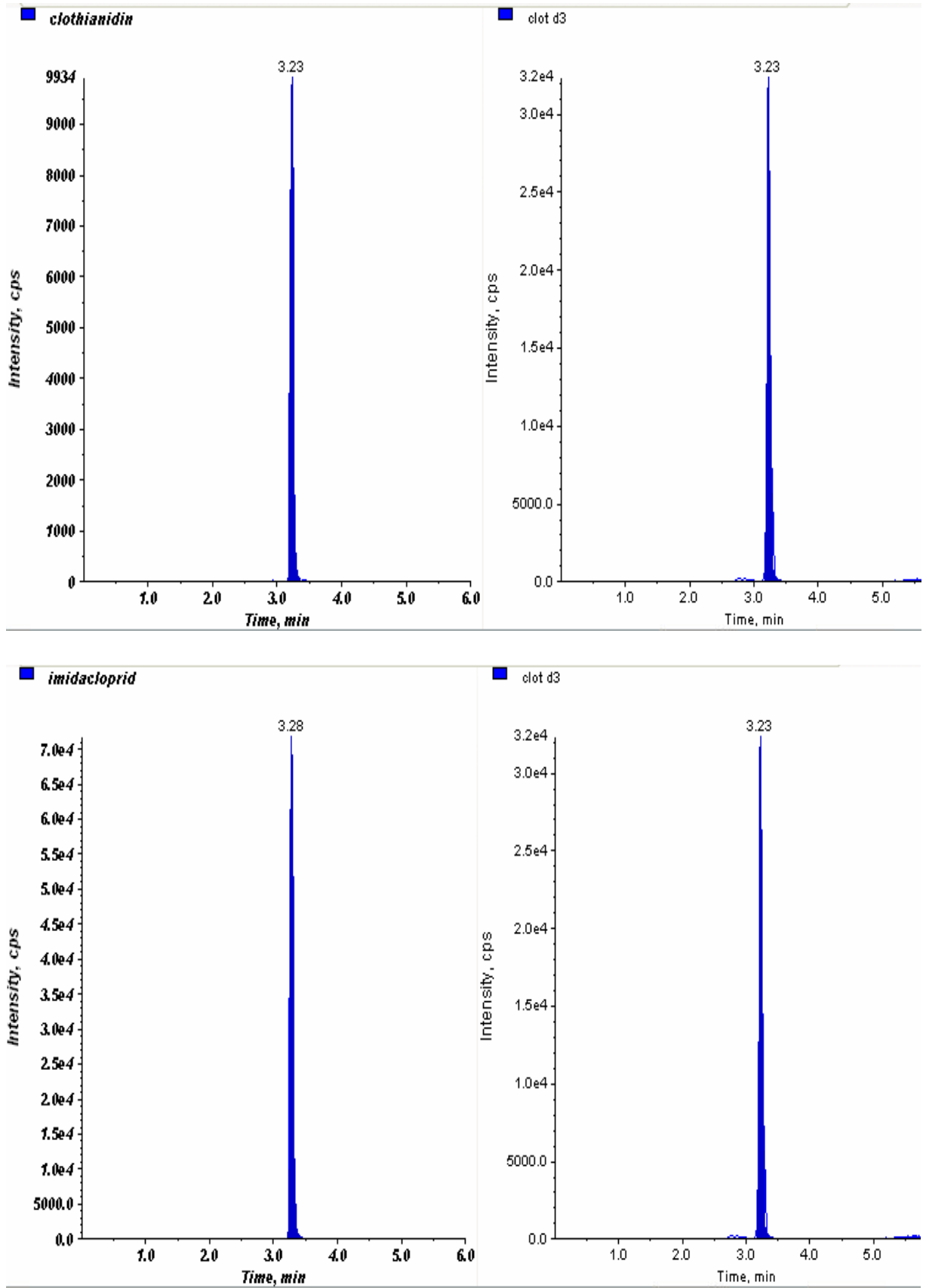
Geri Kazanım (Recovery): Geri kazanım oranlarını belirlemek amacıyla blank numunelere MRL seviyelerine uygun olarak 0.5, 1, 1.5 ve 2 MRL düzeyinde yüklemeler yapılarak analizler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar tablo 5’da gösterilmiştir.



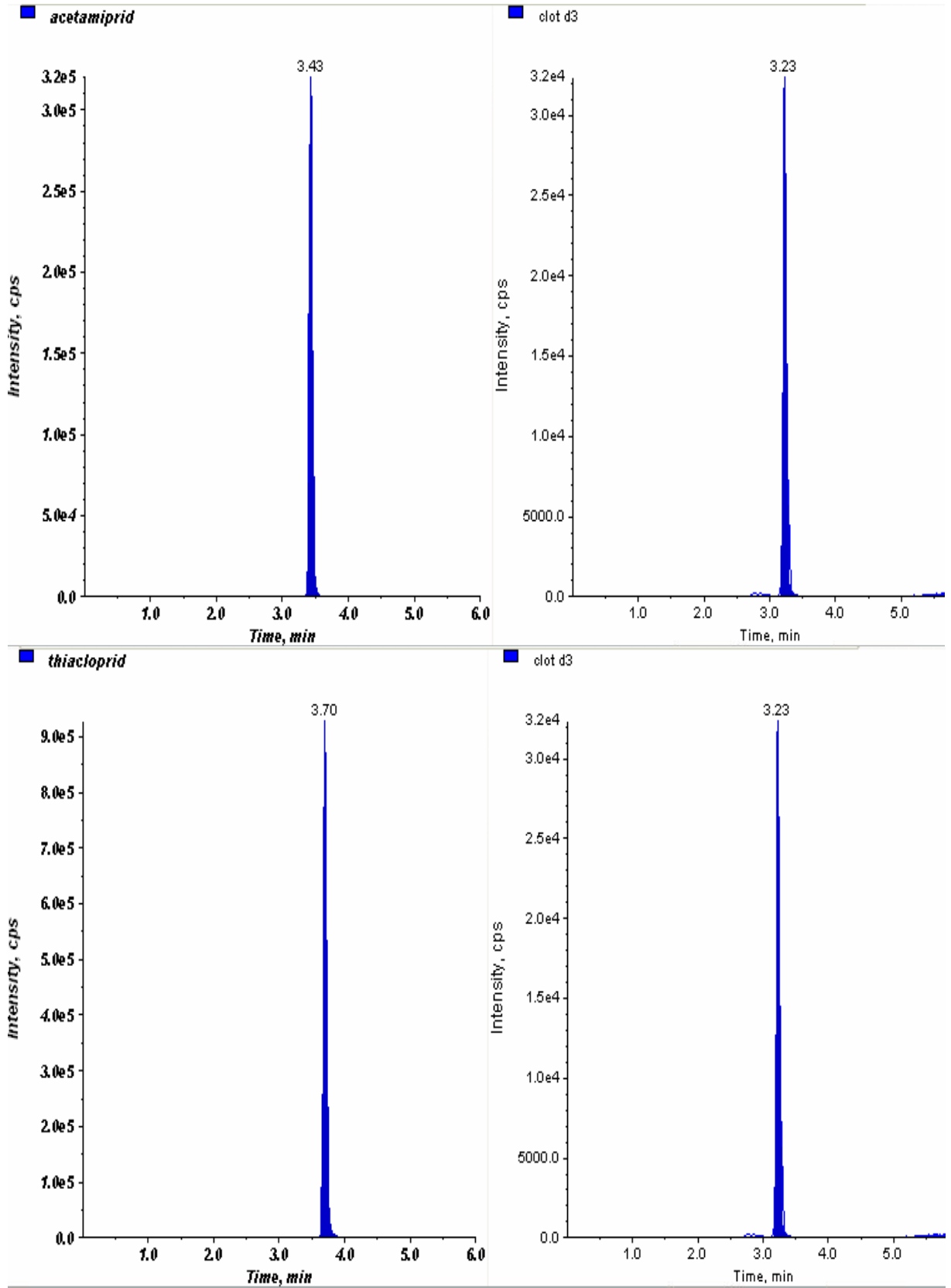
Şekil 1: Maksimum Kalıntı Limiti düzeyinde yükleme yapılan bal örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 1(devam): Maksimum Kalıntı Limiti düzeyinde yükleme yapılan bal örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 1 (devam): Maksimum Kalıntı Limiti düzeyinde yükleme yapılan bal örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 1 (devam): Maksimum Kalıntı Limiti düzeyinde yükleme yapılan bal örneğinden elde edilen kromatogram

Tablo 5: Neonikotinoid pestisitlerin doğruluk, geri kazanım ve iyon oranları

Analitler	Yükleme miktarı	Ölçülen değer (ort)	Standart Sapma	RSD	Doğruluk (Accuracy)	Geri Kazanım (Recovery)
Dinotefuran	5	5.25	0.12	11.56	105.00	84.08
	10	10.86	0.77	7.11	108.56	82.57
	15	15.79	0.97	6.16	105.29	82.52
	20	18.72	1.30	6.92	93.63	78.94
Nitenpyram	5	5.13	0.41	7.98	102.75	87.92
	10	10.42	0.76	7.27	104.20	92.75
	15	15.71	2.01	12.77	104.80	74.75
	20	19.08	1.57	8.20	95.30	63.71
Thiametoxam	5	4.98	0.41	8.27	99.69	71.36
	10	10.03	0.98	9.75	100.25	84.50
	15	15.25	1.11	7.27	101.59	78.63
	20	19.79	1.63	8.21	98.74	73.02
Clothianidin	5	5.06	0.60	11.94	101.34	63.04
	10	10.13	1.11	10.94	101.31	73.65
	15	15.18	1.53	10.09	101.23	70.72
	20	19.75	1.19	6.03	98.81	86.06
Imidacloprid	25	23.55	2.57	10.92	94.10	74.68
	50	51.59	3.34	6.48	103.21	74.98
	75	77.64	5.64	7.26	103.63	77.57
	100	96.70	6.39	6.61	96.70	71.26
Acetamiprid	25	23.61	2.44	10.34	94.50	103.19
	50	52.36	4.40	8.42	104.70	95.83
	75	79.23	7.42	9.37	105.53	94.94
	100	94.70	8.11	8.56	94.70	93.64
Thiacloprid	100	100.23	7.15	7.13	100.23	94.12
	200	209.00	19.42	9.30	104.45	92.00
	300	318.00	33.70	10.60	105.99	92.21
	400	377.88	40.98	10.84	94.51	90.56

3.2. Bal örneklerinin analiz sonuçları

Bal örneklerinin analizlerinden elde edilen bulgulara göre, Maksimum Kalıntı Seviyesi üzerinde herhangi bir neonikotinoid türü pestisit kalıntısı tespit edilmemiştir. Maksimum Kalıntı Seviyesi altında bulunan veriler değerlendirilmemiştir. Sonuçlar tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Bal numuneleri analiz sonuçları

No	Dinotefuran	Nitenpyram	Thiametoxam	Clothianidin	Imidacloprid	Acetamiprid	Thiacloprid
1	0,64	< 0	< 0	0,21	1,23	1,95	0,65
2	0,53	< 0	< 0	0,15	1,4	1,97	0,53
3	0,47	< 0	< 0	0,57	1,21	2,07	0,58
4	0,40	< 0	< 0	0,15	1,22	1,95	0,50
5	0,48	< 0	< 0	0,67	1,26	1,95	0,64
6	0,52	< 0	< 0	0,32	1,21	1,93	0,51
7	0,61	< 0	< 0	0,15	1,33	1,94	0,50
8	0,42	< 0	< 0	< 0	1,23	1,94	0,51
9	0,60	< 0	< 0	< 0	1,22	1,95	0,51
10	0,55	< 0	< 0	0,46	1,26	1,97	0,51
11	0,73	< 0	< 0	0,21	1,43	2,00	0,54
12	1,03	< 0	< 0	1,39	1,33	1,99	0,52
13	0,96	< 0	< 0	< 0	1,24	3,64	0,54
14	0,51	< 0	< 0	0,28	1,27	1,98	0,52
15	0,58	< 0	< 0	0,23	1,25	1,94	0,52
16	1,12	< 0	< 0	0,17	1,30	1,95	0,53
17	0,87	< 0	< 0	0,12	1,22	1,95	0,51
18	0,71	< 0	< 0	1,49	1,24	1,96	0,54
19	0,53	< 0	< 0	0,23	1,22	1,96	0,52
20	0,60	< 0	< 0	0,36	1,25	1,99	0,55
21	0,43	< 0	< 0	0,13	1,24	1,95	0,56
22	0,98	< 0	0,07	1,58	1,46	2,06	0,52
23	0,88	< 0	< 0	< 0	1,24	2,16	0,51
24	1,18	< 0	< 0	0,36	1,33	1,98	0,58
25	1,02	< 0	< 0	0,57	1,48	1,99	0,65
26	1,35	< 0	< 0	0,50	1,33	1,98	0,56
27	0,95	< 0	< 0	< 0	1,27	1,96	0,54
28	1,56	< 0	< 0	0,37	1,46	2,06	0,53
29	0,64	< 0	< 0	0,64	1,23	1,93	0,51
30	0,89	< 0	< 0	0,11	1,25	3,39	0,52
31	0,55	< 0	< 0	0,68	1,44	1,95	0,51
32	0,81	< 0	1	0,81	1,78	2,01	0,53
33	0,48	< 0	< 0	0,51	1,24	2,46	0,51

4. TARTIŞMA

Tekirdağ ili ve çevresinde bal hasadını müteakip, merkez ve merkeze bağlı ilçelerden 33 adet süzme bal örneği toplanmıştır. Örnekler Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesindeki Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi Kütle Spektrometri (HPLC-MS/MS) cihazında, hizmet alımı yoluyla analiz edilmiştir.

Kütle spektrometri dedektöründe, pozitif iyon modunda, ElektroSpray Ionisation (ESI) modülü kullanılarak, MRM (Multiple Reaction Monitoring) modunda analizler gerçekleştirilmiştir.

Numuneler analiz edilmeden önce, kısa metot validasyonu yapılmış, validasyon ile ilgili veriler tablolar halinde sunulmuştur. Neonikotineoid pestisitlere ait, baldaki tespit limitleri, CC_{α} ve CC_{β} değerleri ve linearite çalışmaları maksimum kalıntı limitlerine uygun olarak belirlenmiştir.

Baldaki neonikotinoid pestisitlerin analiz sonuçları tablo 6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre dinotefuran için 0.40-1.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında elde edilen sonuçların 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin altında olduğu, nitenpiram için tespit edilen bir değer olmadığı, tiametoksam için sadece iki numunede 0.07 ve 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ değerlerin tespit edildiği ve bu değerlerin 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin altında olduğu, klotianidin için 0.11-1.58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında elde edilen sonuçların 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin altında olduğu, imidakloprid için 1.21-1.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında elde edilen sonuçların 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin altında olduğu, asetamiprid için 1.93-3.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında elde edilen sonuçların 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin altında olduğu ve tiakloprid için 0.50-0.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında elde edilen sonuçların 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olan MRL değerinin çok altında olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara göre, Tekirdağ ili ve çevresinden toplanan bal örneklerinde, maksimum kalıntı limitleri üzerinde neonikotinoid pestisit kalıntıları içermediği söylenebilir.

Bu sonuçlara paralel olarak, Tekirdağ ve çevresinde neonikotinoid pestisit türü bir ilacın kullanılmadığı düşünülmektedir. Bu duruma, Avrupa'daki bazı ülkelerde neonikotinoid pestisitlerin kullanımının yasaklanması veya kullanımına sınırlamalar getirilmesi nedeniyle, tarımsal ürün yetiştiricilerinin bu tür pestisit kullanımından kaçınması yol açmış olabilir.

Ballarda neonikotinoid pestisit kalıntıları ile ilgili yayınlanmış pek çok çalışma bulunmaktadır, yayınların çoğu metot bilgileri ve metot validasyonu ile ilgili bilgileri

kapsamaktadır. Ballarda neonikotinoid pestisit kalıntısı ile ilgili yapılan tarama çalışmaları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Avusturya’da Gina Tanner ve Christoph Czerwenka tarafından yapılan ve 2011 yılında yayınlanan bir araştırmada, analiz edilen bal örneklerinde asetamiprid, tiakloprid ve tiametoksam kalıntılarına rastlanmıştır, ancak bizim çalışmamıza paralel olarak tespit edilen miktarlar, maksimum kalıntı limiti altında olduğunu belirtmişlerdir. Metot olarak asetonitril ile ekstraksiyondan sonra QuCHERS katı faz ekstraksiyon yöntemini kullanmışlar ve analizleri HPLC-MS/MS cihazında gerçekleştirmişlerdir. Yapmış oldukları validasyon sonuçlarına göre %60-114 arasında geri kazanım oranı, %2.7-12.8 arasında RSD değeri, 2-10 µg/kg arasında tespit limiti değerleri elde ettiklerini belirtmişlerdir (26). Yine metot validasyon değerlerinin, bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz değerlerle paralel olduğu görülmektedir.

Yine benzer şekilde, 2014 yılında yayınlanan ve Konstantinos M. Kasiotis ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Yunanistan’da 2011, 2012 ve 2013 yıllarında farklı bölgelerden toplanan, arı, polen ve bal örneklerinde 115 adet pestisit taraması yapılmış, 32 adet numunede pozitif bulgular elde edilmiştir. Pozitif örnekler, arı ve polen örneklerinde görülürken, bal örneklerinde sadece bir örnekte karbendazim isimli pestisite rastlanmıştır (27).

Fransa’da Marie-Pierre Chauzat ve ark tarafından yapılan, 2009 yılında yayınlanan ve 2002-2005 yıllarını kapsayan üç yıllık bir çalışmada, arı koloni sağlığı üzerine pestisit kalıntılarının etkisi araştırılmıştır. Çalışmada polen, bal, balarısı ve balmumu örnekleri incelenmiş, 185 polen örneğinin %57.3’ünde, 239 bal örneğinin %29.7’sinde ve 187 bal arısı örneğinin %26.2’sinde imidakloprid kalıntısı tespit edilmiştir (28).

Yine 2010 yılında yayınlanan, Christopher A. Mullin ve ark tarafından 2007 ve 2008 yıllarını kapsayan ve Kuzey Amerika’da gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, arı koloni sağlığı üzerinde pestisitlerin etkileri incelenmiş, 208 balmumu örneğinin %1’inde, 350 polen örneğinin %17.7’sinde ve 140 bal örneğinde %0.0 düzeyinde imidakloprid kalıntısı tespit edilmiştir (29).

Yapılan çalışmalara bakıldığında bal örneklerinde neonikotinoid pestisit kalıntısına pek rastlanılmadığı, pozitif sonuçların genellikle bal mumu, polen ve arı örneklerinde tespit edildiği görülmektedir.

5. SONUÇ

Tekirdağ ili ve bağlı ilçe merkezlerinden toplanan 33 adet bal örneklerinde yapılan analiz sonuçlarına göre, maksimum kalıntı limitlerini aşan neonikotinoid pestisit kalıntısı tespit edilmemiştir. Bu sonuçlara göre, Tekirdağ ili ve bağlı ilçe merkezlerinde neonikotinoid pestisit türü bitki koruma ürünlerinin kullanılmadığı sonucu çıkarılabilir. Diğer yandan bu tür bitki koruma ürünlerinin Avrupa'da bazı ülkelerde yasaklanması ve kullanımına sınırlamalar getirilmesi nedeniyle, tarımsal ürün yetiştiricilerinin bu tür bitki koruma ürünlerinin kullanımından kaçınmış olması da düşünülebilir.

Tekirdağ ili ve bağlı ilçe merkezlerinde neonikotinoid pestisit türü bitki koruma ürünlerinin kesin bir şekilde kullanılmadığının ortaya çıkarılması amacıyla çalışmanın, bal mumu, polen, propolis ve bal arısı örneklerini içerecek şekilde daha fazla numune ile yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Kazuhiko Matsuda, Steven D. Buckingham, Daniel Kleier, James J. Rauh, Marta Grauso and David B. Sattelle. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.22 No.11 November 2001. 573-580.
2. Peter Jeschke and Ralf Nauen. Review Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science* 64:1084–1098 (2008).
3. Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013. Amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. *Official Journal of the European Union*. L139/12.
4. Peter Jeschke, Ralf Nauen, Michael Schindler, Alfred Elbert. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journals of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2897-2908. (2011).
5. Elizabeth Grossman. "Declining Bee Populations Pose A Threat to Global Agriculture". *Yale Environment* 360. Yale School of Forestry & Environmental Studies. (2014).

6. Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2010. Imidacloprid Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>.
7. Totan Adak, Jitendra Kumar, N. A. Shakil, S. Walia. Development of controlled release formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* (2012) 47, 217–225.
8. US EPA. Office of Chemical Safety And Pollution Prevention. Benefits of Neonicotinoid Seed Treatments to Soybean Production. 2014.
9. David W. Ragsdale, Douglas A. Landis, Jacques Brodeur, George E. Heimpel and Nicolas Desneux. Ecology and Management of the Soybean Aphid in North America. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 375–99. 2011.
10. E. W. Hodgson, B. P. McCornack, K. Tilmon, and J. J. Knodel. Management Recommendations for Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) in the United States. *J. Integ. Pest Mngmt.* 3(1): 2012.
11. M.E. Schroeder and R.F. Flattum. The mode of action and neurotoxic properties of the nitromethylene heterocycle insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* Volume 22, Issue 2, 148–160. 1984.
12. Motohiro Tomizawa and John E. Casida. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:247-68.
13. Erik Stokstad. Pesticides Under Fire for Risks to Pollinators. *Science* 340:674-76. 2013.
14. Dennis vanEngelsdorp, Jay D. Evans, Claude Saegerman, Chris Mullin, Eric Haubruge, Bach Kim Nguyen, Maryann Frazier, Jim Frazier, Diana Cox-Foster, Yanping Chen, Robyn Underwood, David R. Tarpy, Jeffery S. Pettis. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE.* August 2009, | Volume 4 , Issue 8 , e6481
15. United States Department of Agriculture. Report on the National Stakeholders Conference on Honey Bee Health. National Honey Bee Health Stakeholder Conference Steering Committee. Sheraton Suites Old Town Alexandria Hotel, Alexandria, Virginia. October 15–17, 2012
16. Penelope R. Whitehorn, Stephanie O’Connor, Felix L. Wackers, Dave Goulson. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* 20 April 2012: Vol. 336 no. 6079 pp. 351-352
17. Andrea Tapparo, Daniele Marton, Chiara Giorio, Alessandro Zanella, Lidia Soldà, Matteo Marzaro, Linda Vivan and Vincenzo Girolami. Assessment of the

Environmental Exposure of Honeybees to Particulate Matter Containing Neonicotinoid Insecticides Coming from Corn Coated Seeds. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46 (5), pp 2592–2599

18. Christof W. Schneider, Jürgen Tautz, Bernd Grünewald, Stefan Fuchs. RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera*. PLoS ONE. January 2012 | Volume 7 | Issue 1 | e30023
19. Christian H. Krupke, Greg J. Hunt, Brian D. Eitzer, Gladys Andino, Krispn Given. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. PLoS ONE. January 2012 | Volume 7 | Issue 1 | e29268
20. Researchers: Honeybee deaths linked to seed insecticide exposure. University New Service. Purdue University. <http://www.purdue.edu/newsroom/research/2012/120111KrupkeBees.html>
21. Jeroen P van der Sluijs, Noa Simon-Delso, Dave Goulson, Laura Maxim, Jean-Marc Bonmatin and Luc P Belzunces. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2013, 5:293–305.
22. Gennaro Di Prisco, Valeria Cavaliere, Desiderato Annosciac, Paola Varricchio, Emilio Caprio, Francesco Nazzic, Giuseppe Gargiulo and Francesco Pennacchio. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. November 12, 2013, vol. 110 (46), 18466–18471.
23. Pierre Mineau and Cynthia Palmer. "The Impact of the Nation's Most Widely Used Insecticides on Birds". *Neonicotinoid Insecticides and Birds*. American Bird Conservancy. 19 March 2013.
24. Caspar A. Hallmann, Ruud P. B. Foppen, Chris A. M. van Turnhout, Hans de Kroon, Eelke Jongejans. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*. 14 July 2014.
25. Pavle Jovanov, Valéria Guzsvány, Mladen Franko, Sanja Lazić, Marijana Sakač, Bojana Šarić, Vojislav Banjac. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 111 (2013) 125–133.

26. Gina Tanner and Christoph Czerwenka. LC-MS/MS Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey: Methodology and Residue Findings in Austrian Honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (23), pp 12271–12277
27. Konstantinos M. Kasiotis , Chris Anagnostopoulos , Pelagia Anastasiadou, Kyriaki Machera. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment* 485–486 (2014) 633–642
28. Marie-Pierre Chauzat, Patrice Carpentier, Anne-Claire Martel, Stephanie Bougeard, Nicolas Cougoule, Philippe Porta, Julie Lachaize, Francois Madec, Michel Aubert and Jean-Paul Faucon. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environ. Entomol.* 38(3): 514-523 (2009).
29. Christopher A. Mullin, Maryann Frazier, James L. Frazier, Sara Ashcraft, Roger Simonds, Dennis vanEngelsdorp, Jeffery S. Pettis High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* March 2010 | Volume 5 | Issue 3 | e9754.