NİYAZİ ÜLKÜ

POLEN, PERGA, PROPOLİS VE ARI SÜTÜNDE VETERİNER İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE TESPİTİ İÇİN ÇOKLU GRUP VE ÇOKLU KALINTI TARAMA ANALİZ METODU OLUŞTURULMASI

2026

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLEN, PERGA, PROPOLİS VE ARI SÜTÜNDE VETERİNER İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE TESPİTİ İÇİN ÇOKLU GRUP VE ÇOKLU KALINTI TARAMA ANALİZ METODU OLUŞTURULMASI

NİYAZİ ÜLKÜ

VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bursa 2026

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANA BİLİM DALI

POLEN, PERGA, PROPOLİS VE ARI SÜTÜNDE VETERİNER İLAÇ KALINTILARININ LC-MS/MS İLE TESPİTİ İÇİN ÇOKLU GRUP VE ÇOKLU KALINTI TARAMA ANALİZ METODU OLUŞTURULMASI

Niyazi ÜLKÜ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Mustafa TAYAR

Proje No
TAGEM/HSGYAD/T1/23/A4/P2/6684
Destek Alınan Kuruluş
TAGEM

BURSA-2026

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Polen, Perga, Propolis ve Arı Sütünde Veteriner İlaç Kalıntılarının LC-MS/MS ile Tespiti için Çoklu Grup ve Çoklu Kalıntı Tarama Analiz Metodu Oluşturulması**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Niyazi ÜLKÜ
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Niyazi ÜLKÜ

Ana Bilim Dalı: Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı

Tez Konusu: Polen, Perga, Propolis ve Arı Sütünde Veteriner İlaç Kalıntılarının LC-MS/MS ile Tespiti için Çoklu Grup ve Çoklu Kalıntı Tarama Analiz Metodu Oluşturulması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Prof. Dr. Mustafa TAYAR

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU III
İÇİNDEKİLER IV
TÜRKÇE ÖZET V
İNGİLİZCE ÖZET VI
KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA VII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1.2. Polen 5
2.1.3. Arı ekmeği (Perga) 9
2.1.4. Propolis 12
2.1.5. Arı sütü 13
2.2. Arı Ürünlerinde Veteriner İlaç Kalıntılarının Önemi 15
2.3. LC-MS/MS ile Çoklu Kalıntı Analiz Metodolojisi 16
2.4. Arı Ürünlerinde Veteriner İlaç Kalıntıları 19
3. GEREÇ ve YÖNTEM 31
3.1. LC-MS/MS Koşulları ve Analiz Parametreleri 32
3.2. Kromatografik Ayırma Koşulları 33
3.3. Gradient Programının Optimizasyonu 36
3.4. Çalışmada Kullanılacak Olan Standartların Hazırlanması 38
3.5. Zenginleştirilmiş Örneklerin Ekstraksiyonu 40
3.5.1. Polen ve Perga matrikslerinin ekstraksiyonu 40
3.5.2. Arı Sütü ve Propolis (alkol ve su bazlı) matrikslerinin ekstraksiyonu 41
3.6. Ekstraksiyon Yönteminin Uygunluk Değerlendirmesi 42
3.7. Tarama Metodu Validasyon Parametrelerinin Seçimi 43
4. BULGULAR 47
4.1. Tarama Metodunun Genel Validasyon Performansı 47
4.1.1. Alkol bazlı propolis matriksinde validasyon bulguları 51
4.1.2. Polen matriksinde validasyon bulguları 53
4.1.3. Su bazlı propolis matriksinde validasyon bulguları 55
4.1.4. Arı sütü matriksinde validasyon bulguları 57
4.1.5. Perga matriksinde validasyon bulguları 59
4.2. Matriksler Arası Nicel Karşılaştırma 61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 63
5.1. Tarama Metodunun Genel Validasyon Performansı 63
5.2. Alkol Bazlı Ekstraksiyon Sonrası Propolis Matriksinde Validasyon 64
5.3. Su Bazlı Ekstraksiyon Sonrası Propolis Matriksinde Validasyon 65
5.4. Polen Matriksinde Validasyon 66
5.5. Perga Matriksinde Validasyon 67
5.6. Arı Sütü Matriksinde Validasyon 70
5.7. Matriksler Arası Nicel Karşılaştırma 72
5.8. Sonuç olarak 73
6. KAYNAKLAR 75
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 92
8. TEŞEKKÜR 93
9. ÖZGEÇMİŞ 94

TÜRKÇE ÖZET

Bu doktora çalışmasında, polen, perga, propolis ve arı sütü gibi farklı arı ürünlerinde veteriner ilaç kalıntılarının belirlenmesine yönelik olarak, LC-MS/MS tekniğine dayalı çoklu grup–çoklu kalıntı tarama analiz yönteminin geliştirilmesi ve analitik olarak doğrulanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada bal arısı ürünlerinde antibiyotik taramasına yönelik geliştirilen yöntemin performansı, alkol bazlı propolis, polen, su bazlı propolis, arı sütü ve perga olmak üzere beş farklı matrikste yürütülen validasyon çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Alkol bazlı propoliste 17 analit için boş numune yanıtları (B) 0,046–1,270 µg/kg, eşik seviyeleri (T) 0,145–2,749 ve 10 µg/kg zenginleştirilmiş numunelerde ortalama yanıtlar (M) 9,955–11,468 µg/kg aralığında bulunmuş; Fm değerleri 7,678–10,120 µg/kg olarak hesaplanarak tüm analitlerde Fm>T koşulu sağlanmıştır. Polen matriksinde B 0,020–0,322 µg/kg, T 0,046–0,810, M 8,551–13,572 µg/kg ve Fm 6,153–9,490 µg/kg aralığında belirlenmiştir. Su bazlı propoliste B değerlerinin 0,000–0,490 µg/kg gibi düşük seviyelerde seyretmesi ve M değerlerinin 8,209–10,506 µg/kg aralığında bulunması yöntemin seçiciliğini göstermiştir. Arı sütünde B 0,011–0,364 µg/kg ve M 9,402–11,170 µg/kg olarak elde edilmiş, yüksek protein ve lipid içeriğine rağmen yeterli duyarlılık sağlanmıştır. Perga matriksinde B 0,039–0,663 µg/kg ve M 9,348–13,861 µg/kg aralığında bulunmuş, kompleks yapıya bağlı olarak bazı analitler kapsam dışı kalmıştır. Genel olarak yöntem, valide edilen analitler için tüm matrikslerde STC seviyesinde kabul edilebilir CCβ değerleri sağlayarak bu çalışmada yer alan ürünlerinde antibiyotik taraması için uygulanabilir bir yaklaşım sunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu kalıntı tarama yöntemi, arı ürünlerinde veteriner ilaç kalıntılarının güvenilir şekilde izlenmesine olanak sağlamakta; gıda güvenliği, halk sağlığının korunması ve ulusal izleme çalışmalarına bilimsel katkı sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Arı ürünleri, Veteriner ilaç kalıntıları, LC-MS/MS kalıntı analizi, tarama metot validasyonu

İNGİLİZCE ÖZET

DEVELOPMENT OF A MULTI-GROUP AND MULTI-RESIDUE SCREENING METHOD BY LC-MS/MS FOR THE DETECTION OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN POLLEN, BEE BREAD, PROPOLIS, AND ROYAL JELLY

In this doctoral study, the development and analytical validation of a multi-group, multi-residue screening method based on LC–MS/MS were aimed for the determination of veterinary drug residues in various apicultural products, including pollen, perga, propolis, and royal jelly. The performance of the developed antibiotic screening method was evaluated through validation studies conducted on five different matrices: alcohol-based propolis, pollen, water-based propolis, royal jelly, and perga.

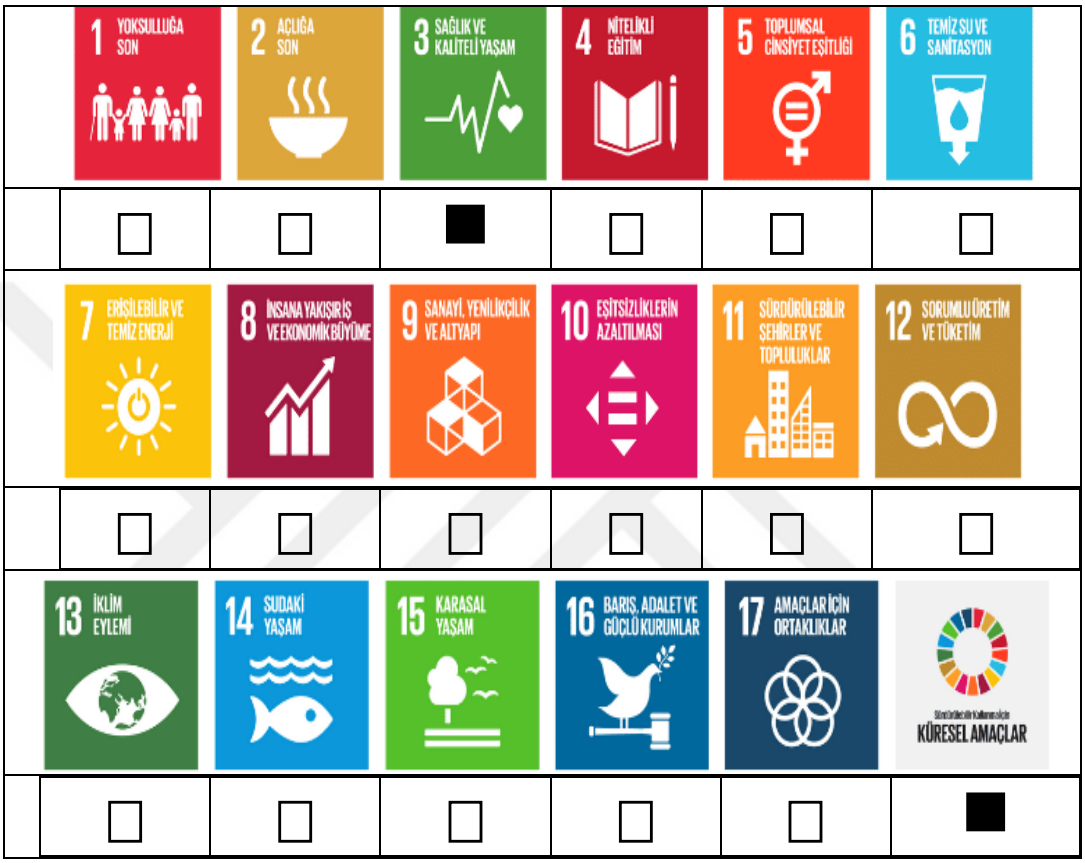
In alcohol-based propolis, blank sample responses (B) for 17 validated analytes ranged from 0.046 to 1.270 μg/kg, threshold values (T) from 0.145 to 2.749 μg/kg, and mean responses (M) of samples fortified at 10 μg/kg from 9.955 to 11.468 μg/kg. Corresponding Fm cut-off values were calculated between 7.678 and 10.120 μg/kg, fulfilling the Fm>T criterion for all analytes. In the pollen matrix, B values ranged from 0.020 to 0.322 μg/kg, T values from 0.046 to 0.810 μg/kg, M values from 8.551 to 13.572 μg/kg, and Fm values from 6.153 to 9.490 μg/kg. In water-based propolis, very low blank responses (0.000–0.490 μg/kg) and fortified sample responses between 8.209 and 10.506 μg/kg demonstrated high selectivity of the method. In royal jelly, B values ranged from 0.011 to 0.364 μg/kg and M values from 9.402 to 11.170 μg/kg, indicating sufficient sensitivity despite the high protein and lipid content of the matrix. In perga, B and M values were found within the ranges of 0.039–0.663 μg/kg and 9.348–13.861 μg/kg, respectively; however, due to pronounced matrix effects, certain analytes could not be validated in this matrix.

Overall, the method provided acceptable CCβ values at the screening target concentration (STC) for all validated analytes across the investigated matrices. Consequently, the LC–MS/MS-based multi-residue screening method developed in this study enables reliable monitoring of veterinary drug residues in apicultural products, contributing scientifically to food safety, public health protection, and national residue surveillance programs.

Keywords: Bee products, Veterinary drug residues, LC-MS/MS residue analysis, Screening method validation

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Doktora tezi olarak sunduğum **"Polen, Perga, Propolis ve Arı Sütünde Veteriner İlaç Kalıntılarının LC-MS/MS ile Tespiti için Çoklu Grup ve Çoklu Kalıntı Tarama Analiz Metodu Oluşturulması"** başlıklı tez **3-1.120.1133** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir

1. GİRİŞ

Arı ürünleri (bal, polen, perga, propolis ve arı sütü) sahip oldukları zengin kimyasal içerikleriyle yalnızca beslenme açısından değil, sağlık ve ekonomi açısından da stratejik bir değer taşımaktadır. Fenolik bileşikler, flavonoidler, serbest şekerler, organik asitler ve proteinler bakımından zengin bu doğal ürünler; güçlü antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuvar özellikleri sayesinde fonksiyonel gıdalarda ve tamamlayıcı tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, arıcılıkta hastalıkların önlenmesi ve tedavisine yönelik yapılan müdahaleler, çevresel kirleticiler ile uygunsuz ve denetimsiz veteriner ilaç kullanımının birleşmesi, bu ürünlerde kalıntı riskini beraberinde getirmektedir. Veteriner ilaç kalıntılarının varlığı, hem gıda güvenliği standartlarını tehdit etmekte hem de antimikrobiyal direnç (antimicrobial rezistance, AMR) gelişimi üzerinden halk sağlığını küresel ölçekte riske atmaktadır. Bu nedenle, arı ürünlerinin güvenilirliğinin sağlanması ve tüketici sağlığının korunması açısından veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesi kritik önemdedir (El-Didamony ve ark., 2024; Khalifa ve ark., 2024).

Her ne kadar birçok ülkede arıcılık faaliyetlerinde antibiyotik kullanımı yasal düzenlemelerle sıkı biçimde kısıtlanmış veya tamamen yasaklanmış olsa da, farklı coğrafyalardan ve ticari piyasalardan elde edilen arı ürünlerinde zaman içerisinde çeşitli antibiyotik gruplarına ait kalıntıların tespit edildiği bildirilmektedir. Özellikle balda antibiyotik kalıntılarının varlığı ve düzeyi; üretim zincirinin yapısı, hijyen uygulamaları ve bölgesel farklılıklar gibi etkenlere bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) temelli analizlerle elde edilen bulgular pozitif ve negatif sonuçlar arasında farklılık göstermiştir. Bu durum, ulusal düzeyde düzenli izleme programlarının yürütülmesini ve çoklu antibiyotik sınıflarını kapsayan, validasyonu tamamlanmış analitik yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır (Canbay & Taşçı, 2024; Gün ve ark., 2024; Rodrigues ve ark., 2024).

Analitik açıdan değerlendirildiğinde, arı ürünleri karmaşık matriks yapıları nedeniyle hassas ve güvenilir kalıntı analizlerinde önemli zorluklar oluşturur. Yüksek şeker ve protein içerikleri, reçineli ve lipofilik bileşenler, pigmentler ve

balmumu gibi matriks öğeleri; özellikle LC-MS/MS analizlerinde iyonizasyon baskılanması ve artan matriks etkilerine yol açarak kantitatif doğruluğu olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, analitik yöntemin başarısı büyük ölçüde örnek hazırlama ve kalibrasyon stratejilerine bağlıdır. Matriks-uyumlu kalibrasyon eğrileri, izotop-işaretli iç standartların kullanımı ve uygun ekstraksiyon tekniklerinin (örneğin modifiye edilmiş Hızlı, Kolay, Ekonomik, Etkili, Dayanıklı ve Güvenli (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe, QuEChERS), sıvı-sıvı ekstraksiyon (Liquid-Liquid Extraction, LLE), dispersif katı faz ekstraksiyon (dispersive Solid Phase Extraction, d-SPE) veya katı faz ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE) seçimi, ölçüm güvenirliğini artırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, her bir arı ürünü matriksi için özgül validasyon parametrelerinin dikkatle belirlenmesi ve uygulanması, yöntemin seçiciliği, doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve tespit sınırları bakımından kritik bir gerekliliktir (Cortese ve ark., 2020).

Avrupa Birliği (European Union, AB/EU), farmakolojik olarak aktif maddelerin gıda ürünlerindeki kalıntılarının kontrolüne ilişkin analitik performans ve sonuçların değerlendirilmesine yönelik güncel yasal çerçeve, Komisyon Uygulama Tüzüğü (Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808) ile tanımlanmaktadır. Söz konusu düzenleme; örnekleme prosedürleri, laboratuvar analizlerinde sağlanması gereken performans kriterleri, karar limitleri (CCα) ve doğrulama gerekliliklerini ayrıntılı biçimde ortaya koymaktadır. Türkiye'de ise arı ürünlerine yönelik kalıntı hükümleri, Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği (2024) kapsamında düzenlenmiş olup, bu metin "Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (07.03.2017-30000 sayılı Resmî Gazete)" mevzuatına doğrudan atıfta bulunmaktadır. Uluslararası ölçekte ise Codex Alimentarius tarafından sağlanan çevrimiçi veritabanları, farklı ülkeler ve ürünler için geçerli MRL değerlerine erişim imkânı sunarak küresel bir referans kaynağı oluşturmaktadır (Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği, 2024).

Bu doktora tezinin temel amacı; polen, perga, propolis ve arı sütü gibi farklı arı ürünlerinde makrolidler, sulfonamidler, kinolonlar (özellikle florokinolonlar), linkomisin (linkozamid) ve trimetoprim gibi veteriner ilaç gruplarını kapsayan çoklu grup–çoklu kalıntı LC-MS/MS tarama yönteminin geliştirilmesi, optimize edilmesi

ve analitik olarak doğrulanmasıdır. Arı ürünlerinin karmaşık matriks yapılarının oluşturduğu analitik güçlüklerin aşılabilmesi için uygun ekstraksiyon tekniklerinin ve matriks-uyumlu kalibrasyon stratejilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Tarama validasyonu ile elde edilecek yöntem sayesinde, arı ürünlerinde veteriner ilaç kalıntılarının güvenilir, tekrarlanabilir ve düzenleyici gerekliliklerle uyumlu biçimde yarı kantitatif olark belirlenebilmesi mümkün olacaktır. Geliştirilecek yöntem, Türkiye'den temin edilen gerçek örneklerde uygulanarak metodun pratik performansı değerlendirilecek; böylece, ulusal izleme çalışmalarına bilimsel dayanak oluşturabilecek, arı ürünlerinin güvenilirliğinin artırılmasına katkı sağlayacak kapsamlı bir analitik yaklaşım ortaya konacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arı Ürünlerinin Önemi ve Kullanım Alanları

2.1.1. Arı ürünleri

Arı ürünleri (polen, arı ekmeği, propolis, arı sütü, arı havası, apilarnil, arı zehiri vb.) besin ve biyoaktif bileşiklerce zengin kompleks matrikslerdir (El Ghouizi ve ark., 2023; Urcan, 2025).

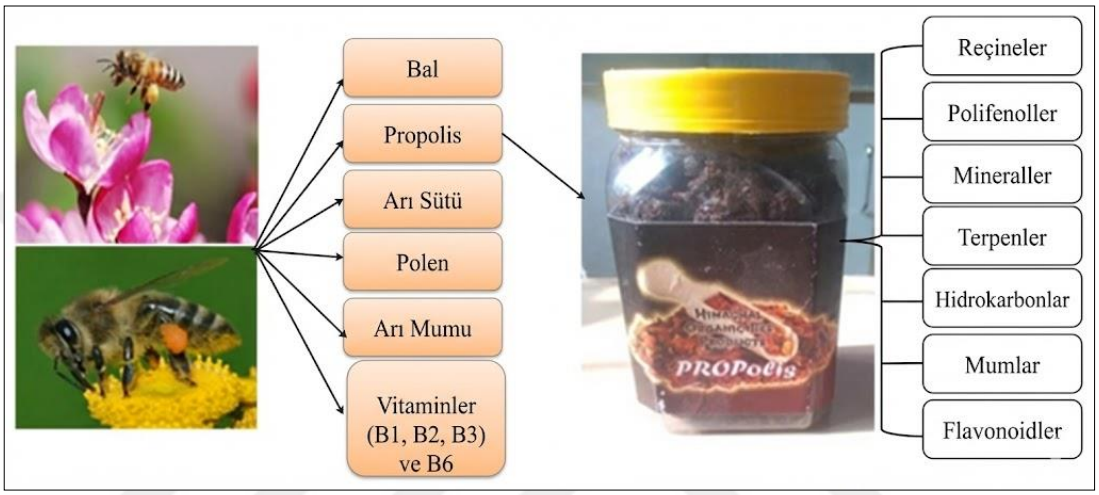
Hayvansal gıdalarda veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesine ilişkin ortak kuralların belirlenmesine dair Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi 2014/63/AB'ye (Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council) göre bal, "bitkilerin nektarından ya da bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitki özsuyunu emen böceklerin bu canlı kısımlarda oluşturduğu salgılardan, *Apis mellifera* türü bal arıları tarafından toplanan, kendi özel salgılarıyla karıştırılarak dönüştürülen, petek gözlerine yerleştirilip dehidrate edilen, depolanan ve olgunlaşmaya bırakılan doğal tatlı bir maddedir" olarak tanımlanmaktadır (European Commission, 2014). Bal, insan tüketimine yönelik olarak doğrudan satıldığında ya da bir gıda ürününde bileşen olarak kullanıldığında, herhangi bir gıda katkı maddesi veya yabancı organik/inorganik madde içermemeli ve aynı zamanda Avrupa Birliği tarafından belirlenen kompozisyon kriterlerine (Tablo 1) uygunluk göstermelidir (European Commission, 2014).

Tablo 1. Balın kompozisyon kriterleri

Kriter	Bal Türü ve İçerik
Fruktoz ve glukoz içeriği	Çiçek balı: ≥ 60 g/100 g Salgı balı veya salgı+çiçek balı karışımı: ≥ 45 g/100 g
Sükroz içeriği	Genel olarak: ≤ 5 g/100 g Bazı spesifik çeşitlerde: ≤ 10-15 g/100 g
Nem içeriği	Genel olarak: < %20 Fundalık (Calluna)
Suda çözünmeyen madde miktarı	Genel olarak: ≤ 0,1 g/100 g Pres balı: ≤ 0,5 g/100 g
Serbest asit miktarı	Genel olarak: ≤ 50 meq/kg
Diastaz aktivitesi (Schade ölçeği)	Düşük doğal enzim içeriğine sahip ballarda ve HMF ≤ 15 mg/kg olanlarda: ≥ 3
Hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği	Tropikal iklime sahip bölgelerden elde edildiği beyan edilen ballar ve bu balların karışımları ≤ 80 mg/kg

Arı poleni; yüksek oranda protein, karbonhidrat, yağ ve diyet lifi yanında vitamin, mineral, fenolik ve uçucu bileşikler içerir (El Ghouizi ve ark., 2023). Arı ekmeği (perga) ise biyolojik olarak polenin fermente halidir ve esas olarak karbonhidrat, protein ve lipit bakımından zengindir; aynı zamanda tüm temel amino

asitler ile B-kompleksi, A, E, K vitaminleri ve Ca, Mg, Fe, K gibi mineralleri içerir (Ćirić ve ark., 2022). Propolis ise bitkilerin genç sürgünlerinden veya yaralanmış, çatlamış bölümlerinden toplanan reçineli maddelerin ortalama (%50 civarı reçine, %30 mum, %10 uçucu yağ, %5 polen ve %5 diğer organikler) karışımıdır (Şekil 1) (Bhatti ve ark., 2024). Bu zengin kompozisyon, arı ürünlerini fonksiyonel gıda olarak önemli kılmaktadır, ancak aynı zamanda veteriner ilaç kalıntısı analizi için de matriks etkileşimleri nedeniyle birtakım zorluk meydana getirmektedir.



Şekil 1. Bitkilerden toplanan reçineli maddelerden elde edilen propolisin oluşumu ve kimyasal bileşenleri

2.1.2. Polen

Arı poleni, bal arılarının çiçeklerden topladığı polen tanelerinin nektar ve arı tükürük salgıları ile birleşerek granüler bir yapı oluşturması sonucu meydana gelen, biyolojik ve besinsel değeri yüksek bir arı ürünüdür (Komosinska-Vassev ve ark., 2021; El Ghouizi ve ark., 2023). Arı poleni; protein, karbonhidrat, lipid ve diyet lifi gibi temel makro besin öğelerinin yanı sıra vitaminler, mineraller ve fenolik bileşikler bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (El Ghouizi ve ark., 2023; Kieliszek ve ark., 2023). Bu kapsamlı besin profili nedeniyle arı poleni, literatürde sıklıkla ‘tam gıda’ veya doğal bir fonksiyonel gıda olarak tanımlanmaktadır (Komosinska-Vassev ve ark., 2021).

Arı poleninin kimyasal kompozisyonu; botanik köken, çiçek türü, coğrafi bölge ve çevresel koşullara bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir (Bhatti ve ark., 2024; El Ghouizi ve ark., 2023). Özellikle vitamin içeriği açısından, farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen arı polenlerinde B grubu vitaminler başta olmak

üzere çeşitli vitaminlerin farklı düzeylerde bulunduğu rapor edilmiştir (Bhatti ve ark., 2024). Bunun yanı sıra, arı poleninin mineral bileşimi incelendiğinde potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi makro mineraller ile demir ve çinko gibi iz elementlerin önemli miktarlarda bulunduğu bildirilmektedir (Kieliszek ve ark., 2023).

Arı poleninin matriks yapısı; yüksek protein içeriği, serbest şekerler ve biyoaktif fenolik bileşiklerin birlikte bulunması nedeniyle oldukça karmaşıktır. Bu durum, analitik çalışmalarda matriks etkilerine neden olmakta ve polen analizlerinde uygun ekstraksiyon ve ayırma yöntemlerinin dikkatle seçilmesini gerekli kılmaktadır (El Ghouizi ve ark., 2023; Pascoal ve ark., 2021). Fenolik bileşikler ve flavonoidler, arı poleninin antioksidan aktivitesinden sorumlu başlıca bileşenler olarak tanımlanmakta olup, bu bileşiklerin serbest radikal süpürücü etkileri ve oksidatif stresin azaltılmasındaki rolleri vurgulanmaktadır (Urcan ve ark., 2022).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, farklı çözücüler ve ekstraksiyon teknikleri kullanılarak elde edilen arı poleni ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirgin şekilde değiştiğini ortaya koymuştur. Polen kaynağı, ekstrakt türü ve kullanılan analitik yöntemler, antioksidan aktiviteyi etkileyen temel faktörler arasında yer almaktadır (Pascoal ve ark., 2021; El Ghouizi ve ark., 2023). Bu özellikleriyle arı poleni, yalnızca besinsel açıdan değerli bir gıda değil, aynı zamanda sağlık destekleyici ve fonksiyonel özelliklere sahip doğal bir biyolojik ürün olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 2. Arı poleninden izole edilen içerikler

Vitaminler	Ülke	Bitkisel Köken	İzolasyon Yöntemleri	Kaynaklar
A, B1, B2, B5, B6, B7, B12, C, E, K2	Türkiye	Rhododendron ponticum monofloral arı poleni	HPLC-FLD, HPLC-UV	(Ecem Bayram, 2021)
β-Karoten, C Vitamini	Portekiz	Polifloral arı poleni: Rubus spp., Castanea sativa, Cytisus spp., Quercus spp., Echium spp., Prunus spp., Leontodon spp., Eucalyptus spp., Erica spp., Cistus spp., Trifolium spp.	β-Karoten: $(NH_4)_2SO_4$; C Vitamini: AOAC yöntemi	(Estevinho ve ark., 2019)
B2, B3, B6, B9	İtalya	Polifloral arı poleni: Prunus, Erica, Brassicaceae, Rubus, Viburnum, Trifolium pratense, Asteraceae, Eucalyptus, Rosa spp.	Floresan spektroskopisi (Toplu analiz)	(Barbieri ve ark., 2020)
B1, B2, B6	Brezilya	Polifloral arı poleni: Arecaceae, Cecropia, Cestrum, Cyperaceae, Eucalyptus, Ilex, Myrcia, Piper, Vernonia, Trema	HPLC	(de Arruda ve ark., 2013)
B3 (Niasin), B6 (Piridoksin), B9 (Folik asit), B12 (Kobalamin)	Suudi Arabistan	Monofloral arı poleni: yonca, hurma, kolza, kabak, ayçiçeği	HPLC	(AL-Kahtani, 2017)
C, E, Provitamin A (β-karoten)	Brezilya	Belirtilmemiş	C Vitamini: AOAC; E Vitamini: HPLC; β-Karoten: OCC	(Melo & Almeida-Muradian, 2010)

Tablo 3. Arı poleninin antioksidan aktivitesi

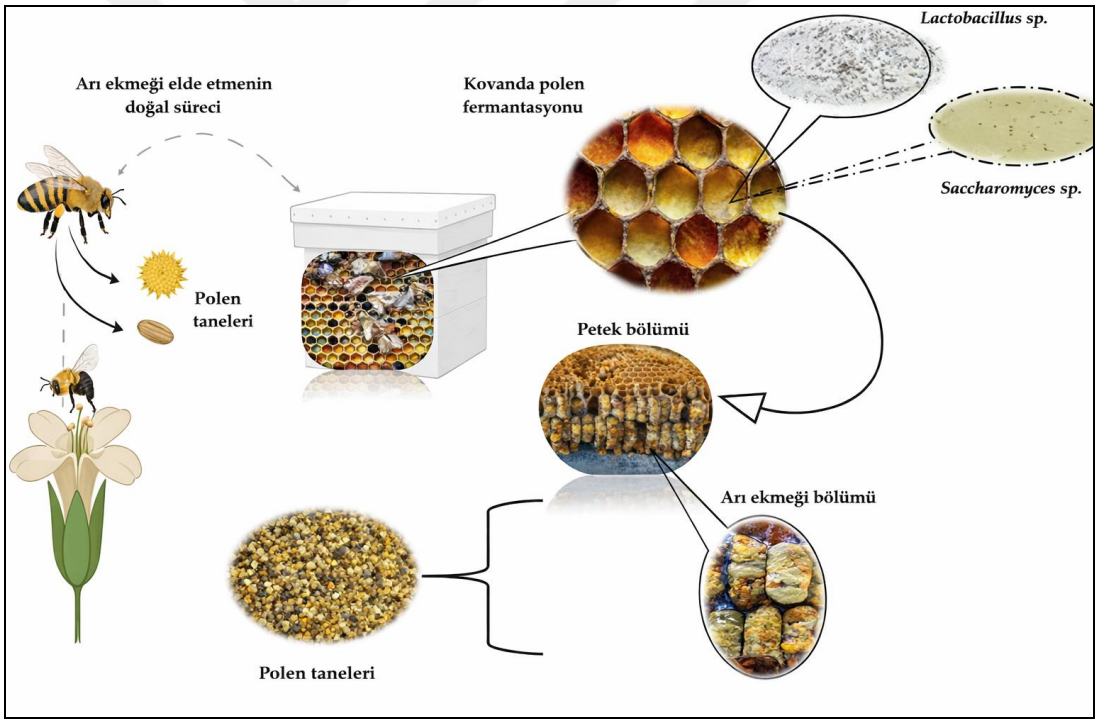
Ülke	Botanik Köken	Ekstrakt Türü	Kullanılan Yöntemler	Temel Bulgular	Kaynak
Fas	Coriandrum sativum	Sulu ekstrakt	DPPH, Ferrik indirgeme gücü, Toplam antioksidan kapasite	IC50 = 0.39 ± 0.13 mg/mL; IC50 = 0.54 ± 0.53 mg/mL; 56.92 ± 0.21 mg AAE/g	(El Ghouizi ve ark., 2020)
Cezayir	Yabani havuç, biberiye, okaliptüs (monofloral)	Metanolik ekstrakt	Molibdat iyon indirgeme tayini	101.58 µg GAE/g	(Rebiai & Lanez, 2012)
Brezilya	Brassica, Eucalyptus, Coffea vb. (monofloral)	Etanolik ekstrakt	DPPH, ORAC	140 ± 5 mmol TE/g; 563 ± 15 mmol TE/g	(De-Melo ve ark., 2018)
Brezilya	Mimosa, Ziziphus, Hyptis vb.	Etanolik ekstrakt	β-karoten ağartma yöntemi	Antioksidan aktivite = %83.3	(Vasconcelos ve ark., 2017)
Şili	Tilia Tuan Szyszyl	Sulu ve metanolik ekstrakt	DPPH, Süperoksit temizleme aktivitesi	IC50 = 1.72–3.48 mg/mL	(Mejías & Montenegro, 2012)
Çin	Çeşitli bitki türleri	Hidroetanolik ekstrakt	ABTS, DPPH, İndirgeme gücü	ABTS: 1.06 mmol TE/g; DPPH: IC50 = 1.28 mg/mL; Aktivite: %70.55	(MONOFLORAL & POLLEN, 2015)
Mısır	Trifolium alexandrinum L.	Etanol, petrol eteri, vb.	DPPH	%63-90 arasında antioksidan aktivite	(AbdElsalam ve ark., 2018)
Türkiye	Centaurea, Lotus, Castanea vb.	Etanolik ekstrakt	ABTS, DPPH	ABTS: 0.373-5.980 mg TEAC/g; DPPH: 1.293–3.85 mg TEAC/g	(Mayda ve ark., 2020)
Polonya	Çeşitli türler	Pepsin ile sindirilmiş ekstrakt	DPPH, ABTS	DPPH: EC50 = 20.91 ± 0.82 µL/mL; ABTS = 1.75 ± 0.02 mmol Trolox/g	(Leja ve ark., 2007)
Sırbistan	Helianthus annuus L.	Metanolik ve etanolik ekstrakt	ABTS, FRAP	ABTS = %95.5; FRAP A700 = 0.738	(Kostić ve ark., 2019)
Slovakya	Brassica, Papaver, Trifolium, vb.	Etanolik ve sulu ekstrakt	ABTS, DPPH	DPPH: %25.96–93.69; ABTS: 0.83-2.08 mmol/L	(Bleha ve ark., 2019)
Tayland	Ticari arı poleni	Etanolik ve sulu ekstrakt	DPPH	Etanolik: 40.69 mg GAE/g; Sulu: 21.27 mg GAE/g	(Futui & Thongwai, 2020)
Bosna-Hersek	Poaceae, Trifolium, Zea mays, Plantago spp.	Metanolik ekstrakt	DPPH, FRAP, ABTS	DPPH IC50 = 1.43 mg/g; FRAP: 4.11 mmol Fe^{2+}/g; ABTS: %86.13	(Aličić ve ark., 2020)

2.1.3. Arı ekmeği (Perga)

Arı ekmeği (perga), işçi arılar tarafından polenin çeşitli biyokimyasal süreçlerden geçirilmesiyle oluşan fermente bir arı ürünüdür (Şekil 2) (Khalifa ve ark., 2020). Polen, kovanda arıların salgıladığı enzimlerle ve nektarla karıştırılarak petek gözlerine yerleştirilir; üzerine bal ve balmumu ile kaplama yapılarak oksijenle teması engellenir ve böylece yaklaşık yedi gün süren anaerobik bir laktik asit fermantasyonu başlatılır (Şekil 3), (Barta ve ark., 2022; Dozuotų & Kūrimas, 2015). Bu biyolojik süreç sonucunda polenin sindirilebilirliği artar, biyoaktif bileşenlerin biyoyararlılığı yükselir ve mikrobiyolojik stabilitesi sağlanır (Ilie ve ark., 2024). Arı ekmeği, karamel benzeri rengi ve çiçek, narenciye ya da diğer meyve aromalarının etkisiyle karakteristik keskin tadıyla tanınır (Anderson ve ark., 2014). Aynı zamanda kovandaki larvalar ve genç işçi arılar için temel besin kaynağını oluşturur (DeGrandi-Hoffman ve ark., 2013). Bileşim açısından değerlendirildiğinde perga; protein (yaklaşık %35'e kadar), serbest amino asitler, temel yağ asitleri, B-kompleksi, C ve E vitaminleri ile potasyum, magnezyum, kalsiyum ve çinko gibi mineraller bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (Komosinska-Vassev ve ark., 2015). Ayrıca fermantasyon süreci, fenolik bileşiklerin profili üzerinde önemli değişimlere neden olmakta; ferulik asit ve kafeik asit gibi biyoyararlılığı yüksek fenolik asitlerin düzeylerini artırmaktadır (Dranca ve ark., 2020). Arı poleni ve arı ekmeği arasındaki biyokimyasal farklılıklar, fermantasyon sürecinin etkisiyle belirgin hale gelmekte olup; protein, karbonhidrat, laktik asit, mineral ve toplam fenolik içerik bakımından karşılaştırmalı veriler Tablo 5'te sunulmaktadır.



Şekil 2. Toplanan arı ekmeği



Şekil 3. Arılar tarafından arı ekmeği üretiminin doğal süreci (BioRender ve King Draw uygulamaları kullanılarak oluşturulan görüntü)

Fonksiyonel özellikleri açısından değerlendirildiğinde, perganın güçlü antioksidan, antimikrobiyal ve immünmodülatör etkiler gösterdiği çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu etkiler özellikle polifenoller, flavonoidler

ve fermantasyon sırasında gelişen laktik asit bakterilerine atfedilmektedir (Alcalá-Orozco ve ark., 2024). Ayrıca, perganın hepatoprotektif ve bağırsak mikrobiyotasını düzenleyici etkiler sunduğu da rapor edilmiştir. Tüm bu biyolojik özellikler, pergayı sadece bir besin maddesi değil, aynı zamanda potansiyel bir farmakolojik ajan ve fonksiyonel katkı maddesi haline getirmektedir (Tablo 4) (Barta ve ark., 2022). Arı ekmeği, içerdiği yüksek oranda protein, doğal şekerler, vitaminler, mineraller ve biyolojik olarak aktif enzimlerle, oldukça zengin ve kompleks bir gıda matriksi oluşturmaktadır (Khalifa ve ark., 2020) (Tablo 5).

Tablo 4. Arı poleni ve arı ekmeği örneklerinin kimyasal ve besin bileşenlerinin karşılaştırılması

Bileşen	**Arı Poleni (BP)**	**Arı Ekmeği (BB)**
Protein	%4,50-40,70	%14-37
Karbonhidrat	%24,0-60,0	%24-74,82
Laktik asit	%0,56	%3,2
Lipit	%1-18	%6-13
Selüloz	%3,7	%2,7
Nükleik asit	%0,6-4,8	n.a.
pH	3,8-6,3	4,3
Lif (fiber)	%0,15-31,26	n.a.
Glukoz	13,41 g/100 g	5,7 ± 0,4 g/100 g
Fruktoz	15,36 g/100 g	11,8 ± 0,6 g/100 g
Sükroz	4,25 g/100 g	n.a.
Potasyum (K)	3,06-13.366,6 mg/kg	338 ± 8 mg/100 g
Fosfor (P)	234,4-9587 mg/kg	251 ± 4 mg/100 g
Kalsiyum (Ca)	1,09-5752,19 mg/kg	198 ± 4 mg/100 g
Magnezyum (Mg)	44,0-4680,53 mg/kg	61 ± 2 mg/100 g
Çinko (Zn)	0,1-105,8 mg/kg	3,31 ± 0,04 mg/100 g
Demir (Fe)	2,6-1180,0 mg/kg	27,3 ± 0,3 mg/100 g
Toplam fenolik içerik	0,69-213,2 mg/100g	9,2 ± 0,1 mg/100g

n.a.: veri bulunmamaktadır

Tablo 5. Arı ekmeğinin kimyasal ve besin bileşenleri

Parametre	**Oran / Değer**
Su içeriği	%5,91
Toplam yağ içeriği	7,79 g/100 g
Toplam protein	Yaklaşık %20 (Lowry ve Bradford yöntemleriyle sırasıyla 21,93 ve 22,12 g/100 g)
Toplam karbonhidrat	%24–35
Monosakkarit oranı	%93,96
Fruktoz	18,95 g/100 g
Glukoz	11,54 g/100 g
Disakkaritler	Turanoz, maltoz, trehaloz ve erloz
Yağ asitleri	Orta zincirli doymuş yağ asitleri (C10-C18), uzun zincirli doymuş yağ asitleri (C20-C24)
Protein türevleri	Peptitler ve amino asitler
Vitaminler	C, B1, B2, E, H, P, K vitaminleri; nikotinik asit, folik asit, askorbik asit, pantotenik asit, niasin, inositol ve pridoksin
Mineraller (25'ten fazla element)	Mg, Ca, K, Zn, Pb, P, Cu, Se ve Fe
Enzimler	Sakaraz, amilaz, fosfataz

Veteriner ilaç kalıntılarının analizinde ise perganın özgün matriks özellikleri dikkate alınması gereken bir durumdur. Yüksek protein ve lipid içeriği, LC-MS/MS yöntemleriyle yapılacak kalıntı analizlerinde matriks etkisine yol açabilmekte; bu nedenle yöntem validasyonunda geri kazanım, seçicilik ve tekrar edilebilirlik gibi parametrelerin pergaya özgü olarak optimize edilmesi gerekmektedir (Jin ve ark., 2017). Özellikle antibakteriyel veteriner ilaçlarının (örneğin tetrasiklinler, sülfonamidler ve kloramfenikol) geçmişte arıcılıkta kullanıldığı bilinmekte ve bu maddelerin, kovanda doğrudan depolanan veya işlenen perga gibi ürünlerde kalıntı olarak bulunabildiği bildirilmektedir (Canbay & Taşçı, 2024; Choi ve ark., 2023; Lozano ve ark., 2019; Varenina ve ark., 2023). Perganın lipofilik bileşikleri absorbe etme kapasitesinin yüksek olması, bu ürünün kalıntı açısından risk taşıyan matrikslerden biri olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. Bu durum, çoklu kalıntı analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde perganın ayrı bir kategori olarak ele alınmasını ve hazırlama protokollerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

2.1.4. Propolis

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından bitkilerin tomurcuk, kabuk ve yaprak yüzeylerinden toplanan reçineli maddelerin balmumu ve arı enzimleri ile karıştırılması sonucu oluşan, koyu renkli ve reçinemsi yapıda doğal bir üründür. Arılar propolisi kovan içi hijyenini sağlamak, mikroorganizmalara karşı savunma oluşturmak ve yapısal onarımlar gerçekleştirmek amacıyla kullanır. Bu özelliği nedeniyle propolis, ‘kovan koruyucu reçine’ anlamına gelen Yunanca kökenli adını da buradan almaktadır (Pasupuleti ve ark., 2017).

Propolisin kimyasal bileşimi, esas olarak toplandığı bitki kaynağı, coğrafi bölgeler, mevsim ve rakıma bağlı olarak büyük çeşitlilik gösterir (Sorucu ve Oruç, 2019). Genel olarak, propolis %50 reçine ve bitki balzamı, %30 balmumu, %10 uçucu yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik bileşenleri içerir (Huang ve ark., 2014). Fenolik bileşikler, flavonoidler, aromatik asitler, esterler ve alkoller propolisin en önemli biyolojik etkilerinden sorumlu olan bileşenlerdir. Özellikle kafeik asit fenetil ester (Caffeic Acid Phenethyl Ester, CAPE), galangin, pinosembrin ve artepilin C gibi bileşikler, antimikrobiyal, antienflamatuar, antioksidan ve antikanser etkiler açısından öne çıkmaktadır (Kurek-Górecka ve ark., 2020).

İnsan sağlığı açısında kullanacağımız propolis genel olarak alkol bazlı (etil alkol, etil alkol-su karışımı ile çözdürerek), su bazlı (su, propolien glikol, gliserin ve laktik asit gibi çözücülerle çözdürerek) ve yağ bazlı (zeytinyağı ve çörekotu yağı ile çözdürerek) olarak üretilmektedir (Oruç ve ark., 2023). Propolisin içeriğinde 300'den fazla aktif maddenin bulunması ve bu bileşimin kaynağına bağlı olarak değişkenlik göstermesi, propolisin bilinçli toplanmasını, uygun ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanmasını ve içerik analizleri yapılarak belirli ölçüde standardize edilmesini gerekli kılmaktadır (Oruç ve ark., 2014).

Veteriner ilaç kalıntıları açısından değerlendirildiğinde, propolisin lipofilik yapısı, özellikle antibiyotikler ve antifungal ajanlar gibi yağda çözünebilen farmasötik bileşiklerin birikimine yatkın hale gelmesine neden olabilir. Ayrıca, arıcılıkta kullanılan topikal ya da sistemik ilaçların propolis yoluyla kontaminasyon riski, hem halk sağlığı hem de ürün güvenliği açısından dikkatle değerlendirilmelidir (da Silva Frozza ve ark., 2013). Son yıllarda, LC-MS/MS gibi yüksek hassasiyetli analitik yöntemler sayesinde propolis matriksinde çok sayıda veteriner ilaç kalıntısının eşzamanlı olarak taranması mümkün hale gelmiştir. Ancak propolisin kompleks matriks özellikleri (yüksek fenolik içerik, balmumu fraksiyonu, reçinemsi yapı) nedeniyle örnek hazırlama adımları, özellikle temizleme (clean-up) ve matriks etkilerinin minimize edilmesi açısından kritik önemdedir (Karagecili ve ark., 2023).

2.1.5. Arı sütü

Arı sütü, genç işçi arılar (Apis mellifera) tarafından hipofaringeal ve mandibular bezlerinden salgılanan, kremsi kıvamda, beyazımsı sarı renkte ve hafif asidik karakterde olan bir arı ürünüdür. Arı kolonisinde larva beslenmesinde kritik rol oynamakta olup, özellikle kraliçe arıların larvalarının gelişiminde ve kraliçe arı olduktan sonra yaşam boyu kullandığı temel gıda maddesidir. İşçi larvalar sadece üç gün süreyle arı sütüyle beslenirken, kraliçe arılar yaşamları boyunca bu maddeyle beslenmektedir. Bu durum, kraliçe arının gelişimsel farklılıklarını, yaşam süresini ve üreme kapasitesini belirleyen temel biyolojik mekanizmalardan biridir (Kunugi & Mohammed Ali, 2019).

Arı sütü; su (%60–70), protein (%9–18), şeker (%10–18), lipit (%3–8) ve mineral maddelerden oluşur. En önemli biyolojik bileşenlerinden biri, yalnızca arı sütünde bulunan 10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA)'dir. Bu bileşik, antioksidan,

antitümör, immünomodülatör ve antimikrobiyal aktiviteler gibi geniş biyolojik etkilerden sorumludur. Ayrıca arı sütünde bulunan major royal jelly proteinleri (MRJP 1-9), arı gelişimi üzerinde epigenetik etkiler yaratmakta ve potansiyel farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Ahmad ve ark., 2020; Yang ve ark., 2018).

Veteriner ilaç kalıntıları açısından değerlendirildiğinde, arı sütü yüksek biyolojik aktivitesi ve yoğun protein içeriği nedeniyle lipofilik ve hidrofilik kalıntıların birikimine açık bir gıda matriksidir. Ancak, arı sütü için birçok ülkede MRL tanımlanmamış olup, bu durum gıda güvenliği açısından belirsizlikler yaratmaktadır (Wojtacka, 2024). Özellikle antibiyotiklerin izinsiz veya kontrolsüz kullanımı sonucu oluşabilecek kalıntıların LC-MS/MS gibi yüksek duyarlılığa sahip yöntemlerle analiz edilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca, arı sütü matriksi, yüksek protein ve yağ içeriği nedeniyle ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinde özel dikkat gerektirmektedir. Bu kapsamda, arı sütünde oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisiklin kalıntılarının belirlenmesi amacıyla protein uzaklaştırma, ekstraksiyon ve SPE temizleme basamaklarını içeren, düşük tespit limitlerine ve kabul edilebilir geri kazanım oranlarına sahip LC-MS/MS tabanlı doğrulayıcı bir analiz yöntemi geliştirilmiştir (Xu ve ark., 2008).

Bilindiği üzere, sıradan bir tüketici, gıda veya tıbbi ürünlerin güvenliğinin, daha önceden oluşturulmuş yasal düzenlemeler ve standartlara dayalı olarak uygun yetkili merciler tarafından sağlandığını varsaymaktadır. Bu düzenlemeler arasında valide edilmiş kimyasal analiz yöntemleri ve belirlenmiş MRL'ler yer almakta olup; MRL'ler, gıda veya yem içerisinde bulunan bir pestisit kalıntısının, tüketiciyi korumak için gerekli olan en düşük maruziyet düzeyini ifade eden yasal üst sınırı tanımlar (European Commission, 2024). Avrupa Birliği mevzuatı temel alındığında, arıcılık ürünleri bal ve dört diğer ürün grubu olarak sınıflandırılabilir: balmumu, arı sütü, propolis ve polen. Bu ürünler arasında yalnızca propolis için doğrudan gıda amaçlı ve gıda dışı kullanım ayrımı yapılmaktadır (European Commission, 2013). AB düzeyinde arı ekmeği ile ilgili herhangi bir düzenleyici ifade bulunmamaktadır; bu ürün genellikle 'diğer arıcılık ürünleri' kategorisine dahil edilmektedir (European Commission, 2024). Bu düzenlemeler, ürünlerin standart kalite ve güvenlik koşullarını sağlamasını ve insan sağlığına zarar vermemesi gerektiğini güvence altına

almaktadır (European Commission, 2002). Dolayısıyla bu ürünlerin, ilgili MRL düzeylerinde herhangi bir kalıntı içermemesi zorunludur.

2.2. Arı Ürünlerinde Veteriner İlaç Kalıntılarının Önemi

Veteriner ilaç kalıntıları, özellikle antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerinde oluşturdukları seçilim baskısı yoluyla AMR riskini artırmaktadır. Bu durum, insan-hayvan-çevre etkileşimini bütüncül biçimde ele alan Tek Sağlık (One Health) yaklaşımının önemini açıkça ortaya koymaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, pek çok bakteride direnç oranlarının kritik seviyelere ulaştığını ve uygunsuz antibiyotik kullanımının küresel ölçekte ciddi bir tehdit oluşturduğunu rapor etmektedir. Bu çerçevede, gıda kaynaklı antibiyotik kalıntılarına maruziyetin azaltılması, AMR ile mücadelenin tamamlayıcı ve stratejik unsurlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Bank; Murray ve ark., 2022; Wu & Zeng, 2024).

Bazı antibiyotikler için MRL değerleri belirlenmişken, kloramfenikol ve nitrofuranlar gibi belirli maddeler ise ‘yasaklı’ sınıfta yer almakta ve bu maddeler için herhangi bir düzeyde kalıntı kesinlikle kabul edilmemektedir. Söz konusu sınıflandırma, Avrupa Birliği mevzuatında 37/2010 sayılı komisyon düzenlemesi ile net biçimde tanımlanmış, ayrıca ulusal rehberlerle desteklenmiştir. Bununla birlikte, özellikle β-laktam antibiyotikleri gibi bazı gruplara bağlı olarak alerjik bireylerde hipersensitivite riskinin bulunması, kalıntıların halk sağlığı açısından taşıdığı önemi daha da artırmaktadır (European Commission, 2010).

Avrupa Birliği’nin Gıda ve Yem Hızlı Uyarı Sistemi (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) kayıtlarında, bal ve diğer arı ürünlerine ilişkin uyarıların önemli bir bölümünü veteriner ilaç kalıntıları oluşturmaktadır. 2002-2022 yılları arasındaki verilerin ayrıntılı analizine göre, bal kaynaklı RASFF bildirimlerinde veteriner ilaç kalıntıları yaklaşık %80 oranla başlıca tehlike kategorisini temsil etmektedir. Bu bulgu, sınır kontrollerinde ve uluslararası ticaret akışlarında karşılaşılan uygunsuzlukların büyük ölçüde veteriner ilaç kalıntılarından kaynaklandığını göstermektedir. Öte yandan, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi’nin (European Food Safety Authority, EFSA) 2022 yılına ait resmi kontrol raporları, genel uygunluk oranlarının görece yüksek olduğunu ortaya koymakla birlikte, veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesinde kalıcı dikkat ve düzenli kontrollerin gerekliliğini vurgulamaktadır (Eissa & Taha, 2023).

Arı ürünlerinde yapılan çalışmalar, makrolitler (ör. eritromisin, tylosin), sulfonamitler (ör. sulfadimidine), kinolonlar (ör. enrofloxacin, ciprofloxacin), linkozamide (lincomycin) ve trimethoprim gibi antibiyotik kalıntılarının tespit edilebildiğini göstermektedir. Makrolitler, çeşitli bal örneklerinde özellikle eritromisin ve tylosin A/B olarak bulunmuş ve veteriner kullanım veya kontrolsüz uygulamalardan kaynaklanan kalıntılar oluşturmuştur (Rodrigues ve ark., 2024). Sulfonamitler, örneğin sulfadimidine, bazı bal örneklerinde pozitif bulunmuş ve örneklerin %10–100'ünde tespit edilmiştir (Gün ve ark., 2023). Kinolonlar, özellikle fluoroquinolone grubu olan enrofloxacin ve ciprofloxacin, farklı saha çalışmalarında 1,4–354,5 µg/kg aralığında kalıntı oluşturduğu raporlanmıştır (Emir ve ark., 2024). Lincomycin, linkozamide grubuna ait olarak bazı örneklerde pozitif bulunurken, trimethoprim ise analitik hedef olarak çalışmaların çoğunda yer almış, pozitif saha örnekleri nadiren raporlanmıştır (Rodrigues ve ark., 2024). Bu bulgular, arı ürünlerinde çok sınıflı antibiyotik kalıntılarının mevcut olabileceğini ve hem üretim hem de ticari ürün güvenliği açısından saha tabanlı analizlerin önemini ortaya koymaktadır.

2.3. LC-MS/MS ile Çoklu Kalıntı Analiz Metodolojisi

Günümüzde sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS), arı ürünleri gibi kompleks gıda matrikslerinde çoklu kalıntı analizleri için en yaygın tercih edilen yöntem konumundadır. LC-MS/MS sistemlerinin sağladığı yüksek duyarlılık ve seçicilik, bal, polen, propolis ve arı sütü gibi ürünlerde farklı ilaç gruplarının eşzamanlı olarak ve düşük konsantrasyon düzeylerinde taranmasına olanak tanımaktadır. Literatürde geliştirilen çok sınıflı analiz yöntemleri, tek bir ekstraksiyon protokolünü takiben sulfonamidler, makrolidler, kinolonlar, tetrasiklinler ve nitroimidazoller gibi antibiyotik gruplarını aynı koşuda güvenilir biçimde tespit edebilmektedir (Pasho ve ark., 2025; Zhang ve ark., 2019).

Bal dışındaki arı ürünleri (polen, perga, propolis ve arı sütü) karmaşık matriks yapıları nedeniyle kalıntı analizlerinde en zorlu sistemler arasında yer almaktadır. Bu ürünlerde görülen belirgin matriks etkileri ve geri kazanım belirsizlikleri, analitik ölçümlerin doğruluğu ve sonuçların yorumlanmasında kritik rol oynamaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda hem bal hem de diğer arı ürünlerine yönelik çok sınıflı LC-MS/MS yöntemleri hızla gelişmiş; makrolidler, sulfonamidler,

(fluoro)kinolonlar, linkozamidler ve trimetoprim gibi antibiyotik gruplarını eşzamanlı kapsayacak şekilde kapsamı genişletilmiştir. Bu metodolojik ilerlemeler sayesinde, arı ürünlerinde kalıntı analizlerinin güvenilirliği artmış ve gerçek pozitiflik oranlarının daha doğru biçimde ortaya konulması mümkün hale gelmiştir (Brandi ve ark., 2024; Yang ve ark., 2022). Örneğin, bir çalışmada LC-MS/MS kullanılarak bal, arı sütü ve propoliste sekiz farklı kinolon türevinin eşzamanlı tayinine yönelik QuEChERS temelli bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemle 0,2-4 µg/kg düzeyinde tespit sınırlarına ulaşılmış ve ticari numunelerde kalıntı taraması başarıyla gerçekleştirilmiştir (Lombardo-Agüí ve ark., 2012). Ayrıca literatürde sulfonamid, makrolid, tetrasiklin ve diğer antibiyotiklerin balda belirlenmesi amacıyla çeşitli LC-MS/MS, Florasan Dedeksiyonlu Sıvı Kromatografisi (Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, LC-FLD,) ve Ultraviyole Dedeksiyonlu Sıvı Kromatografisi (Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection, LC-UV) tabanlı analizler rapor edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Balda antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılan örnek hazırlama ve analitik teknikler

Analit(ler)	Örnek hazırlama yöntemi	Geri kazanım (%)	Analiz yöntemi	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Referanslar
Sulfonamidler	Hidroliz/LLE	44–73	LC-MS²	–	–	(Verzegnassi ve ark., 2002)
	Hidroliz/LLE/SPE	38–116	LC-FLD, post-column derivatization	1–2	2–5	(Maudens ve ark., 2004), (Posyniak ve ark., 2008)
	Çözündürme/LLE/SPE	80–125	LC-MS²	7–12	–	(Tamošiūnas & Padarauskas, 2008)
	Homojenizasyon/LLE/SPE	65–86	LC-UV	0.3–0.4	1.5–2.2	(Sun ve ark., 2007)
	Çözündürme/SPE	74–94	LC-FLD	2–5	5–10	(Pang ve ark., 2003)
	Hidroliz	56–96	LC-FLD	–	4–15	(Bernal ve ark., 2009; Thompson & Noot, 2005)
	Hidroliz/çevrim içi ekstraksiyon/SPE	–	LC-MS²	0.5–2	–	(Thompson & Noot, 2005)
Çoklu antibiyotikler	Çözündürme/çevrim içi ekstraksiyon	–	LC-MS²	0.5–10	–	(Aguilera-Luiz ve ark., 2013)
	Çözündürme/LLE	–	LC-MS²	27–81	–	(Hammel ve ark., 2008)
	Çözündürme/SPE	65–104	LC-MS²	< 2	< 7	(Debayle ve ark., 2008), (Lopez ve ark., 2008)
	Çözündürme/SPE	> 50	LC-MS²	0.1–1	< 4	(Vidal ve ark., 2009)
Makrolidler	Çözündürme/SPE	42–136	LC-MS²	–	–	(Wang, 2004)
Tetrasiklinler	Çözündürme/çevrim içi ekstraksiyon/SPE	84–121	LC-UV	5–12	17–40	(Li ve ark., 2008)
	MISPE	95–103	LC-MS²	0.1–0.3	0.2–1.1	(Jing ve ark., 2009)
	Çözündürme/SPE	72–98	LC-MS², LC-UV	0.02–1.1	–	(Carrasco-Pancorbo ve ark., 2008)
	Çözündürme/SPE	95–105	LC-RRS	0.4–1	–	(Wang ve ark., 2008)
	Çözündürme/OCLLE	–	LC-CL, LC-UV	0.02–0.1	–	(Wan ve ark., 2005)
Aminoglikozidler	Çözündürme/SPE	81–84	LC-MS²	–	2	(van Bruijnsvoort ve ark., 2004)
Kloramfenikol	Çözündürme/LLE/SPE	64–74	LC-MS²	0.2	0.5	(Ortelli ve ark., 2004)
	Çözündürme/QuEChERS/dSPE	78–92	LC-MS	0.002	0.006	(Pan ve ark., 2006)
Kloramfenikol + Sulfonamidler	Homojenizasyon/SPE	45–85	LC-MS²	0.2–5	0.6–15	(Sheridan ve ark., 2008)
Kloramfenikol, Florfenikol, Tiamfenikol	LLE/SPE	75–107	LC-MS²	0.02–0.2	0.1–20	(Bargańska ve ark., 2011)
Tiamulin	Homojenizasyon/SPE	88–106	LC-UV ve LC-MS	29–35 ve 0.5–1.2	101–122 ve 1.4–4	(Nozal ve ark., 2006)
Streptomisin	Çözündürme/SPE	94–109	LC-MS²	3–5	–	(Granja ve ark., 2009)
Tylosin	Çözündürme/LLE/SPE	94–113	LC-MS²	–	–	(Benetti ve ark., 2004)

Kısaltmalar: CL, Kemilüminesans dedektörü; dSPE, Dağıtıcı katı faz ekstraksiyonu; FLD, Floresan dedektörü; LC, Sıvı kromatografisi; LC-MS, Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi; LC-MS², Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi; LLE, Sıvı-sıvı ekstraksiyonu; LOD, Tespit limiti; LOQ, Kantitasyon limiti; MISPE, Moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu; OCLLE, Kolon üzerinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu; RRS, Rayleigh rezonans saçılım dedektörü; SPE, Katı faz ekstraksiyonu; UV, Ultraviyole dedektörü; QuEChERS, Hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli ekstraksiyon.

2.4. Arı Ürünlerinde Veteriner İlaç Kalıntıları

Arı ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının varlığı; arıcılıkta doğrudan antibiyotik kullanımı, çevresel kontaminasyon, ülkeler arasındaki mevzuat farklılıkları ve uygulanan hastalık kontrol stratejileriyle yakından ilişkilidir. Amerikan Veteriner Hekimler Birliği (AVMA) rehberinde belirtildiği üzere, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada gibi bazı ülkelerde oksitetrasiklin, tilosin ve lincomisin gibi antibiyotikler veteriner hekim kontrolünde sınırlı şekilde kullanılabilmekteyken, Avrupa Birliği'nde balda kalıntı riski nedeniyle arılarda antibiyotik kullanımına izin verilmemekte ve 'sıfır tolerans' yaklaşımı benimsenmektedir (Richards ve ark., 2021). Mosca ve ark. (2025) yapmış olduğu bir çalışmada, küresel ölçekte arıcılıkta en sık kullanılan antibiyotik gruplarının tetrasiklinler, sülfonamidler, aminoglikozidler ve makrolidler olduğu; bu kullanımın özellikle Asya ve gelişmekte olan ülkelerde yoğunlaştığı vurgulanmıştır (Mosca ve ark., 2025). Bu bulgular, bal ve diğer arı ürünlerinde tespit edilen antibiyotik kalıntılarının yalnızca yerel üretim uygulamalarına değil, aynı zamanda küresel veteriner ilaç kullanım politikalarına ve çevresel maruziyetlere bağlı olarak şekillendiğini ortaya koymakta; sürdürülebilir arıcılık ve gıda güvenliği açısından kalıntı oluşumunun önlenmesine yönelik bütüncül yaklaşımların gerekliliğini açıkça göstermektedir.

2002-2022 yılları arasında AB ülkelerinde RASFF veri tabanında yer alan bal ürünlerine ilişkin bildirimler incelenmiş ve tehlike kategorileri açısından değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde toplam 388 bildirimin 309'unun (%79,64) izinsiz veteriner ilaç kalıntılarına ilişkin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Bu bulgu, balda veteriner ilaç kalıntılarının en sık bildirilen kontaminasyon kaynağı olduğunu göstermektedir. Diğer bildirilen tehlike kategorileri arasında taklit/tağşiş (%5,15), yabancı madde (%2,83), pestisit kalıntıları (%2,58) ve yetersiz kontrol uygulamaları (%2,58) yer almıştır. RASFF bildirimlerinde en sık bildirilen menşe ülkeler arasında Çin (%25,77), Türkiye (%6,44), Ukrayna (%6,19), Arjantin (%6,19) ve Bulgaristan (%5,67) öne çıkmaktadır. Bildirimde bulunan ülkeler bakımından ise Almanya, Birleşik Krallık, İspanya, İtalya ve Belçika ilk sıralarda yer almıştır (Şekil 5). Bildirimlerin %22,68'inin 'uyarı', %12,37'sinin ise 'sınırda ret' olarak sınıflandırılması, kontaminasyonun ticari boyutunu da ortaya koymaktadır. Veteriner ilaç kalıntılarının sıklığı ve konsantrasyon düzeyleri incelendiğinde; kloramfenikol

(%25,26; 172,10 ± 827,92 µg/kg), streptomisin (%12,11; 104,94 ± 209,44 µg/kg), sülfatiazol (%9,54; 52,31 ± 52,62 µg/kg), tilosin (%4,90; 9,03 ± 11,23 µg/kg) ve sülfadimidin (%4,64; 254,99 ± 587,00 µg/kg) gibi maddelerin ön planda olduğu görülmektedir. Bu bileşiklerin arı hastalıklarıyla mücadelede uygunsuz şekilde kullanıldığı düşünülmektedir. Dolayısıyla, bal üretiminde veteriner ilaç kalıntılarının azaltılmasına yönelik daha sıkı düzenlemelere ve denetimlere ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Eissa & Taha, 2023).

Arıcılıkta antibiyotik kullanımı, yalnızca balda veteriner ilaç kalıntıları açısından değil, aynı zamanda çevresel yayılım ve antimikrobiyal direnç gelişimi bakımından da önemli bir risk unsuru olarak değerlendirilmektedir. Özellikle Amerikan yavru çürüklüğü (AFB) ve Avrupa yavru çürüklüğü (EFB) gibi hastalıkların kontrolünde kullanılan oksitetrasiklin (OTC), dünya genelinde bal arılarında en yaygın uygulanan antibiyotiklerden biridir (Okamoto ve ark., 2021; World Organisation for Animal Health [WOAH], 2025). Avrupa Birliği'nde antibiyotiklerin bal arılarında kullanımı sıkı biçimde düzenlenmiş olmasına rağmen, bazı veteriner tıbbi ürünleri farklı ülkelerde ruhsatlı olarak kullanılmakta ve bu durum kalıntı riskini artırmaktadır (European Commission, 2001; Jończyk-Matysiak ve ark., 2020).

Bal arılarına uygulanan antibiyotiklerin yalnızca balda değil; arı sütü, balmumu ve propolis gibi diğer arı ürünlerinde de kalıntı bırakabildiği bildirilmiştir (Thanasarakhan ve ark., 2011). Gıda yoluyla alınan oksitetrasiklin kalıntılarının insanlarda alerjik reaksiyonlar, gastrointestinal bozukluklar, disbiyoz ve karaciğer hasarı gibi sağlık sorunlarına yol açabileceği; ayrıca gelişmekte olan kemik ve diş dokularında birikebildiği belirtilmektedir (Medhi ve ark., 2012; Olatoye ve ark., 2010). Bununla birlikte, çevrede kalıcı olan antibiyotik kalıntıları, AMR gelişimini tetikleyerek hem insan hem de hayvan sağlığı açısından küresel bir tehdit oluşturmaktadır (Fuselli ve ark., 2019; Holm ve ark., 2015; Medhi ve ark., 2012; Mosca ve ark., 2022).

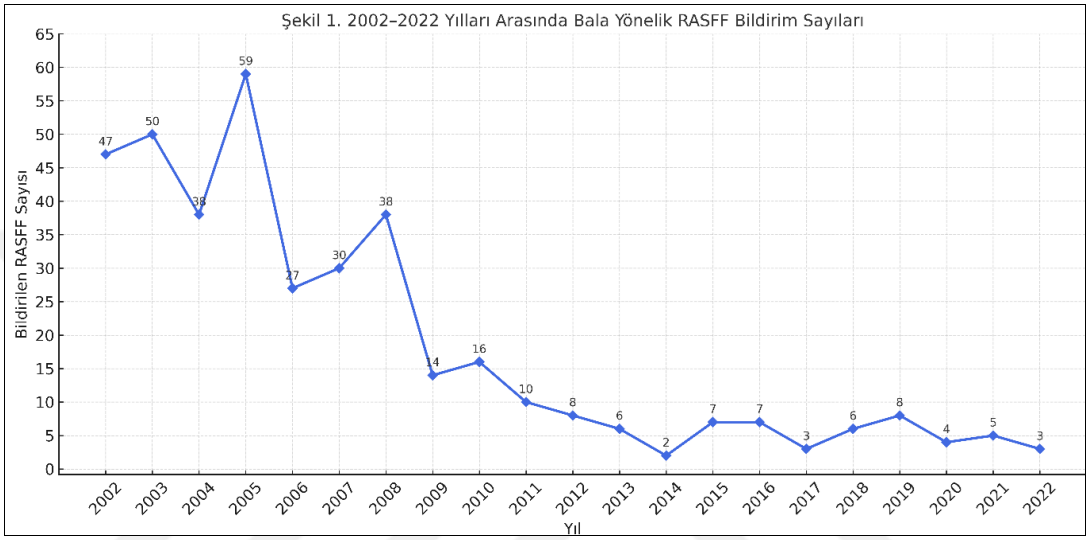
Antibiyotik kalıntılarının yalnızca balda değil, polen gibi diğer arı ürünlerinde de yaygın olarak tespit edilebildiği bildirilmektedir. Polen, arıların geniş bir çevresel alandan topladığı kaynakların birikimi sonucu oluştuğu için çevresel kontaminasyona karşı hassas bir matriks olarak değerlendirilmektedir. Bu kapsamda, çalışma kapsamında makrolid (roxithromycin, anhydroerythromycin A, erythromycin, tylosin

A ve tylosin B), tetrasiklin (tetracycline, oxytetracycline, doxycycline ve chlortetracycline), florokinolon (ciprofloxacin ve enrofloxacin) ve sülfonamid (sulfathiazole ve sulfamethazine) gruplarına ait antibiyotikler analiz edilmiş olup, CCα değerleri 5,9-6,5 µg/kg ve CCβ değerleri 6,4-7,6 µg/kg aralığında belirlenmiştir. Polen örneklerinde makrolidler, tetrasiklinler, florokinolonlar ve sülfonamidler gibi farklı antibiyotik sınıflarının eş zamanlı analizine yönelik LC-MS/MS temelli çoklu kalıntı yöntemlerinin geliştirildiği; gerçek numune analizlerinde incelenen polen örneklerinin büyük bir kısmında antibiyotik kontaminasyonu saptandığı ve özellikle oksitetrasiklin, sülfametazin ve anhidroeritromisin kalıntılarının öne çıktığı rapor edilmiştir. Bu bulgular, polenin de bal gibi gıda güvenliği kapsamında izlenmesi gereken önemli bir arı ürünü olduğunu göstermektedir (Uzunöner ve ark., 2019).

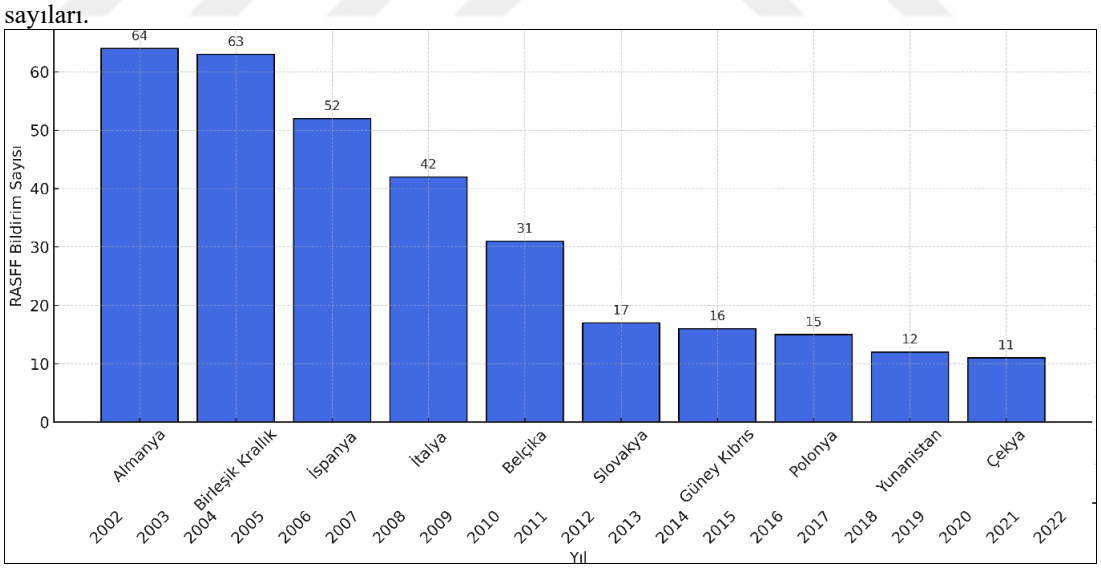
Tek Sağlık yaklaşımı çerçevesinde yürütülen güncel bir çalışmada, bal arılarına uygulanan OTC tedavisinin yalnızca hedeflenen kovanları değil, aynı arılıktaki tedavi edilmeyen kovanları ve çevresel bileşenleri de etkilediği ortaya konmuştur. Çalışmada, OTC ile tedavi edilen kovanlardan elde edilen balda yüksek düzeylerde antibiyotik kalıntıları saptanırken, tedavi edilmeyen kovanlardan alınan balda da OTC varlığı tespit edilmiş ve bu durum çapraz kontaminasyonun varlığına işaret etmiştir. Ayrıca, badem ağacı çiçeklerinde OTC kalıntılarının bulunması, antibiyotiklerin arılar aracılığıyla çevreye taşındığını göstermektedir (Piva ve ark., 2020; Resci ve ark., 2023; Savarino ve ark., 2020).

Aynı çalışmada hem tedavi öncesinde hem de sonrasında bal arısı örneklerinde ve çevresel numunelerde farklı tetrasiklin direnç genlerinin (*tet(K), tet(L), tet(M), tet(B), tet(O), tet(D)*) tespit edilmesi, arıcılık uygulamalarının çevresel direnç gen havuzuna katkıda bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bal arısı bağırsak mikrobiyotasında tespit edilen direnç genleri, antibiyotik uygulamalarının mikrobiyal dengeyi bozduğunu ve direnç rezervuarlarının oluşmasına zemin hazırladığını göstermektedir (Carlo ve ark., 2020; Reygaert 2018; Tian ve ark., 2012). Bal arılarının geniş uçuş menzili ve sosyal yapısı, bu direnç genlerinin çiçek mikrobiyomu ve çevresel bakteriler arasında yatay gen transferi yoluyla yayılmasını kolaylaştırabilecek önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Piva ve ark., 2020; Resci ve ark., 2023; Savarino ve ark., 2020).

Bu bulgular, arıcılıkta antibiyotik kullanımının yalnızca balda veteriner ilaç kalıntıları sorununa değil, aynı zamanda çevresel kontaminasyon ve antimikrobiyal direnç yayılımına da katkıda bulunduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, sürdürülebilir arıcılık uygulamaları kapsamında antibiyotiksiz hastalık yönetim stratejilerinin geliştirilmesi ve veteriner ilaç kullanımına yönelik denetimlerin Tek Sağlık yaklaşımı doğrultusunda güçlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır.



Şekil 4. 2002–2022 yılları arasında AB RASFF kapsamında bal ürünlerine yönelik yapılan bildirim sayıları.



Şekil 5. 2002–2022 yılları arasında Avrupa Birliği Gıda ve Yem Hızlı Uyarı (RASFF) sisteminde bal ürünlerine ilişkin en fazla bildirimde bulunan ilk 10 ülke.

EFSA tarafından yayımlanan 2021 yılı izleme raporuna göre, Avrupa Birliği (AB), İzlanda, Norveç ve Birleşik Krallık (Kuzey İrlanda) genelinde örnekler analiz edilmiştir. AB'de EFSA'nın yıllık raporlarında bal, antibiyotik kalıntıları açısından

en yüksek uygunsuzluk oranına sahip ürün olmuştur: 2021 veri setinde bal örneklerinin %0.96'sında antibiyotik kalıntısı bulunmuştur (Authority ve ark., 2023).

Veteriner ilaçların arı ürünlerine geçişi birçok faktöre bağlıdır. İlacın kimyasal özellikleri (suda çözünürlük ve yağda çözünürlük), bal süzüm işlemleri, kovan içi dağılım ve depolama koşulları önemlidir. Örneğin lipofilik ilaçlar balmumunda birikir ve petekten bala geçebilir. Mitrowska ve ark. (2024) bir model deneyde, sülfonamid içeren balmumunun bala yüksek oranda kirletici geçişine izin verdiğini göstermiştir: 10 mg/kg doymuş balmumu temel plakalarından alınan bala sülfonamitlerin %8,6-42,6'sı geçmiştir (Mitrowska & Antczak, 2024).

Savarino ve ark. (2020) tarafından İtalya'nın Apulia bölgesinde yürütülen çalışmada, bal peteklerinde veteriner antibiyotik kalıntılarının varlığı değerlendirilmiş ve bu kalıntıların olası çevresel kaynakları araştırılmıştır (Savarino ve ark., 2020). Avrupa Birliği mevzuatına göre balda kullanılmasına izin verilen hiçbir antibiyotik yoktur ve bu nedenle balda antibiyotik kalıntısı bulunması "sıfır tolerans" ilkesiyle değerlendirilmektedir (European Commission, 2009). Yani, herhangi bir kalıntının tespiti, yasadışı bir uygulamanın göstergesi olarak kabul edilir. Ayrıca, farklı ülkeler arasında kullanılan analiz yöntemlerinin tespit sınırlarının (LOD) değişebilmesi, yorum farklılıklarına yol açabilmektedir. Çalışma, arıcılık faaliyetlerinde doğrudan antibiyotik kullanımı olmadan da antibiyotik kalıntılarının bal ürünlerinde tespit edilebileceğini göstermiştir. Bu bulgu, bal gibi arı ürünlerinin yalnızca üretim süreçlerinden değil, aynı zamanda çevresel kirlilikten de etkilenebileceğini ortaya koymaktadır. Araştırmada 50 bal peteği örneği analiz edilmiş, bu örneklerin 26'sında (%52) çeşitli antibiyotik kalıntıları tespit edilmiştir. Tespit edilen antibiyotikler arasında streptomisin, amikasin, apramisin, linkozamidler, eritromisin ve seftiofur gibi veteriner hekimlikte yaygın kullanılan ajanlar yer almıştır. Özellikle Altamura bölgesinden alınan örneklerde linkomisin (30,6 ± 0,96 µg/kg) ve amikasin (23,9 ± 1,3µg/kg) gibi yüksek düzeyler gözlenmiştir. Bu bileşiklerin, sığır ve koyun gibi hayvan türlerinde yaygın olarak kullanılmaları, balda çevresel geçiş yoluyla kontaminasyon olabileceğini desteklemektedir. Tarım topraklarında tetrasiklinlerin tespit edilmesi ve geri kazanım oranlarının toprakların metal içeriğinden önemli ölçüde etkilenmesi, bu antibiyotiklerin çevrede kalıcılığını ve farklı alıcı ortamlara taşınım potansiyelini ortaya koymaktadır (Cengiz ve ark.,

2010). Literatürde, antibiyotiklerin arılarda yasal olmayan şekilde kullanılmasının balda kalıntı oluşumunun temel nedeni olduğu sıkça belirtilmektedir. Ancak bu çalışmanın dikkat çekici yönü, antibiyotik kalıntılarının yalnızca kovandan kaynaklanmadığını, çevresel bulaş yoluyla da bala geçebileceğini ileri sürmesidir. Arılar, nektar ve polen toplamak için geniş alanlarda dolaştıkları için, tarım alanlarından ya da hayvancılık işletmelerinden çevreye yayılan ilaç kalıntılarına maruz kalabilirler. Söz konusu çalışmada, antibiyotik kalıntısı saptanan örnekler bir yıl sonra tekrar analiz edildiğinde hiçbir kalıntıya rastlanmamıştır. Bu durum, balın asidik yapısı ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin ilaç moleküllerinin zamanla bozulmasına neden olduğunu göstermektedir. Balın içerdiği antibiyotiklerin kararlılığına ilişkin önceki çalışmalarda da, örneğin streptomisin için 4–5 ay, linkomisin için 28 gün gibi stabilite süreleri bildirilmiştir (Adams ve ark., 2009; Pang ve ark., 2004). Çalışma ayrıca, bitkilerin topraktan antibiyotik emerek yaprak, gövde ve meyve dokularına taşıyabildiğini ve bunun da arıların bu bitkilerden topladıkları nektar ve polen aracılığıyla ürüne kalıntı taşıyabileceğini göstermektedir (Ahmed ve ark., 2015). Bu bulgular, özellikle polen, perga ve arı sütü gibi ürünlerin de çevresel antibiyotik maruziyetinden etkilenebileceğini düşündürmektedir.

Reybroeck ve ark. (2002-2012), ile Gupta (2014) tarafından hızlı antibiyotik tarama yöntemi Charm II ile yapılan çalışmalarda, Belçika pazarında yapılan izleme çalışmasında, yerel ve ithal bal örneklerinde antibiyotik kalıntılarının varlığı değerlendirilmiş; yerel bal örneklerinde streptomisin 248 örneğin 4'ünde (%1,6), tetrasiklin 72 örneğin 2'sinde (%2.8) ve sülfonamidler 72 örneğin 3'ünde (%4,2) tespit edilmiştir, β-laktamlar ve kloramfenikol ise hiç bulunmamıştır. Buna karşılık ithal bal örneklerinde streptomisin 108 örneğin 51'inde (%47,2), tetrasiklin 98 örneğin 29'unda (%29,6), sülfonamidler 98 örneğin 31'inde (%31,6) ve kloramfenikol 85 örneğin 40'ında (%47,1) bulunmuştur (Gupta, 2014; Reybroeck, 2002; Reybroeck ve ark., 2012). Saridaki-Papakonstadinou ve ark. (2006) Yunanistan'da yapılan çalışmada ise inceleme kapsamına alınan bal örneklerinin yaklaşık %29'unda tetrasiklin türevleri tespit edilmiş; pozitif örneklerin %20,3'ü birden fazla tetrasiklin türevi içerirken, çoğunlukla 0,018–0,055 mg/kg arasında kalıntılar bulunmuş ve bazı örneklerde ise 0,100 mg/kg'ın üzerinde tetrasiklin kalıntısı saptanmıştır. (Saridaki-Papakonstadinou ve ark., 2006). Bu bulgular hem

arıcılıkta doğrudan antibiyotik kullanımı hem de çevresel kontaminasyonun dünya genelinde balda antibiyotik kalıntılarına yol açtığını göstermekte olup, Belçika ve Yunanistan örneklerindeki sayısal veriler, farklı pazarlarda antibiyotik bulaşmasının yaygınlık ve yoğunluğunun değiştiğine işaret etmektedir

Baggio ve ark. (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 2001-2007 yılları arasında İtalya'da toplanan toplam 5303 bal örneği üzerinde 4672 analiz gerçekleştirilmiş ve bu örneklerde tetrasiklinler, sülfonamidler, streptomisin, kloramfenikol ve tylosin gibi antibakteriyel ilaç kalıntıları araştırılmıştır. Bal örnekleri menşeine göre sınıflandırılmış; ithal bal, İtalyan piyasasındaki bal ve yerel üretim bal olmak üzere üç ayrı grupta değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, tüm örneklerin %6,3'ünün en az bir antibakteriyel kalıntı içerdiğini göstermektedir. Özellikle ithal ballarda %6,8, İtalyan piyasasında yer alan ballarda %6,1 ve yerel üretim ballarda ise %1,7 oranında antibiyotik kalıntısına rastlanmıştır (Baggio ve ark., 2009).

Er Demirhan ve ark. (2022) Türkiye'de yürütükleri bir çalışmada, Ankara'daki yerel pazarlardan temin edilen toplam 80 adet ticari çiçek balı örneği üzerinde, farmakolojik açıdan risk taşıyan 35 farklı antibiyotik kalıntısının varlığı LC-MS/MS tabanlı çoklu kalıntı analiz yöntemiyle araştırılmıştır. Analiz kapsamına sülfonamidler, tetrasiklinler, makrolidler, sefalosporinler, aminoglikozidler, kinolonlar, nitrofuranlar, kloramfenikol ve anthelmintik ilaç grupları dahil edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, incelenen 35 antibiyotikten 7'si bal örneklerinde pozitif olarak tespit edilmiştir. En sık saptanan kalıntılar arasında dihidrostreptomisin (%58,75), streptomisin (%22,5), eritromisin (%13,75), sulfadimidin (%10,0) ve enrofloksasin (%2,5) yer almıştır. Ayrıca, tetrasiklin ve doksisiklin yalnızca bir örnekte tespit edilmiştir. Bu bulgular, ticari olarak piyasaya arz edilen bal örneklerinin dikkate değer bir kısmının çeşitli antibiyotik kalıntılarını içerebildiğini ve bu durumun halk sağlığı açısından önem arz ettiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, antibiyotik kalıntılarının gıda zincirine geçişini ve bal gibi doğal kabul edilen ürünlerde bulunabilmesini göz önünde bulundurarak, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından bu maddelerin hassas ve güvenilir yöntemlerle izlenmesi gerekliliğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. LC-MS/MS gibi yüksek hassasiyetli analiz yöntemlerinin, çoklu antibiyotik tespitinde etkin bir araç olduğu

vurgulanmakta ve düzenli izleme programlarının gerekliliğine dikkat çekilmektedir (Er Demirhan & Demirhan, 2022).

Yang ve ark. (2020) tarafından yürütülen çalışmada, bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarını tespit edebilmek amacıyla UPLC-MS/MS tabanlı ileri düzey bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin uygulanabilirliğini değerlendirmek üzere 50 farklı bal örneği analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntem, 70 antibiyotiğin eş zamanlı olarak yüksek hassasiyetle tayin edilmesine olanak tanımaktadır. Çalışma sonucunda özellikle tetrasiklin grubu antibiyotikler olan metasiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin ve bunların metaboliti olan 4-epitetrasiklin kalıntılarının çeşitli örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir. Tetrasiklin kalıntısı, üç örnekte 2,6 µg/kg ile 215,3 µg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda saptanmıştır. 4-epitetrasiklin metaboliti ise iki örnekte 4,6 µg/kg ve 232,7 µg/kg düzeylerinde bulunmuştur. Ayrıca, bir örnekte 4,0 µg/kg düzeyinde oksitetrasiklin ve 159,9 µg/kg düzeyinde metasiklin varlığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu yüksek seviyelerin, antibiyotiklere kolay erişim, düşük maliyet, doz esnekliği veya tedavi etkinliğini artırmak amacıyla önerilen dozun aşılması gibi nedenlerle ortaya çıkabileceğini ifade etmişlerdir (Yang ve ark., 2022).

Bonerba ve ark. (2021) tarafından yürütülen çalışmada, bal örneklerinde antibiyotik kalıntılarının tespiti amacıyla sıvı kromatografi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (LC-HRMS) yöntemi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında ayrıca, Randox II ve Randox IV tarama testleri ile antibiyotik kalıntılarının ön taraması gerçekleştirilmiş ve sonuçlar yüksek doğrulukla değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, Randox II testiyle yapılan analizlerde, 33 pozitif örnekte streptomisin kalıntı konsantrasyonu ortalama 18,6 ng/g olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, Randox IV testiyle yapılan taramalarda ise, 35 pozitif bal örneğinde eritromisin kalıntısı 4,4 ng/g, 65 pozitif örnekte ise streptomisin kalıntısı 13,1 ng/g düzeyinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, özellikle aminoglikozid (streptomisin) ve makrolid (eritromisin) grubu antibiyotiklerin bal örneklerinde yaygın olarak izlenebilir kalıntılar arasında yer aldığını ortaya koymaktadır (Bonerba ve ark., 2021).

Kumar ve ark. (2019) tarafından yürütülen çalışmada, Hindistan'ın çeşitli bölgelerinden temin edilen toplam 150 ticari bal örneği, oksitetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikol kalıntıları açısından değerlendirilmiştir. Analizlerde, oksitetrasiklin kalıntısı %15,3 oranında, eritromisin kalıntısı ise %5.3 oranında tespit edilmiştir. Bu

oranlar, Hindistan Gıda Güvenliği ve Standartları Kurumu (Food Safety and Standards Authority of India, FSSAI) tarafından belirlenen tolerans sınırlarının üzerinde olup, halk sağlığı açısından dikkate alınması gereken değerlerdir. Kloramfenikol kalıntısına ise hiçbir örnekte rastlanmamıştır. Oksitetrasiklin pozitifliği en çok sertifikasız markalı (%21,4) ve markasız (%14,3) perakende bal örneklerinde görülmüş; buna karşılık sertifikalı markalı bal örneklerinde bu oran %10.2 olarak belirlenmiştir. Tüm eritromisin pozitif örneklerin, yine sertifikasız bal markalarına ait olması dikkat çekici olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2020).

Mahmoudi ve ark. (2014) İran'ın Kazvin Eyaleti'nden rastgele toplanan 135 bal örneği üzerinde yürütülen bu çalışmada, halk sağlığı açısından tehdit oluşturan veteriner kaynaklı antibiyotik kalıntılarının varlığı araştırılmıştır. Analizlerde, enzim bağlı immünosorbent analiz (ELISA) yöntemi kullanılarak enrofloksasin, penisilin, kloramfenikol, gentamisin, tilosin, tetrasiklin ve sülfonamid gibi çeşitli antibiyotiklerin kalıntı düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bal örneklerindeki antibiyotik kalıntı düzeyleri 0,0-72,1 ng/g arasında değişmiş ve en yüksek oranda pozitiflik enrofloksasin (%20,7) için tespit edilmiştir. Ortalama kontaminasyon düzeyleri açısından da en yüksek değer enrofloksasin (10,8 ± 1,6 ng/g), onu takiben penisilin (4,4 ± 2,9 ng/g) ve kloramfenikol (0.1 ± 0.1 ng/g) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, örneklerin toplandığı mevsimsel farklılıklar, kalıntı düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etki göstermiştir ($P < 0,05$); en yüksek antibiyotik pozitiflik oranı sonbahar mevsiminde (%71,85) elde edilmiştir (Mahmoudi ve ark., 2014).

Shoaei ve ark. (2024) güncel bir sistematik derleme ve meta-analiz çalışmasında, farklı coğrafyalarda yayımlanmış bilimsel yayınları inceleyerek balda antibiyotik kalıntı düzeylerini analiz etmiştir. Toplam analiz sonucunda, bal örneklerinde antibiyotik kalıntılarının ortalama toplam konsantrasyonu 5,032 µg/kg olarak belirlenmiş ve bu değerlerin 4,72 ile 5,33 µg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir. Kalıntıların konsantrasyon sıralamasında ilk dört sırayı sırasıyla fluorokinolonlar (8,59 µg/kg), tetrasiklinler (5,68 µg/kg), sülfonamidler (5,54 µg/kg) ve makrolidler (4,19 µg/kg) almıştır. Bu bulgular, balda yaygın olarak karşılaşılan antibiyotik gruplarının küresel ölçekte benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Analitik yöntemler açısından bakıldığında, çalışmaların çoğunda LC-MS (37,9%), HPLC

(34,4%) ve ELISA (27,5%) yöntemlerinin kullanıldığı belirlenmiştir. Bu durum, yüksek duyarlılıklı ve seçici yöntemlerin antibiyotik kalıntı analizlerinde tercih edildiğini; özellikle LC-MS/MS gibi ileri tekniklerin bu alanda altın standart olarak değerlendirildiğini göstermektedir (Shoaei ve ark., 2024).

Korkmaz ve ark. (2017) Ege Bölgesi'nden toplanan 59 doğal çam balı örneğinde, sülfonamid ve tetrasiklin grubu antibiyotik kalıntıları araştırılmıştır. Kalıntı analizleri, ELISA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, tetrasiklin grubu antibiyotikler, 59 örnekten 35'inde tespit edilmiş olup konsantrasyonları 6-42 µg/kg arasında değişmiştir. Kalan 24 örnekte ise düzeyler, tayin sınırının (<4 µg/kg) altında bulunmuştur. Benzer şekilde, sülfonamid grubu antibiyotikler, 31 örnekte 3-32 µg/kg aralığında tespit edilmiş; 28 örnek ise <2 µg/kg düzeyinde olup saptama sınırının altında kalmıştır (Korkmaz ve ark., 2017).

Tamba-Berehoiu ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farklı floral kaynaklara sahip bal örneklerinde antibiyotik kalıntı düzeyleri analiz edilmiştir. Bu kapsamda, akasya, ıhlamur ve polifloral (çok çiçekli) ballarda streptomisin, tetrasiklin ve eritromisin kalıntıları incelenmiştir. Streptomisin kalıntıları sırasıyla akasya balında 50,88 µg/kg, ıhlamur balında 42,77 µg/kg ve polifloral balda 51,49 µg/kg düzeyinde tespit edilmiştir. Eritromisin kalıntı düzeyleri ise akasya balında 0,27 µg/kg, ıhlamur balında 0,11 µg/kg ve polifloral balda 0,06 µg/kg olarak bildirilmiştir (Tamba-Berehoiu ve ark., 2013).

Vidal ve ark. (2009) veteriner ilaç kalıntılarının balda eş zamanlı analizine yönelik olarak geliştirdikleri bir çalışmada, makrolid, tetrasiklin, kinolon ve sülfonamid grubu antibiyotiklerin yüksek hassasiyetle tespiti amacıyla optimize edilmiş bir yöntem tanımlanmıştır. Bal örnekleri, Na2EDTA çözeltisi ile çözdürülmüş ve ardından katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemiyle üste kalan sıvıdan kalıntılar izole edilmiştir. Ayırma ve kantitatif belirleme işlemleri, elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağına sahip ultraperformans sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, her bir bileşik için iki iyon geçişi (Multiple Reaction Monitoring, MRM) uygulanarak yüksek özgüllük ve duyarlılık elde edilmiştir. Geliştirilen prosedürün validasyonu, 10, 50 ve 100 µg/kg düzeylerinde yapılmış ve ortalama geri kazanım oranları genellikle %70-120 aralığında gerçekleşmiştir. Ancak, doksisiklin, eritromisin ve tilmikosin için bu

oran %50'nin altında kalmıştır. Gün içi günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda bağıl standart sapma (Relative Standard Deviation, RSD) değerleri sırasıyla <%20 ve <%25 olarak hesaplanmıştır. Kantitatif tespit sınırları (Limit of Quantification, LOQ) ise tüm analizler için 4 µg/kg'dan daha düşük düzeyde bulunmuştur. Yöntem, toplam 16 bal örneğine uygulanmış ve birkaç örnekte eritromisin, sarafloksasin ve tilosin kalıntıları tespit edilmiştir. Böylece bu bulgular, geliştirilen yöntemin düşük düzeydeki antibiyotik kalıntılarını dahi başarıyla saptayabildiğini ortaya koymaktadır (Vidal ve ark., 2009).

Çakar ve ark. (2019) Türkiye'nin Antalya ili Akseki ve İbradı ilçelerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, farklı bal formlarında (süzme ve petekli) bulunan pestisit, antibiyotik ve naftalin kalıntılarının düzeyleri belirlenmiş ve bu iki bal tipi kalıntı içerikleri açısından karşılaştırılmıştır. Toplam 60 bal örneği üzerinde gerçekleştirilen analizlerde, 330 pestisit bileşiği, 25 antibiyotik bileşiği (20 sülfonamid ve 5 tetrasiklin grubu) ve naftalin varlığı LC-MS/MS ve GC-MS sistemleri ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre; çalışmada değerlendirilen hiçbir örnekte antibiyotik ya da pestisit kalıntısına rastlanmamıştır. Bununla birlikte, yalnızca üç petekli bal örneğinde, sırasıyla 3,0, 3,9 ve 8,9 µg/kg düzeylerinde naftalin kalıntısı tespit edilmiştir (Çakar & Gürel, 2019).

Kutlu ve ark. (2017)'nın Bitlis ili Hizan ilçesindeki arıcı birliklerine ait 20 farklı konaklama bölgesinden temin ettikleri süzme bal örneklerinde, tetrasiklin grubu (oksitetrasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin, 4-epitetrasiklin, 4-epiklortetrasiklin, doksisiklin) ve sülfonamid grubu (sulfadiazin, sulfatiazol, sulfadoksin, sulfameter, sulfabenzamid, sulfametazin, sulfaklorpiridazin, sulfizoksazol, sulfametoksazol, sulfadimetoksin) antibiyotik kalıntılarının varlığı LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen bu geniş kapsamlı tarama sonucunda, incelenen tüm bal örneklerinde belirtilen antibiyotik gruplarına ait herhangi bir kalıntıya rastlanmamıştır (Kutlu ve ark., 2017).

Özkan ve ark. (2015) Ardahan ili ve ilçelerinden doğrudan üreticilerden topladıkları 180 bal örneğinde, sulfonamid ve streptomisin kalıntıları yönünden analiz edilmiştir. Analizlerde, Ridascreen ticari ELISA kitleri kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; bal örneklerinin %37'sinde streptomisin, %52'sinde ise sulfonamid kalıntısı tespit edilmiştir. Streptomisin kalıntısının en yüksek olduğu

bölge Posof ilçesi olup ortalama değer 5,57 mg/kg, sulfonamid kalıntısının en yüksek olduğu bölge ise Çıldır ilçesi olup ortalama düzey 2,79 mg/kg olarak belirlenmiştir (Özkan ve ark., 2015)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, piyasadan temin edilen polen, perga, propolis (bu örnekler; alkol ve su bazlı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiş, ticari olarak %20-30 konsantrasyonda sunulan preparatların %10 oranına distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır) ve arı sütü örneklerinde veteriner ilaç kalıntılarının belirlenmesine yönelik çoklu grup ve çoklu kalıntı tarama analiz yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca, metodun optimizasyonu amacıyla organik örnekler kullanılmıştır.

Proje kapsamındaki analizler, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) bünyesinde faaliyet gösteren Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Veteriner İlaç Kalıntıları Birimi laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan analitik standartlar ve kimyasalların marka ve menşelerine ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo 7'de sunulmuştur. Çalışmada yer alan LC-MS/MS metodu; Ülkü ve ark. (2025) yapmış oldukları "Süt içerisine katılmış bazı makrolid grubu antibiyotiklerin eriyen peynire geçişi ve LC-MS/MS ile işleme faktörlerinin belirlenmesi" çalışmasında yer alan tarama metodu modifiye edildikten sonra kullanıldı (Ülkü ve ark., 2025).

Tablo 7. Çalışmada kullanılan analitik standart ve kimyasallar

Bileşen	Cas/Lot Numarası	Saflık(%)	Marka	Menşei
Erythromycin	114-07-8	97,74	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Tilmicosin	108050-54-0	90,20	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Tylosin	74610-55-2	92,63	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Spiramycin	8025-81-8	95,00	Lab Standard	Budapest, Macaristan
Neo Spiramycin	70253-62-2	96,00	TRC Standards	Ontario, Kanada
Sulfadiazine	68-35-9	99,20	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Sulfathiazole	72-14-0	99,90	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Sulfapyridine	144-83-2	99,89	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Sulfamerazine	127-79-7	98,00	TRC Standards	Ontario, Kanada
Sulfamethazine	57-68-1	99,60	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Sulfachloropyridazine	80-32-0	99,07	TRC Standards	Ontario, Kanada
Sulfamethoxazole	723-46-6	99,56	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Sulfadoxine	2447-57-6	99,07	HPC Standards GmbH	Steinheim, Almanya
Sulfadimethoxine	122-11-2	99,60	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Sulfaquinoxaline	59-40-5	99,00	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Trimethoprim	738-70-5	99,90	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Lincomycin	7179-49-9	98,40	CPA Chem	Bogomilovo, Bulgaristan
Ciprofloxacin	93107-08-5	92,78	Dr. Ehrenstorfer GmbH	Augsburg, Almanya
Danofloxacin	119478-55-6	99,88	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Enrofloxacin	93106-60-6	99,60	HPC Standards GmbH	Borsdorf, Almanya
Sarafloxacin	91296-87-6	97,00	Sigma Aldrich	Steinheim, Almanya
Methanol	67–56-1	99,90	Merck	Darmstadt, Almanya
Ammonium formate	540–69-2	99,00	Merck	Darmstadt, Almanya
Formic Acid	64–18-6	100	Merck	Darmstadt, Almanya
Deionized Pure Water	7732-18-5	100	Merck	Darmstadt, Almanya

3.1. LC-MS/MS Koşulları ve Analiz Parametreleri

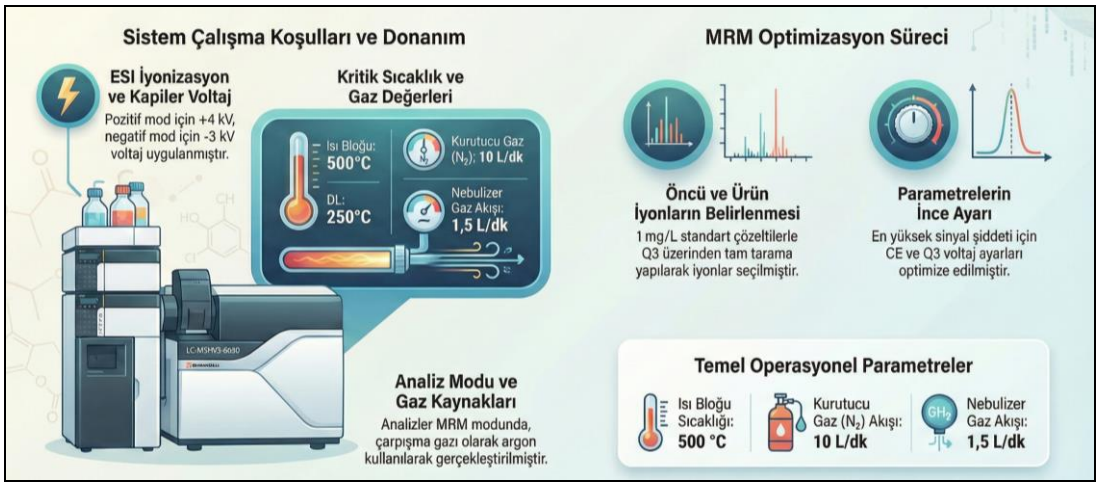
Kütle spektrometrik analizler, elektrosprey iyonizasyon (Electrospray Ionization, ESI) kaynağına sahip Shimadzu LC-MS/MS-8040 (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi, Kyoto, Japonya) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ESI iyon kaynağında uygulanan kapiler voltaj, iyonların oluşumu ve kütle analizörüne yönlendirilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada pozitif iyonizasyon modu için +4 kV, negatif iyonizasyon modu için ise -3 kV kapiler voltaj değerleri uygulanmıştır.

Sistemin diğer çalışma koşulları kapsamında, ısı bloğu (heat block) sıcaklığı 500 °C, desolvation line (DL) sıcaklığı ise 250 °C olarak ayarlanmıştır. İyonizasyon sürecinde kullanılan azot gazı (N_2), bir azot jeneratörü (Peak Scientific, İskoçya, Birleşik Krallık) aracılığıyla elde edilmiştir. Bu gaz, hem nebulizer (sprey) gazı hem de kurutucu gaz olarak kullanılmış olup, akış hızları sırasıyla 1,5 L/dk ve 10 L/dk olarak belirlenmiştir.

Kütle spektrometresi analizleri, MRM modunda yürütülmüş ve çarpışma gazı (Collision Gas, CG) olarak argon kullanılmıştır. MS/MS parametreleri olan çarpışma enerjisi (Collision Energy, CE) ve dwell time değerleri, her biri 1 mg/L derişimde hazırlanmış tek bileşenli standart çözeltiler kullanılarak optimize edilmiştir.

MRM geçişlerinin optimizasyonu sürecinde, metanol içinde hazırlanan 1 mg/L konsantrasyondaki analitik standart çözeltiler doğrudan iyon kaynağına verilmiştir. Pozitif ve negatif iyonizasyon modları sırasıyla çalıştırılarak, üçüncü kuadrupol (Quadrupole, Q3) üzerinden tam tarama (full scan) modunda öncü iyonlar (precursor ions) belirlenmiştir. Belirlenen öncü iyonların parçalanmasıyla ürün iyonları (product ions) elde edilmiş, ardından sinyal şiddeti yüksek ve kararlı iyonlar seçilmiştir. Bu iyonlar için optimum yanıt alınacak şekilde CE ve Q3 voltajı ayarları yapılmıştır.

Analizi yapılacak 21 adet antibiyotiğe ait kütle spektrometresi parametreleri, MRM modunda belirlenen öncü ve ürün iyonlar ile birlikte Şekil 6 ve Tablo 8'de sunulmuştur.



Şekil 6. LC-MS/MS koşulları ve analiz parametreleri

Tablo 8. Çalışmada yer alan antibiyotiklerin ana ve yavru iyon geçişleri

Grup Adı	Analit	Ana iyon (m/z)	Yavru iyon (1)	Yavru iyon (2)	Alıkonma zamanı	İyonlaşma
Macrolides	Erytromycin	734,45	158.20	576.50	7,355	52:MRM(+)
	Tilmicosin	869.60	173.95	132.10	6,439	41:MRM(+)
	Tylosin	916.55	174.15	101.15	7,216	48:MRM(+)
	Spiramycin	422.50	101.15	174.20	6,002	34:MRM(+)
	Neo_Spiramycin	350.30	174.10	160.00	5,825	29:MRM(+)
Sulfanamides	Sulfadiazine	250.90	156.10	92.10	3,706	11:MRM(+)
	Sulfathiazole	255.85	156.10	92.10	4,745	12:MRM(+)
	Sulfapyridine	249.90	156.10	107.95	5,176	15:MRM(+)
	Sulfamerazine	265.10	156.10	172.05	5,51	20:MRM(+)
	Sulfamethazine	278.90	185.85	124.20	6,022	35:MRM(+)
	Sulfachloropyridazine	284.85	155.80	92.10	6,317	40:MRM(+)
	Sulfamethoxazole	253.85	155.80	92.20	6,494	42:MRM(+)
	Sulfadoxine	311.05	155.85	108.10	6,687	43:MRM(+)
	Sulfadimethoxine	311.15	156.05	92.20	7,220	49:MRM(+)
	Sulfaquinoxaline	301.15	156.10	92.20	7,260	50:MRM(+)
Diaminoprimidin	Trimethoprim	291.10	230.05	123.20	5,182	16:MRM(+)
Lincozamid	Lincomycin	407.35	126.15	359.40	5,039	14:MRM(+)
Quinolones	Ciprofloxacin	332.00	314.25	231.10	5,477	19:MRM(+)
	Danofloxacin	358.10	340.20	82.15	5,574	24:MRM(+)
	Enrofloxacin	360.30	316.30	342.30	5,640	27:MRM(+)
	Sarafloxacin	386.00	368.20	342.15	5,825	30:MRM(+)

3.2. Kromatografik Ayırma Koşulları

Kromatografik ayırma işlemleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) sistemine entegre edilmiş Shimadzu Shim-pack XR-ODS II kolon (75 mm uzunluk × 2,0 mm iç çap, 2,2 µm partikül boyutu) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kolon, C18 tabanlı ters fazlı (reverse phase) silika partiküllerinden oluşmakta olup hem polar hem de orta polariteye sahip bileşiklerin etkin şekilde ayrılmasına olanak tanımaktadır. Kolonun küçük partikül boyutu, yüksek ayırma kapasitesi ve kısa analiz süresi elde edilmesini sağlamaktadır. Analiz süresince kolon fırını sıcaklığı 60

°C'de sabit tutuldu. Bu sabit sıcaklıkta tutma, mobil fazın viskozitesini düşürerek sabit akış koşullarının sağlanmasına, ayrıca alıkonma süresindeki değişimlerin minimize edilmesine yardımcı olması amacı ile yapıldı. Sıcaklık kontrolü aynı zamanda analitlerin tekrarlanabilir pik şekillerinde elüsyonunu da desteklediği gerçeği göz önünde bulunduruldu.

Mobil fazların hazırlanması aşamasında yüksek saflıkta LC-MS dereceli çözücüler kullanıldı. Çözeltiler hazırlanırken çözünürlük, pH dengesi ve iyonlaşma verimi göz önünde bulunduruldu. Kullanılan mobil faz bileşenleri; Mobil Faz A: %0,1 (v/v) formik asit ve 1 mM amonyum format içeren ultra saf su ve Mobil Faz B: %0,1 (v/v) formik asit ve 1 mM amonyum format içeren metanol karışımlarından oluşturuldu. Formik asit, mobil fazın pH'ını hafif asidik düzeyde tutarak iyonlaşmayı kolaylaştırmakta ve pik şekillerinin iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Amonyum format ise tamponlama kapasitesi sağlayarak, özellikle ESI kaynağında iyon oluşumunun kararlılığını artırmak hedeflendi. Mobil fazlar günlük olarak taze hazırlandı, kullanım öncesinde 0,22 µm PTFE filtrelerden süzülerek ve ultrasonik banyoda gazdan arındırılarak (degazasyon) sisteme verildi.

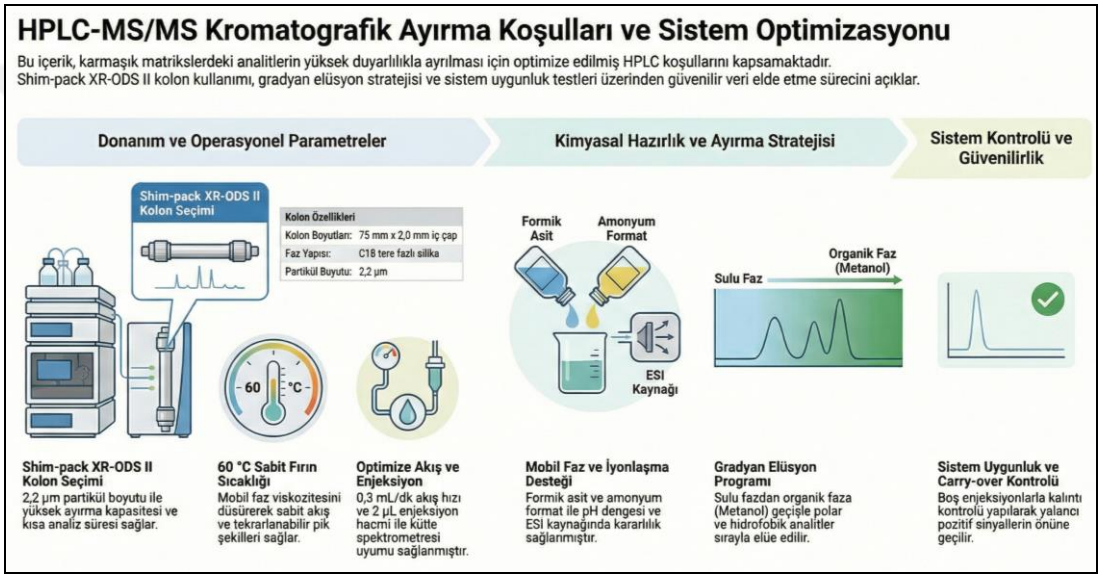
Anaitlerin kütle ayrımları, gradient elüsyon programı uygulanarak gerçekleştirildi. Bu programda, analiz başlangıcında Mobil Faz A (sulu faz) oranı yüksek tutulmuş ve analiz süresi boyunca metanol oranı (Mobil Faz B) kademeli olarak artırıldı. Böylece, önce polar bileşikler, ardından daha hidrofobik özellik gösteren bileşikler elüe edildi. Bu yaklaşım ile, hem karmaşık matrikslerdeki analitlerin pik çakışmaları önlendi hem de analizin genel seçiciliği artırıldı.

Kullanılan kromatografik elüsyon programı ve toplam analiz süresi ayrıntılı olarak Tablo 9'da sunulmuştur. Analizlerde akış hızı 0,3 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 2 µL olarak belirlendi. Bu parametreler hem kolon üzerindeki basınç limitleri hem de kütle spektrometresi ile uyumlu akış koşullarını sağlamak amacıyla optimize edildi.

Sistem uygunluk kontrolü için her analiz serisine başlanmadan önce, sistemin temizliği ve uygunluğu değerlendirildi. Bu amaçla, mobil faz ile boş çözücü enjeksiyonları yapılarak olası taşıma (carry-over, yüksek konsantrasyondaki bir numunenin analizi sonrasında, sistemde kalan analit kalıntılarının bir sonraki enjeksiyona geçerek yalancı pozitif sinyal oluşturması durumu) durumları kontrol

edildi. Boş enjeksiyonlarda herhangi bir pik gözlenmemesi durumunda sistem analiz için hazır kabul edildi.

Ayrıca, sistem uygunluk testleri kapsamında alıkonma süresi, tekrarlanabilirlik %RSD'si, pik alanı, çözünürlük ve pik simetrisi (asimetri faktörü) gibi parametreler değerlendirildi. Bu kontroller, cihaz performansının sürekliliğini sağlamak ve metot güvenilirliğini doğrulamak amacıyla yapıldı. Tüm analizler boyunca kromatografik koşullar sabit tutuldu ve böylece elde edilen verilerin tutarlılığı sağlandı. Sonuç olarak izlenen bu yol sayesinde analitlerin kantitatif tayinlerinde yüksek duyarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik elde edildi (Şekil 7).



Şekil 7. LC-MS/MS kromatografik ayrım koşulları

Tablo 9. Kromatografik ayırma koşulları özet tablo

Parametre	Açıklama
Kolon	Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2.0 mm, 2.2 µm)
Kolon Özelliği	Ters faz (C18) yüksek çözünürlük, polar ve yarı-polar bileşikler için uygun yapıdadır.
Kolon Sıcaklığı	60 °C (sabit)
Mobil Faz A	%0,1 formik asit ve 1 mM amonyum format içeren ultra saf su
Mobil Faz B	%0,1 formik asit ve 1 mM amonyum format içeren metanol
Mobil Faz Katkıları	İyonizasyon verimini ve sinyal kararlılığını artırmak amacıyla formik asit ve amonyum format eklenmiştir.
Akış Hızı	0,3 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Elüsyon Tipi	Gradient elüsyon metanol oranı zamanla kademeli olarak artırılmıştır.
Toplam Analiz Süresi	15 dakika
Sistem Kontrolü	Her analiz serisinden önce boş çözücü enjeksiyonları ile sistem uygunluğu ve kontaminasyon kontrolü yapılmıştır.

3.3. Gradient Programının Optimizasyonu

LC-MS/MS sistemlerinde gerçekleştirilen çoklu kalıntı analizlerinde, farklı kimyasal yapılara ve polaritelere sahip bileşiklerin aynı koşullarda etkin biçimde ayrılabilmesi, kullanılan kromatografik koşulların optimize edilmesine bağlıdır. Bu doğrultuda, gradient elüsyon programı, ayırma verimini artırmak, analiz süresini optimize etmek ve sistem kararlılığını sağlamak amacıyla geliştirildi.

Gradient elüsyon, mobil fazın organik bileşen oranının (genellikle metanol veya asetonitril) zamanla kademeli olarak değiştirilmesi yoluyla oluşturuldu. Analiz başlangıcında yüksek oranda su içeren (polar) mobil faz kullanılarak polar bileşiklerin erken elüsyonu sağlanırken, zamanla artan organik faz oranı sayesinde daha az polar veya apolar bileşikler kolondan ayrıştırılması hedeflendi. Bu yaklaşım hem polar hem de yarı-polar bileşiklerin tek bir analiz döngüsünde yüksek çözünürlükle ayrılmasına olanak tanıdı.

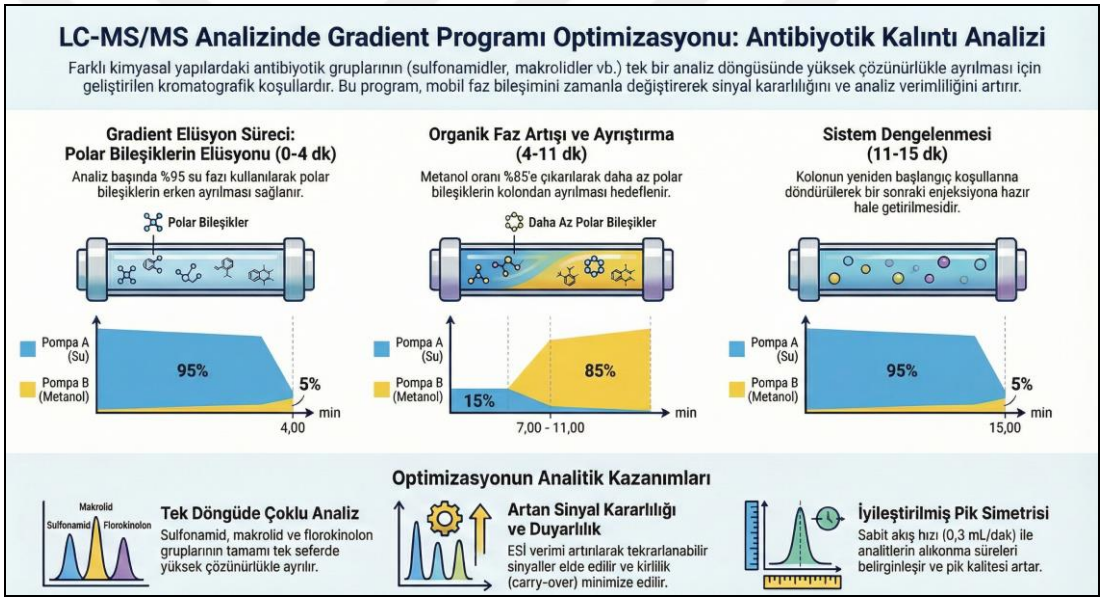
Çalışmada kullanılan gradient akış programı Shimadzu LC-MS/MS-8040 sistemi için optimize edilmiş olup, farklı antibiyotik gruplarının uygun alıkonma sürelerinde elüsyonu hedeflendi. Bu kapsamda, mobil faz bileşimi Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Metotta kullanılan gradient programı

Zaman (dakika)	Akış (mL/dakika)	Pompa A (%)	Pompa B (%)
4,00	0,3	95	5
7,00	0,3	15	85
7,01	0,3	15	85
11,00	0,3	15	85
11,01	0,3	95	5
15,00	0,3	95	5

Bu programda analiz başlangıcında düşük oranda Pompa B (%5 metanol) içeren mobil faz kullanılarak polar bileşiklerin erken elüsyonu sağlandı. Ardından, yedinci dakikaya kadar %95 akışa sahip Pompa A (su fazı) oranı azaltılarak (%15'e indirilerek) polar ve yarı-polar bileşiklerin kademeli şekilde ayrılması hedeflendi. 11,01'inci dakikada Pompa A oranı %95'e yükseltilerek en zayıf polar bileşiklerin elüsyonu gerçekleşti, 15'inci dakikada ise sistem yeniden başlangıç koşullarına döndürülerek kolonun dengelenmesi sağlandı (Tablo 10, Tablo 11). Gradient programının bu şekilde optimize edilmesi hem ayrım verimini hem de kütle spektrometresinde elde edilen sinyal kararlılığını önemli ölçüde artırdığı görüldü.

Ayrıca, program boyunca sabit tutulan 0,3 mL/dakika akış hızı, LC sisteminin kütle spektrometresiyle tam uyum içinde çalışmasını sağladı. Bu optimizasyon sayesinde analitlerin alıkonma süreleri belirgin biçimde ayrıldı, pik simetrisi iyileştirildi ve bir önceki enjeksiyondan gelecek maddelerin kirlilik (carry-over) etkileri en aza indirildi. Ayrıca, zamanla değişen mobil faz bileşimi, elektrospray ESI verimini artırarak daha kararlı ve tekrarlanabilir sinyaller elde edilmesini sağladı. Optimize edilen bu gradient akış programı, çalışmada hedeflenen antibiyotik gruplarının (örneğin sulfonamidler, makrolidler ve florokinolonlar) tamamının tek bir analiz döngüsünde yüksek çözünürlükle ayrılmasını mümkün kılmış; yöntemin hem duyarlılığını hem de tekrarlanabilirliğini artırarak, LC-MS/MS tabanlı çoklu kalıntı tarama metodunun güvenilir biçimde uygulanması sağlandı (Şekil 8).



Şekil 8. LC-MS/MS sistemlerinde gerçekleştirilen çoklu kalıntı analizlerinde, farklı kimyasal yapılara ve polaritelere sahip bileşiklerin aynı koşullarda etkin biçimde ayrılabilmesi, kullanılan kromatografik koşulların optimize edilmesi

Tablo 11. Gradient akışta hedeflenen polar ve apolar analitler

Antibiyotik	Antibiyotik Grubu	Genel Yapısal Özellik	Polarite Sınıfı
Erythromycin	Macrolides	Makrosiklik lakton halkası, şeker yan zincirleri içerir	Yarı polar/apolar eğilimli
Tilmicosin		Erythromycin türevi, yüksek lipofiliklik	Apolar
Tylosin		Lakton halkası, hidroksil ve şeker grupları içerir	Yarı polar
Spiramycin		Çok sayıda hidroksil ve amin grubu içerir	Yarı polar
Neo-Spiramycin		Spiramycin benzeri yapı, kısmen daha lipofilik	Yarı polar / apolar arası
Sulfadiazine	Sulfanamides	Amin ve sülfonamid grupları içerir	Polar
Sulfathiazole		Tiyazol halkası, amid grubu içerir	Polar
Sulfapyridine		Piridin halkası, orta polarite	Yarı polar
Sulfamerazine		Benzen halkası + sülfonamid	Yarı polar
Sulfamethazine		Dimetil grupları nedeniyle kısmen lipofilik	Yarı polar / hafif apolar
Sulfachloropyridazine		Klorlu romatic yapı nedeniyle lipofilik eğilim	Yarı polar / apolar eğilimli
Sulfamethoxazole		Oksazol halkası, hidrofilik gruplar içerir	Yarı polar
Sulfadoxine		Eter ve sülfonamid grubu içerir, orta polarite	Yarı polar
Sulfadimethoxine		Dimetoksi gruplar, lipofilik yapı	Yarı polar / apolar
Sulfaquinoxaline		Kinoksalin halkası, oldukça lipofilik	Apolar
Trimethoprim	Diaminoprimidin	Pürin benzeri halka, amin grupları içerir	Polar / yarı polar
Lincomycin	Lincozamid	Amino şeker ve tiyol ester yapısı	Polar / yarı polar
Ciprofloxacin	Quinolones	Florokinolon halkası, karboksil ve piperazin grupları	Yarı polar
Danofloxacin		Flor atomu içeren romatic yapı, orta lipofiliklik	Yarı polar / apolar
Enrofloxacin		Piperazin halkası, orta düzey lipofiliklik	Yarı polar / apolar
Sarafloxacin		Florlu kinolon halkası, karboksil grubu içerir	Yarı polar

3.4. Çalışmada Kullanılacak Olan Standartların Hazırlanması

Bu çalışma kapsamında geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodunun doğrulama aşamasında, yöntemin temel performans parametrelerinin değerlendirilmesi amacıyla matriks zenginleştirme (fortifikasyon) işlemleri gerçekleştirildi. Zenginleştirme işlemi, tarama yöntemlerinin validasyonunda kritik öneme sahip olup, yöntemin seçilen tarama hedef konsantrasyonunda (STC) gerçek matriks koşullarında doğru şekilde çalışıp çalışmadığını göstermek amacı ile yapıldı.

Analizde kullanılan antibiyotik grupları; makrolidler (eritromisin, tilmikosin, tilozin, spiramisin, neo-spiramisin), sülfonamidler (sulfadiazin, sulfathiazol, sulfapiridin, sulfamerazin, sulfametazin, sulfachloropiridazin, sulfametoksazol, sulfadoksin, sulfadimetoksin, sulfaquinoksalin), florokinolonlar (siprofloksasin, danofloksasin, enrofloksasin, sarafloksasin), linkozamid (linkomisin) ve diaminopirimidin (trimetoprim) gruplarından oluşmaktadır. Her bir antibiyotik için 1000 mg/kg derişiminde stok çözeltiler hazırlanmış; bu stoklardan uygun seyreltmeler yapılarak 100 mg/kg'lik tüm analitleri içeren miks çalışma çözeltileri elde edildi.

Bu çalışma çözeltilerinden, yöntemin düşük düzey kalibrasyon aralığını temsil edecek şekilde 7,5 µg/kg (STD1), 10 µg/kg (STD2) ve 12,5 µg/kg (STD3) hedef konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Bu seviyeler, yöntemin doğrulama aralığını ve saptama kapasitesini (Detection Capability, CCβ) belirlemeye olanak sağlayacak şekilde, tarama hedef konsantrasyonu (Screening Target Concentration, STC) ile uyumlu olarak seçildi. Zenginleştirme işlemi, her bir matriksin (polen, perga, propolis ve arı sütü) yapısal özellikleri göz önüne alınarak tasarlandı (Tablo 12).

Analiz öncesinde, her bir matriks için 1 gram homojen numune alındı ve üzerine farklı düzeylerde çalışma standardı çözeltisi eklenerek (75 µL, 100 µL ve 125 µL) üç ayrı zenginleştirme seviyesi oluşturuldu. Bu hacimler sırasıyla STD1, STD2 ve STD3 seviyelerine karşılık gelmektedir. Eklenen standart hacimleri, analitlerin matriks içinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlayacak biçimde seçildi.

Zenginleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, numuneler oda sıcaklığında belirli bir süre bekletilerek çözücü sisteminin matriks içinde tamamen dağılması ve analitlerin yüzeylere adsorbe olmadan homojen şekilde dağılması sağlandı. Ardından numuneler vorteks (vortex mixer) karıştırıcıda vortekslenerek homojenize edildi ve ekstraksiyon aşamasına hazırlandı. Bu aşamada hedef, hem analitlerin matriksle tam etkileşime girmesini sağlamak hem de yöntemin matriks etkisine (matrix effect) karşı dayanıklılığını ölçmektir. Böylece analiz edilecek olan matrikslerin doğal kontamine olma durumları taklit edildi.

Zenginleştirme işlemlerinin tamamlanmasının ardından, geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama yönteminin polen, perga, propolis ve arı sütü gibi farklı matriks türlerinde güvenilir şekilde uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla numuneler ekstraksiyon aşamasına hazır hale getirildi. Bu aşama ile birlikte, analitlerin matriks yapısından bağımsız olarak doğru biçimde belirlenebildiği ve yöntemin tarama hedef konsantrasyonunda istatistiksel olarak geçerli performans gösterdiği test edildi.

Tablo 12. Zenginleştirmede kullanılan standarlar ve bu işlem için çekilen hacimler

Antibiyotikler	Ana Stok (mg/kg)	Çalışma Çözeltisi (mg/kg)	Hedef Hacim (ml)	STD 1 (µg/kg)	STD 2 (µg/kg)	STD 3 (µg/kg)
Erytromycin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Tilmicosin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Tylosin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Spiramycin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Neo_Spiramycin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfadiazine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfathiazole	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfapyridine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfamerazine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfamethazine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfachloropyridazine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfamethoxazole	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfadoxine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfadimethoxine	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sulfaquinoxaline	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Trimethoprim	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Lincomycin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Ciprofloxacin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Danofloxacin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Enrofloxacin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
Sarafloxacin	1000	100	10	7.5	10.0	12.5
1 gram numune zenginleştirmek için çekilen hacim (mikro litre)				**75**	**100**	**125**

3.5. Zenginleştirilmiş Örneklerin Ekstraksiyonu

Zenginleştirme işlemi piyasadan temin edilen ürünlerede (polen, perga, arı sütü ve propolis (alkol bazlı ve su bazlı)) yapıldı. Bu işlemden sonra, her bir örneğin antibiyotik kalıntılarının ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstraksiyon adımları, her matriksin yapısal özelliği ve bileşim farklılıkları dikkate alınarak optimize edildi. Ekstraksiyon çözeltisi olarak %90 metanol + %10 ultra saf su + %0,2 formik asit içeren karışım kullanıldı. Bu çözücü kombinasyonu, antibiyotiklerin geniş bir polarite aralığında çözünürlüğünü artırmakta ve iyonizasyon verimini desteklemek amacı ile seçildi. Matrikslere göre iki farklı analiz ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

3.5.1. Polen ve Perga matrikslerinin ekstraksiyonu

Zenginleştirilmiş polen ve perga örneklerinden 1,0 gram tartılarak, içinde cam boncuk (bead) bulunan Bead Ruptor tüplerine aktarıldı. Üzerine 5 mL ekstraksiyon çözeltisi eklendi ve tüplerin kapakları sıkıca kapatıldı. Örnekler, Bead Ruptor cihazında mekanik olarak parçalanarak homojen hale getirildi. Bu işlem, özellikle polen ve perga gibi yoğun yapılı ve partikül içeren matrikslerde analitlerin çözünürlüğünü artırmak amacıyla uygulandı. Parçalama sonrasında tüpler, 15 dakika süreyle orbital çalkalayıcı (Heidolph Multi Shaker, Schwabach, Germany) cihazda karıştırıldı ve ardından 4500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj

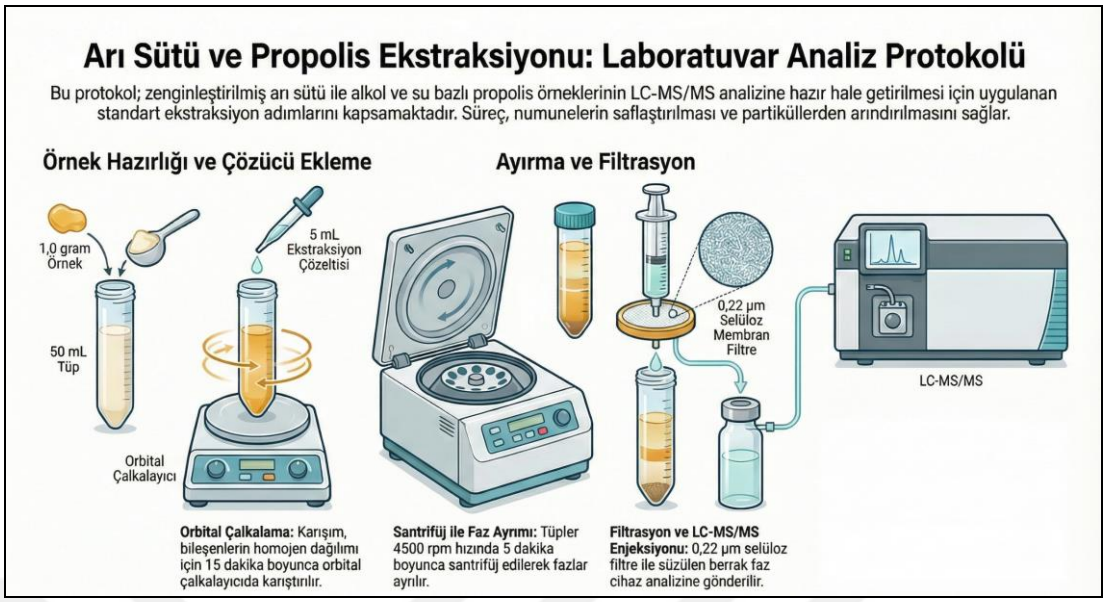
işlemi sonucunda oluşan üst fazdaki berrak süpernatant, enjektör yardımıyla dikkatlice alınarak yaklaşık 2 mL hacminde toplandı. Toplanan süpernatant, LC-MS/MS sisteminde kolon tıkanıklıklarını önlemek ve enjeksiyon doğruluğunu sağlamak için 0,22 µm selüloz membran filtreden süzüldü ve partikül içermeyen berrak bir ekstrakt elde edildi. Son aşamada, filtrattan 2 µL hacminde örnek LC-MS/MS cihazına enjete edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Polen ve perga ekstraksiyonu

3.5.2. Arı Sütü ve Propolis (alkol ve su bazlı) matrikslerinin ekstraksiyonu

Zenginleştirilmiş arı sütü (yaş), alkol bazlı propolis ve su bazlı propolis örnekleri için ekstraksiyon işlemi benzer prensiplere göre gerçekleştirildi. Her bir örnekten 1,0 g tartılarak 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine alındı. Üzerine 5 mL ekstraksiyon çözeltisi (%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH) eklendi ve örnekler 15 dakika süreyle orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra tüpler 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan üstteki berrak faz, enjektör yardımıyla dikkatlice alınarak yaklaşık 2 mL hacminde toplandı. Toplanan süpernatant 0,22 µm gözenek çapına sahip selüloz membran filtre kullanılarak süzülmüş ve partikülden arındırılmış ekstraktlar LC-MS/MS cihazına enjeksiyon yapıldı (Şekil 10).



Şekil 10. Arı sütü ve propolis ekstraksiyonu

3.6. Ekstraksiyon Yönteminin Uygunluk Değerlendirmesi

Ekstraksiyon adımları boyunca kullanılan metanol esaslı çözücü sistemi, antibiyotiklerin hem polar (örneğin sülfonamidler, florokinolonlar) hem de yarı apolar (örneğin makrolidler, linkozamidler) karakterine uygun bir çözünürlük profili sağladığından tercih edildi. Ayrıca formik asit katkısı, analitlerin protonlanma eğilimini artırarak iyonizasyon verimini daha iyi hale getirdi. Her ekstraksiyon serisinde, sistem uygunluğunu kontrol etmek amacıyla boş (zenginleştirilmemiş) matriks örnekleri de paralel olarak işleme alındı. Böylece, matriks kaynaklı girişimler, sinyal karışmaları veya kontaminasyon riskleri kontrol edildi. Uygulanan ekstraksiyon protokolleri sayesinde farklı kimyasal özelliklere sahip antibiyotiklerin kompleks arı ürünleri matrikslerinden etkin bir şekildeçimde ayrılması sağlandı ve yüksek tekrarlanabilirlik (%RSD ≤ %15) ile iyi geri kazanım (%80-110) değerleriyle yöntemin doğruluğu arttırdı (Tablo 13).

Tablo 13. Ekstraksiyon yönteminin uygunluk değerlendirmesi

Matriks	Örnek (g)	Ekstraksiyon Çözeltisi	Ekstraksiyon Hacmi (mL)	Homojen Karışım	Süre	Santrifüj Koşulları	Filtrasyon (0,22 µm)
Polen	1,0	%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH	5	Bead Ruptor	15 dk	4500 rpm, 10 dk	Selüloz Membran
Perga	1,0	%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH	5	Bead Ruptor	15 dk	4500 rpm, 10 dk	Selüloz Membran
Arı sütü	1,0	%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH	5	Manuel karıştırma	15 dk	4500 rpm, 5 dk	Selüloz Membran
Propolis (alkol bazlı)	1,0	%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH	5	Manuel karıştırma	15 dk	4500 rpm, 5 dk	Selüloz Membran
Propolis (su bazlı)	1,0	%90 MeOH + %10 H_2O + %0,2 HCOOH	5	Manuel karıştırma	15 dk	4500 rpm, 5 dk	Selüloz Membran

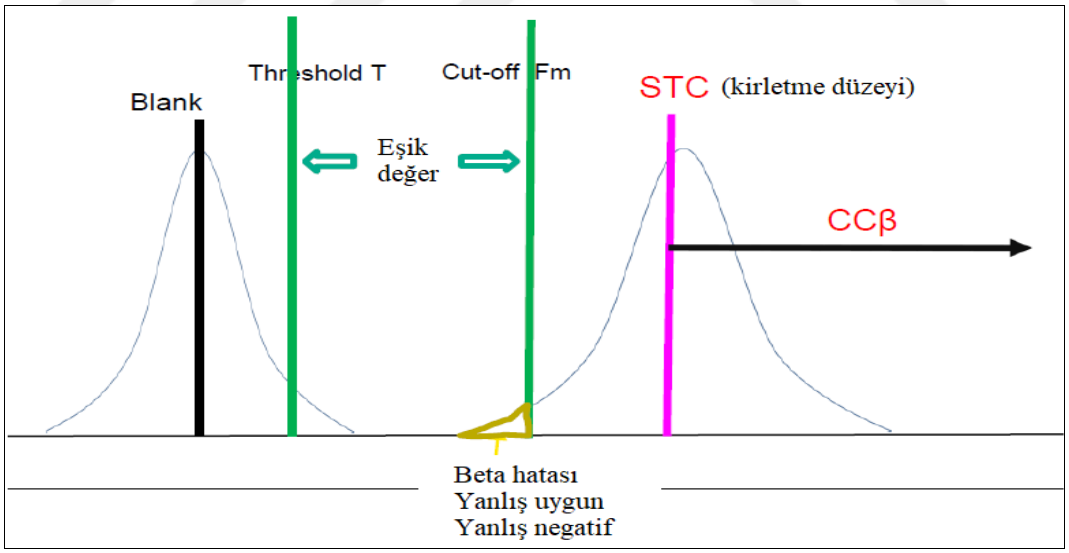
3.7. Tarama Metodu Validasyon Parametrelerinin Seçimi

Tarama yöntemlerinin doğrulanmasına ilişkin süreç, Avrupa Birliği Komisyonu tarafından yayımlanan "EURL Guidance Document on Screening Method Validation, Version 1.1" dokümanı ile tanımlanmış olup, söz konusu rehberin ülkemizde uygulamaya aktarılması amacıyla hazırlanan "2021/808/EU Tarama Yöntemi Validasyonuna İlişkin EURL Kılavuzu İçin Açıklamalı ve Uygulamalı Metot Validasyon Rehberi, Ağustos 2024, Ankara" belgesi bu çalışmada temel referans olarak kullanıldı. Bu rehberde tarama analizi validasyonu için izlenmesi gereken yöntemler ayrıntılı biçimde açıklanmış olup, yürütülen validasyon çalışması kapsamında bu yöntemlerden Yöntem 2 tercih edildi (EURL, 2023).

Çalışmada uygulanacak güçlendirme seviyelerinin belirlenmesinde, aynı rehberde yer alan Tablo 9'daki "İzin Verilmeyen Maddeler için Minimum Metot Performans Gereklilikleri (MMPR)" esas alındı. İlgili farmakolojik olarak aktif maddelerin ballarda dikkate alınması gereken kalıntı düzeyleri ise "EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for Specific Pharmacologically Active Substances in Specific Animal Matrices, Version 2.1, January 2025" dokümanının madde 10 bölümündeki bilgiler doğrultusunda belirlendi. Polen, perga, propolis (su ve alkol bazlı %10'luk ekstraktlar) ve arı sütü matrikslerinde mevzuatta bala özgü sınır değerler dışında ayrı bir limit bulunmadığından, çalışmada söz konusu arı ürünleri için baldaki limit değerler referans alındı ve tüm validasyon bu doğrultuda gerçekleştirildi. Bu kapsamda Yöntem 2 doğrulama süreci, eşik düzeyi (T) ve Cut-Off seviyesi (Fm) hesaplamalarına dayanan yarı kantitatif bir yaklaşım olarak uygulandı. Kör ve

güçlendirilmiş numunelerle yürütülen istatistiksel değerlendirme sonucunda yöntemin CCβ ve matrikse özgü performans parametreleri bilimsel gerekliliklere uygun şekilde doğrulandı.

Yöntem 2 kapsamında yarı kantitatif doğrulama süreci (Tablo 14), T ile Fm değerlerinin belirlenmesi ve CCβ istatistiksel olarak ortaya konması amacıyla uygulanmış olup, bu doğrultuda bütünleşik bir metodolojik yaklaşım izlendi (Şekil 11). İlk aşamada, çalışılan matrikse ait en az 20 kör numunenin analitik yanıtları ölçülmüş, bu yanıtların ortalaması (B) ve bu ortalamaların standart sapması (SDb) hesaplanmış ve elde edilen bu iki parametre kullanılarak yöntemin arka plan varyasyonunu tanımlayan eşik değeri T oluşturuldu. Devamında, STC seviyesinde güçlendirilmiş en az 20 numunenin analizi tamamlandı. Bu numunelere ait ortalama sinyal (M) ile yanıt dağılımının standart sapması (SD) belirlenmiş ve bu veriler ışığında Cut-Off seviyesi Fm hesaplandı. T ve Fm değerleri, sinyal-konsantrasyon ilişkisinin orantılı veya ters orantılı olmasına uygun şekilde uyarlanmış ve böylece tarama sonucunda bilinmeyen numunelerin pozitif ya da negatif olarak sınıflandırılmasında kullanılacak karar kriterleri kesin biçimde tanımlandı.



Şekil 11. Validasyon çalışmaları ile ulaşılmak istenen eşik değerler

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında farklı doğrulama seviyelerinde hazırlanan standart ilavesi yapılan kör numuneler (antibiyotik kalıntısı yönünden temiz olduğu test edilmiş) analiz edilmiş, her düzeyde elde edilen sonuçlar üzerinden yanlış

negatiflik oranları hesaplanmış ve yanlış negatiflik oranının %5'i aşmadığı ilk konsantrasyon seviyesinin yöntemin CCβ değeri olduğu doğrulandı. Tüm bu adımlar sonucunda kör numune varyasyonunun değerlendirilmesi, güçlendirilmiş numunelerin yanıt dağılımının ortaya konması, STC etrafındaki performansın istatistiksel olarak sınanması ve tarama pozitiflik karar mekanizmasının güvenilir şekilde oluşturulması sağlandı; böylece yöntemin matrikse özgü davranışı, seçiciliği ve saptama gücü bütüncül bir doğrulama süreciyle ortaya konuldu.

Tablo 14. Validasyonda kullanılan parametrelerin açıklaması

Kısaltma	Açıklama (Türkçe)	Hesap formülleri
STC (Screening Target Concentration)	**Tarama hedef konsantrasyonu:** Bir tarama ölçümünün numuneyi potansiyel olarak uyumlu olmayan Tarama Pozitif' olarak kategorize ettiği ve bir doğrulama testini tetiklediği CCβ'ya eşit veya daha düşük konsantrasyon anlamına gelmektedir.	$CC\beta = STC$
T (Threshold Level)	**Kör numunelerin yanıt varyasyonundan hesaplanan eşik değer:** Yanıttan, sinyalden veya tekrarlanan boş numunelerin konsantrasyonundan hesaplanır. Eşik seviyesi T, Cut-Off seviyesi Fm'den küçük olmalıdır.	$T = B + (1.64 \times SD_b)$
Fm (Cut-Off Level)	**Güçlendirilmiş numunelerin yanıt dağılımından hesaplanan karar seviyesi:** Bir numunenin STC seviyesinde veya üzerinde bir analit içerdiğini gösteren bir tarama testinden elde edilen yanıt, sinyal veya konsantrasyondur. Cut-Off seviyesi ve dolayısıyla karşılık gelen STC aşılırsa, müteakip bir doğrulama testi gerçekleştirilir. Tam doğrulama süreci sırasında, Cut-Off seviyesi Fm, boş matriks numunelerinin ve STC seviyesinde güçlendirilen aynı numunelerin kopyalarının analizi yoluyla belirlenebilir	$Fm = M - (1.64 \times SD)$
B (Blank Mean Response)	**Kör numunelerin ortalama sinyal yanıtı:** Kör numunelerden elde edilen sinyallerin ortalaması	$B = \frac{\sum x_{blank}}{n}$
SDb (Standard Deviation of Blank Responses)	**Kör numunelerin sinyal yanıtı standart sapması:** Kör numunelerden elde edilen sinyallerin standart sapması	$SD_b = \sqrt{\frac{\sum (x_{blank} - B)^2}{n-1}}$
M (Mean Response of Fortified Samples)	**Zenginleştirilen numunelerin ortalama yanıtı:** Validasyon çalışma seviyesinde elde edilen sonuçların ortalaması	$M = \frac{\sum x_{fortified}}{n}$
SD (Standard Deviation of Fortified Responses)	**Zenginleştirilen numunelerin yanıt standart sapması:** Validasyon çalışma seviyesinde elde edilen sonuçların standart sapması	$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_{fortified} - M)^2}{n-1}}$
CCβ (Detection Capability)	**Yanlış negatiflik oranının %5'i geçmediği ilk konsantrasyon seviyesi:** β hata olasılığı ile bir numunede tespit edilebilecek veya ölçülebilecek en küçük analit içeriği anlamına gelmektedir	
β-hatası (Beta-error)	**Yanlış negatif:** Pozitif numunenin yanlışlıkla negatif sınıflandırılma olasılığı	

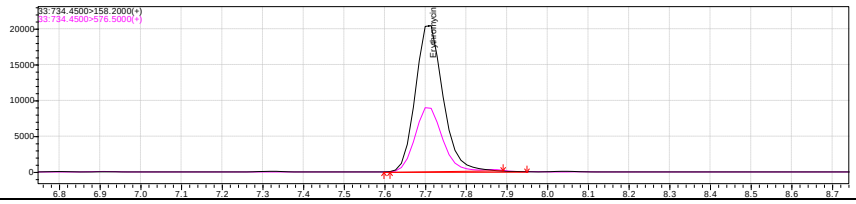
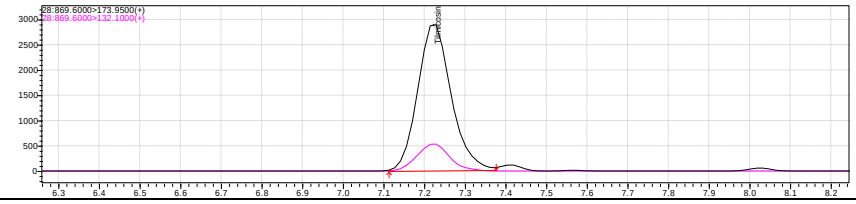
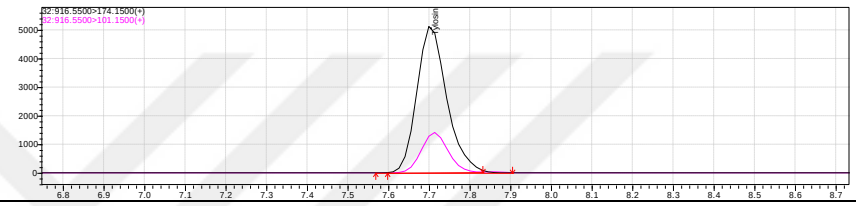
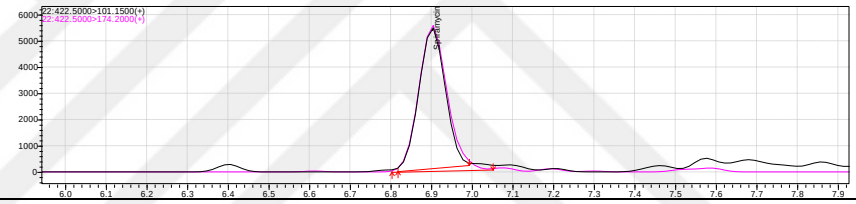
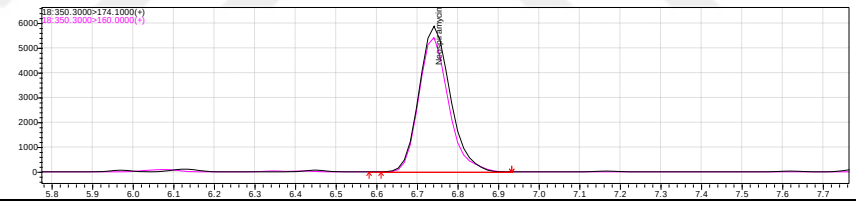
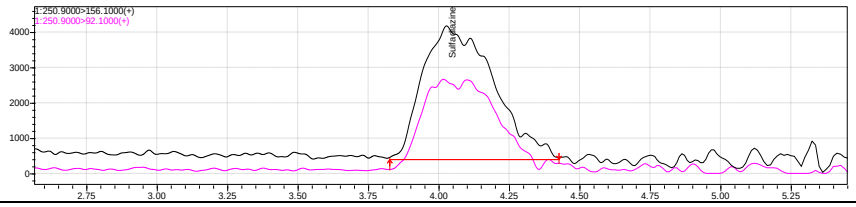
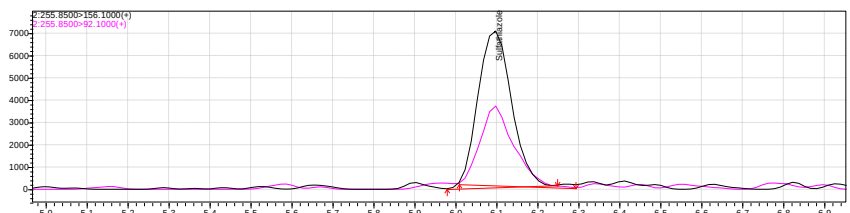
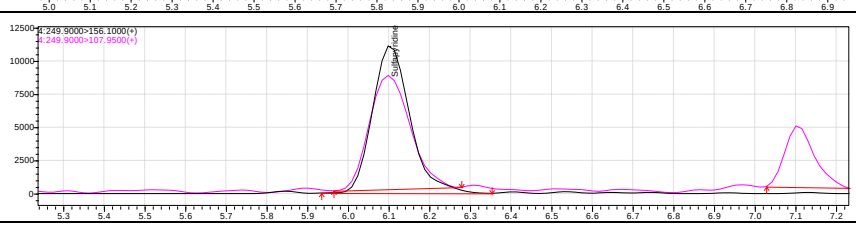
4. BULGULAR

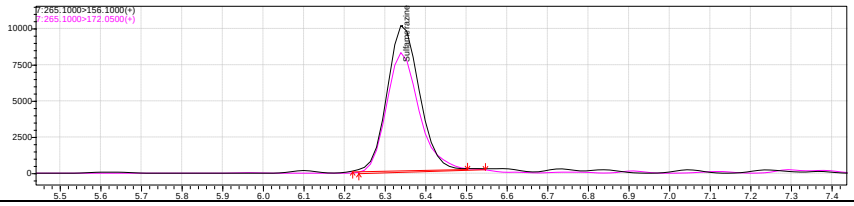
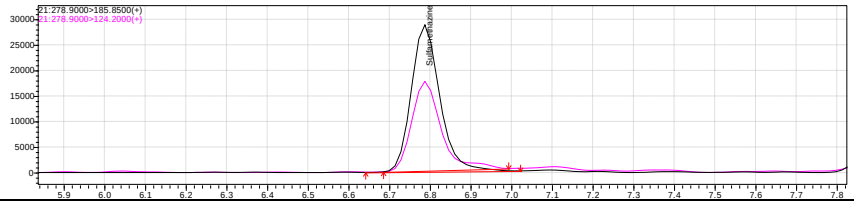
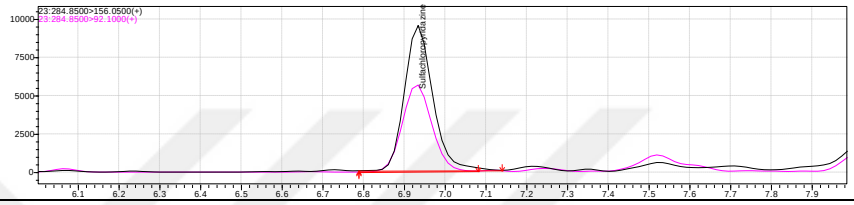
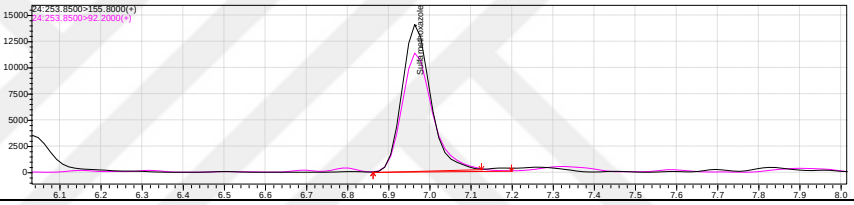
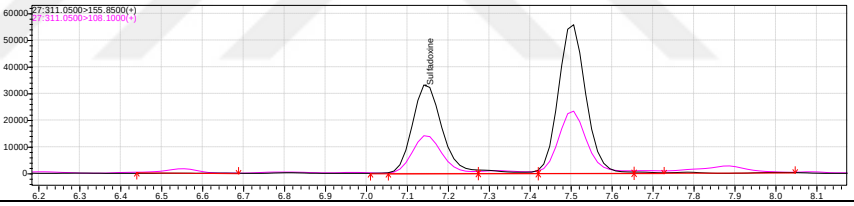
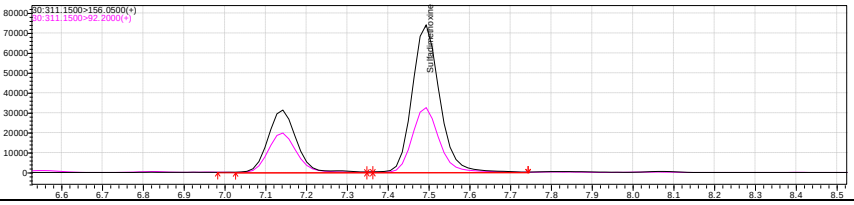
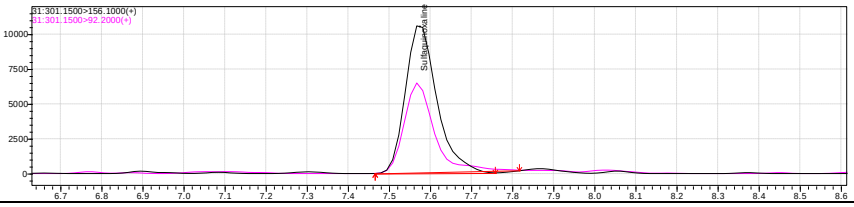
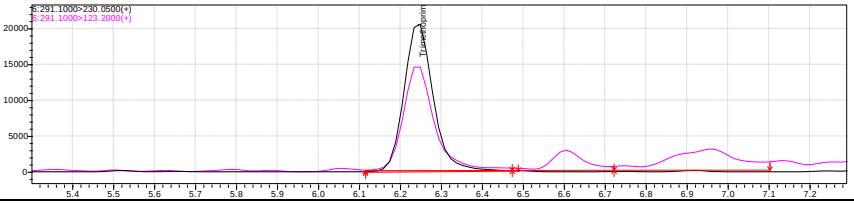
4.1. Tarama Metodunun Genel Validasyon Performansı

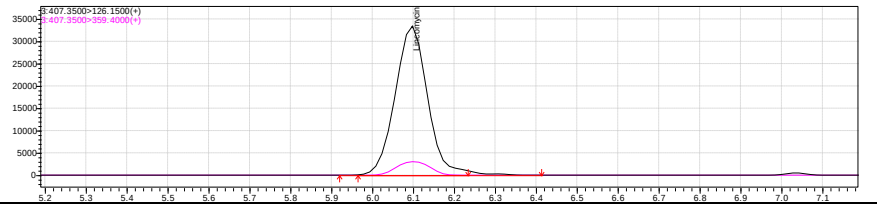
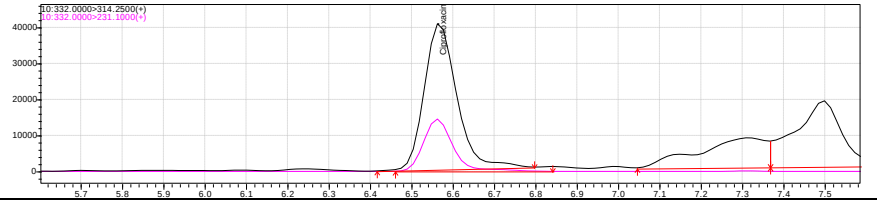
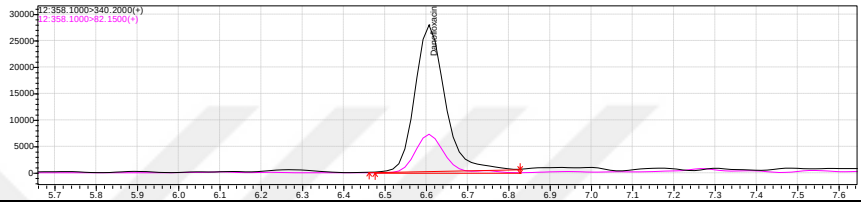
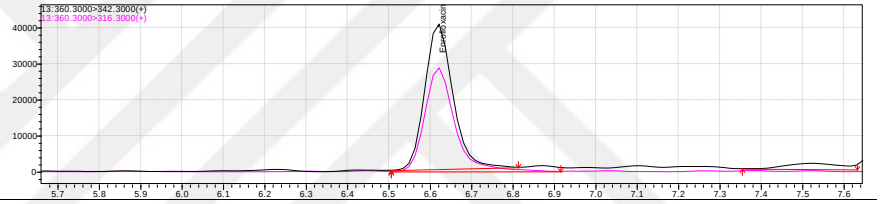
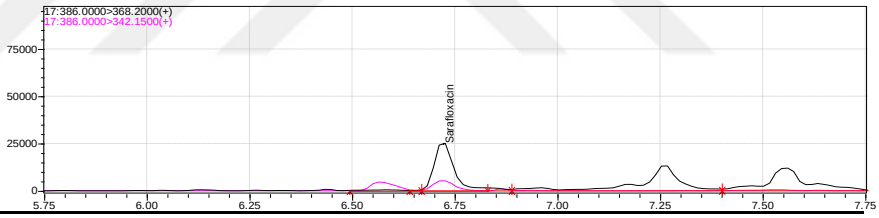
Bu tez kapsamında modifiye edilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodu; polen, perga, alkol bazlı propolis, su bazlı propolis ve arı sütü olmak üzere beş farklı arı ürünü matriksinde validasyon çalışmasına tabi tutuldu. Yöntem, toplam 21 hedef antibiyotiği (sülfonamidler, florokinolonlar, makrolidler/linkozamid ve trimethoprim) kapsamaktadır. Validasyon değerlendirmesi, Tablo 14'de tanımlanan STC, T, Fm, B, SDb, M, SD ve CCβ parametrelerine göre, STC'nin 10 µg/kg olarak belirlendiği ve 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilen numuneler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu parametre seti, tarama yöntemlerine yönelik Avrupa Birliği mevzuatında önerilen yaklaşımla uyumlu olup, yanlış negatiflik olasılığının kontrol edilmesine ve metot güvenilirliğinin istatistiksel temelde ortaya konulmasına olanak sağlamaktadır.

Toplam 21 hedef antibiyotiğin tamamı, en az bir matrikste validasyon kriterlerini karşıladığı görüldü. Matriks bazında değerlendirildiğinde; su bazlı propolis matriksinde 21 analitten 18'i, alkol bazlı propolis matriksinde 17'si, arı sütü matriksinde 15'i, polen matriksinde 13'ü ve perga matriksinde ise 10'u STC düzeyinde tarama yöntemi için belirlenen kriterleri sağlamıştır. Analit bazında bakıldığında ise, 7 antibiyotiğin (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfadoxine, sulfadimethoxine, lincomycin, erythromycin ve tylosin) beş matriksin tamamında valide edildiği; 6 analitin (neospiramycin, spiramycin, sulfamethazine, sulfapyridine, sulfaquinoxaline ve tilmicosin) dört matrikste; 3 analitin (enrofloxacin, sulfamethoxazole ve trimethoprim) üç matrikste; 1 analitin (sulfachloropyridazine) iki matrikste ve 3 analitin (ciprofloxacin, danofloxacin ve sulfathiazole) yalnızca tek bir matrikste validasyon kriterlerini karşıladığı belirlenmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Örnek olarak çalışılan matrikslerdeki analitlerini kromatogramları

Bileşen	**Örnek kromatogram**	Tablo 15'in devamı
Erythromycin Rt:7.70		
Tilmicosin Rt:7.22		
Tylosin Rt:7.70		
Spiramycin Rt:6.90		
Neo Spiramycin Rt:6.75		
Sulfadiazine Rt:4.20		
Sulfathiazole Rt:6.10		
Sulfapyridine Rt:6.10		

Bileşen	**Örnek kromatogram**	Tablo 15'in devamı
Sulfamerazine Rt:6.35		
Sulfamethazine Rt:6.79		
Sulfachloropyridazine Rt:6.95		
Sulfamethoxazole Rt:6.97		
Sulfadoxine Rt:7.15		
Sulfadimethoxine Rt:7.50		
Sulfaquinoxaline Rt:7.56		
Trimethoprim Rt:6.25		

Bileşen	Örnek kromatogram	Tablo 15'in devamı
Lincomycin Rt:6.1		
Ciprofloxacin Rt:6.55		
Danofloxacin Rt:6.61		
Enrofloxacin Rt:6.64		
Sarafloxacin Rt:6.62		

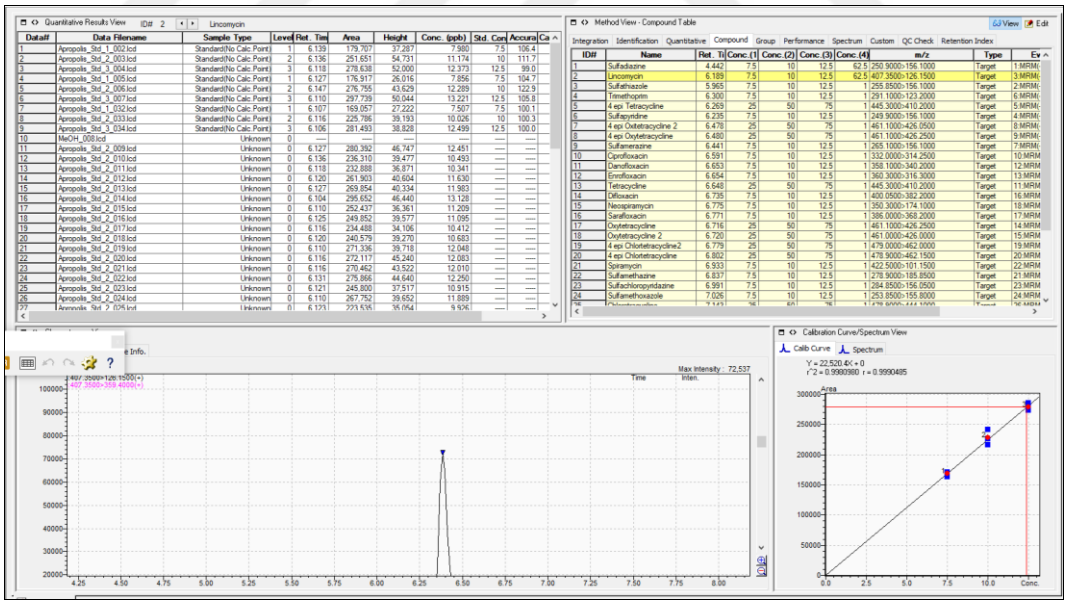
Özellikle sulfadiazine, sulfamerazine, sulfadoxine, sulfadimethoxine, lincomycin, erythromycin ve tylosin'in tüm matrikslerde valide edilmiş olması, yöntemin bu analitler için yüksek matriks-robustluğu yani yöntemin farklı koşullar veya örnek türleri altında güvenilir ve tutarlı çalışabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu analitlerde boş numune sinyallerinin düşük düzeyde kalması ve 10 µg/kg düzeyinde antibiyotik ile zenginleştirilen numunelerin ortalama yanıtı olan M değerinin, ilgili eşik değer olan T ve kesme seviyesi olan Fm üzerinde gerçekleşmesi, β-hatasının kabul edilebilir sınırlar içinde kaldığını ve CCβ'nin STC'ye eşit veya daha düşük olduğunu gösterdi.

Genel olarak tüm matrikslerde B değerlerinin düşük olması ve numunelerden elde edilen ortalama M yanıtlarının hem T hem de B değerlerinin istatistiksel olarak

anlamlı düzeyde üzerinde bulunması, yöntemin seçicilik ve duyarlılık açısından güçlü bir performans sergilediğini göstermektedir. Bu sonuç, kimyasal bileşimi oldukça değişken ve kompleks olan arı ürünleri matrikslerinde dahi geliştirilen LC-MS/MS tabanlı yöntemin tarama amaçlı kullanımının mümkün ve güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

4.1.1. Alkol bazlı propolis matriksinde validasyon bulguları

Alkol bazlı propolis ekstraktında geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodu, hedeflenen 21 antibiyotikten 17'si için STC düzeyinde tarama amaçlı validasyon kriterlerini karşılamıştır. Bu matrikste valide edilen antibiyotikler; sulfonamidler grubundan sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfadoxine, sulfadimethoxine ve sulfaquinoxaline; florokinolon grubundan enrofloxacin; makrolid/linkozamid grubundan lincomycin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin, erythromycin ve tylosin; diaminopirimidin grubundan ise trimethoprim'dir (Şekil 12, Tablo 15).



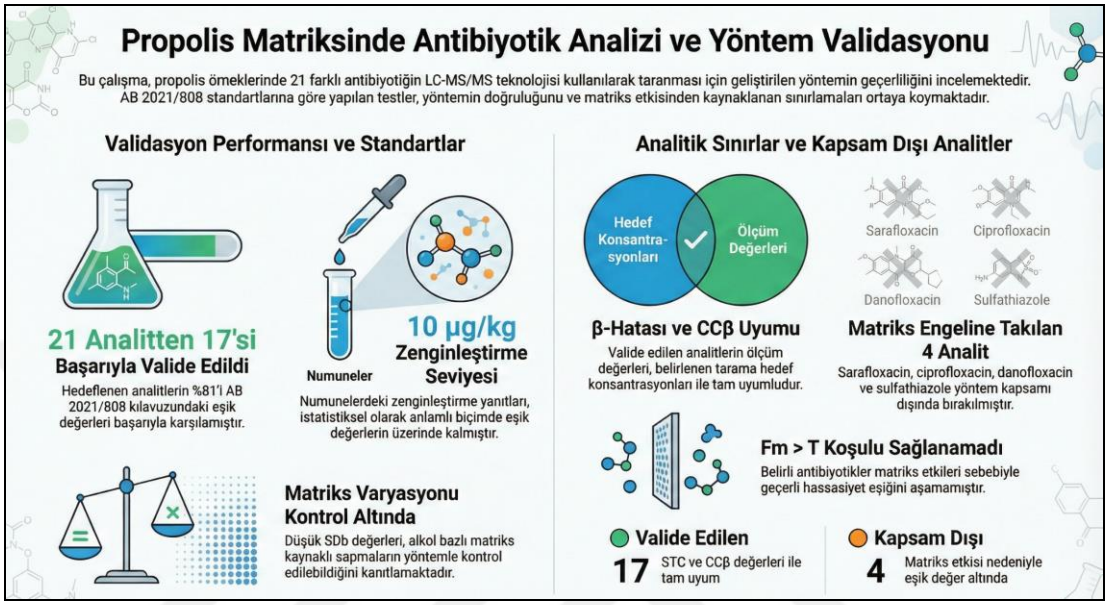
Şekil 12. Alkol bazlı propolis matriksi için örnek cihaz görüntüsü

Tablo 15. Alkol bazlı propolis validasyon sonuçları

	Analit	B (µg/kg)	B Sd	T	M 10 µg/kg	M 10 µg/kg Sd	Fm Cut-off µg/kg	T< analitik yanıt sayısı	STC 10	Fm Cut-off Değeri>T
1	Sulfadiazine	0.103	0.063	0.206	10.734	0.487	9.936	19	1	DOĞRU
2	Lincomycin	1.270	0.902	2.749	10.949	0.797	9.641	19	1	DOĞRU
3	Trimethoprim	0.211	0.159	0.472	11.402	0.782	10.120	20	0	DOĞRU
4	Sulfapyridine	0.351	0.217	0.707	11.468	1.241	9.432	19	1	DOĞRU
5	Sulfamerazine	0.253	0.253	0.668	10.495	0.914	8.995	20	0	DOĞRU
6	Enrofloxacin	0.336	0.318	0.857	11.321	0.817	9.981	19	1	DOĞRU
7	Neospiramycin	0.376	0.297	0.863	9.955	1.388	7.678	20	0	DOĞRU
8	Spiramycin	0.219	0.181	0.516	10.258	1.078	8.489	19	1	DOĞRU
9	Sulfamethazine	0.074	0.073	0.193	10.217	0.681	9.101	19	1	DOĞRU
10	Sulfachloropyridazine	0.226	0.243	0.624	10.483	1.052	8.759	20	0	DOĞRU
11	Sulfamethoxazole	0.470	0.249	0.879	10.074	0.876	8.638	20	0	DOĞRU
12	Tilmicosin	0.547	0.348	1.118	11.008	1.781	8.087	19	1	DOĞRU
13	Sulfadoxine	0.105	0.101	0.271	10.745	0.897	9.274	19	1	DOĞRU
14	Sulfadimethoxine	0.423	0.390	1.062	10.893	0.800	9.581	20	0	DOĞRU
15	Sulfaquinoxaline	0.395	0.298	0.884	10.674	0.762	9.424	19	1	DOĞRU
16	Erythromycin	0.379	0.094	0.533	10.548	0.690	9.417	19	1	DOĞRU
17	Tylosin	0.046	0.061	0.145	10.907	0.896	9.437	19	1	DOĞRU

Alkol Bazlı Propolis matriksi için validasyon tablolarında yer alan söz konusu 17 analitin tamamında, Fm cut-off değerlerinin ilgili eşik seviyesi olan T değerlerinden yüksek olduğu ve 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilen numunelerde analitik yanıt olan M'nin tüm analitler için T'nin üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Valide edilen analitlerde boş numunelere ait ortalama yanıtları olan B 0,046-1,270 µg/kg aralığında değişmekte olup, en düşük B değeri tylosin için 0,046 µg/kg, en yüksek B değeri ise lincomycin için 1,270 µg/kg olarak hesaplanmıştır. Boş numune yanıtlarının eşik seviyesi olan T ise 0,145-2,749 aralığında bulundu. 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilen numunelerde M değeri 9,955-11,468 µg/kg arasında değişmiş; Fm cut-off değerleri ise 7,678-10,120 µg/kg aralığında hesaplanmış, en düşük Fm neospiramycin için 7,678 µg/kg, en yüksek Fm ise trimethoprim için 10,120 µg/kg olarak belirlendi. Ayrıca boş numune sinyallerine ait standart sapması olan SDb değeri 0,061-0,902 aralığında kalması, blank yanıtlarının dağılım açısından da kontrol altında olduğunu göstermektedir. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, alkol bazlı propolis matriksinde valide edilen antibiyotiklerin tamamı için zenginleştirilmiş numune yanıtlarının hem T hem de B değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde üzerinde olduğu ve tüm analitlerde Fm>T koşulunun sağlandığı anlaşılmaktadır. Böylece, bu matriks için validasyonu yapılan analitlerde β-hatasının kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu ve CCβ değerlerinin STC ile uyumlu olduğu ortaya konuldu. Buna karşın, sarafloxacin, ciprofloxacin,

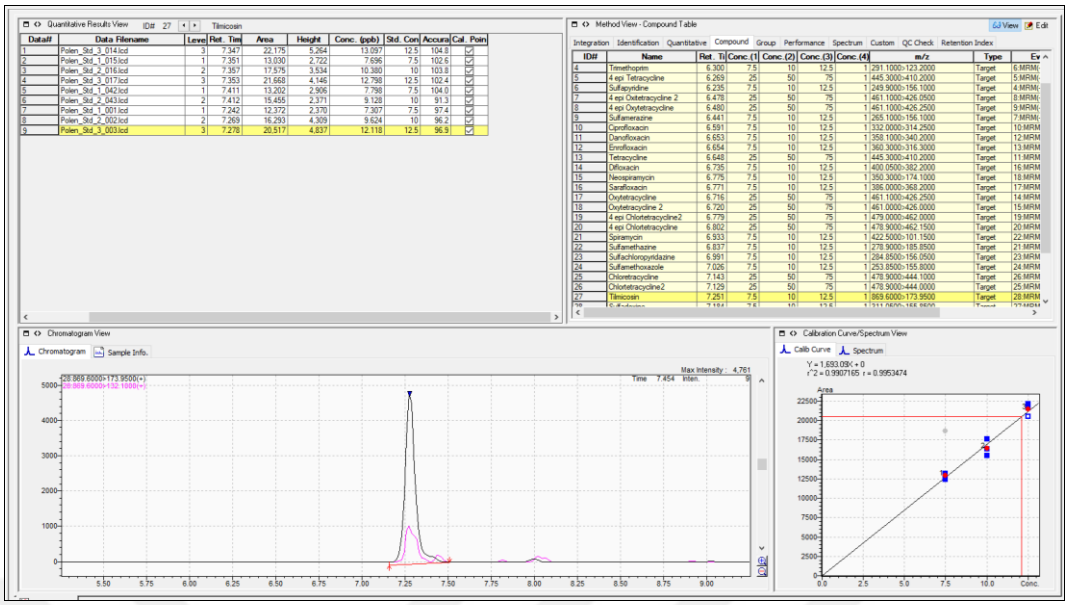
danofloxacin ve sulfathiazole için bu matrikste validasyon kriterleri sağlanamadı; bu analitlerde Fm>T koşulu ve/veya STC seviyesinde kabul edilebilir β-hatası elde edilemediği için söz konusu üç antibiyotik alkol bazlı propolis matriksinde tarama metodunun geçerli kapsamı dışında kaldı (Şekil 13).



Şekil 13. Propolis matriksi validasyonu

4.1.2. Polen matriksinde validasyon bulguları

Polen matriksinde, geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metoduyla hedeflenen 21 antibiyotikten 13'ü için validasyon kriterleri karşılanmıştır. Bu matrikste valide edilen antibiyotikler; sulfonamidler grubundan sulfadiazine, sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadoxine ve sulfadimethoxine; makrolid/linkozamid grubundan ise lincomycin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin, erythromycin ve tylosin'dir (Şekil 14, Tablo 16).



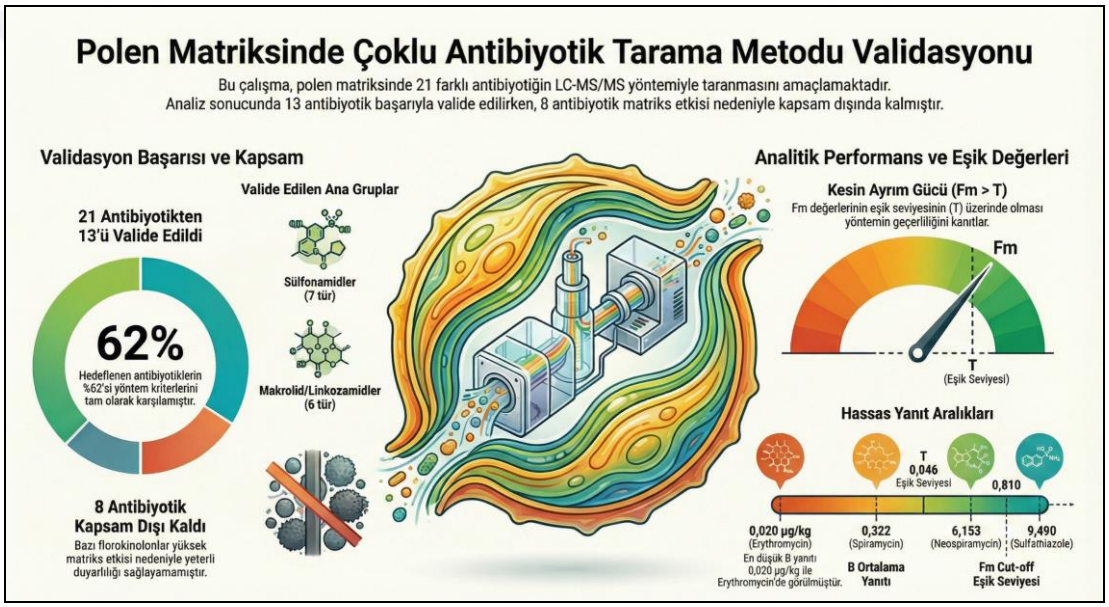
Şekil 14. Polen matriksi için örnek cihaz görüntüsü

Tablo 16. Polen validasyon sonuçları

	Analit	B (µg/kg)	B Sd	T	M 10 µg/kg	M 10 µg/kg Sd	Fm Cut-off µg/kg	T< analitik yanıt sayısı	STC 10	Fm Cut-off Değeri>T
1	Sulfadiazine	0.050	0.028	0.095	9.994	0.886	8.541	19	1	DOĞRU
2	Lincomycin	0.156	0.090	0.302	11.065	1.307	8.921	20	0	DOĞRU
3	Sulfathiazole	0.252	0.184	0.553	11.328	1.121	9.490	20	0	DOĞRU
4	Sulfapyridine	0.205	0.369	0.810	10.150	1.244	8.109	19	1	DOĞRU
5	Sulfamerazine	0.247	0.170	0.526	9.515	0.998	7.878	19	1	DOĞRU
6	Neospiramycin	0.060	0.270	0.503	8.551	1.462	6.153	19	1	DOĞRU
7	Spiramycin	0.322	0.237	0.710	13.572	2.699	9.145	20	0	DOĞRU
8	Sulfamethazine	0.131	0.063	0.235	10.023	0.722	8.839	20	0	DOĞRU
9	Tilmicosin	0.146	0.130	0.358	9.634	1.300	7.503	19	1	DOĞRU
10	Sulfadoxine	0.189	0.180	0.484	11.247	2.289	7.493	20	0	DOĞRU
11	Sulfadimethoxine	0.056	0.070	0.171	9.833	0.677	8.722	19	1	DOĞRU
12	Erythromycin	0.020	0.016	0.046	10.173	0.702	9.022	19	1	DOĞRU
13	Tylosin	0.143	0.118	0.336	9.938	1.128	8.088	19	1	DOĞRU

Çalışmamda polen numunelerinde B ortalama yanıtları B 0,020-0,322 µg/kg aralığında değişmekte olup, en düşük B değeri erythromycin için 0,020 µg/kg, en yüksek B değeri ise spiramycin için 0,322 µg/kg olarak hesaplandı. Boş numune yanıtlarından elde edilen T eşik seviyeleri 0,046-0,810 arasında değişmektedir. 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilmiş edilen polen numunelerinde M ortalama yanıtları 8,551-13,572 µg/kg aralığında bulunmuş, Fm cut-off değerleri ise 6,153-9,490 µg/kg arasında hesaplandı; en düşük Fm neospiramycin için 6,153 µg/kg, en yüksek Fm ise sulfathiazole için 9,490 µg/kg olarak belirlendi. Polen matriksinde tüm valide

analitler için Fm değerlerinin T'nin üzerinde olması ve zenginleştirilmiş numunelerden elde edilen sinyal yanıtlarının eşik seviyesinin anlamlı düzeyde üzerinde gerçekleşmesi, blank ve zenginleştirilmiş numuneler arasında yeterli ayrım olduğunu ve yöntemin bu matriks için geçerli olduğunu göstermektedir. Buna karşın sarafloxacin, enrofloxacin, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, trimethoprim ile birlikte ciprofloxacin ve danofloxacin için validasyon kriterleri sağlanamadı; bu sekiz antibiyotik polen matriksinde tarama metodunun kapsamı dışında kaldı. Bu durum, özellikle bazı florokinolonlar ve belirli sülfonamidlerin polen matriksinde daha belirgin matriks etkilerine maruz kaldığını ve STC düzeyinde yeterli duyarlılığın sağlanamadığını düşündürdü (Şekil 15).

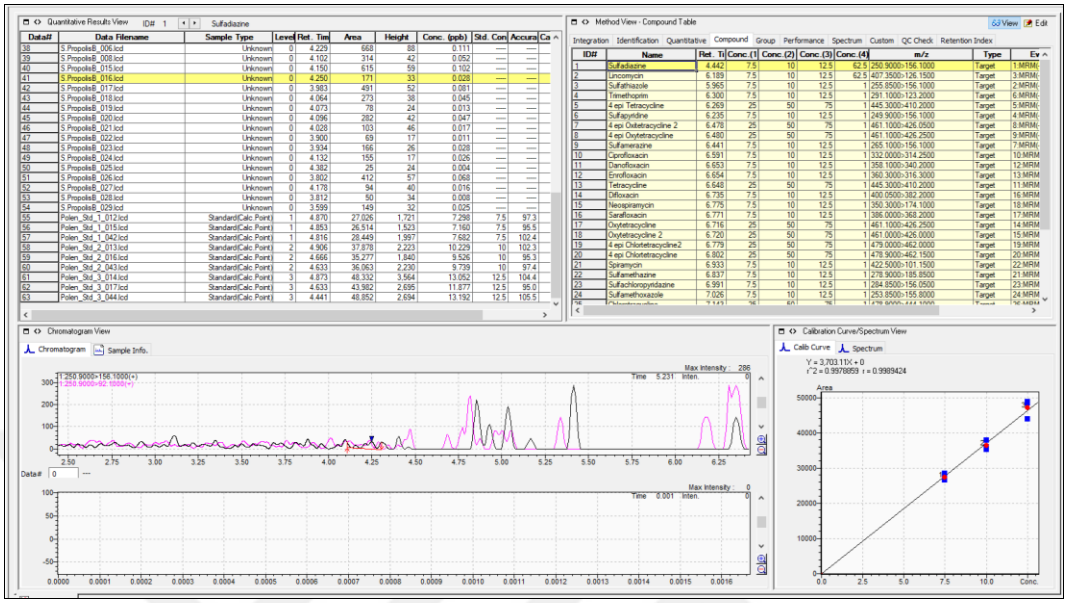


Şekil 15. Polen matriksi validasyonu

4.1.3. Su bazlı propolis matriksinde validasyon bulguları

Su bazlı propolis matriksi, çalışmada en geniş kapsamlı validasyonun gerçekleştirildiği matriks olmuştur. Bu matrikste hedeflenen 21 antibiyotikten 18'i için tarama yöntemi başarılı bir şekilde valide edildi. Valide edilen antibiyotikler; sulfonamidler grubundan sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfadoxine, sulfadimethoxine ve sulfaquinoxaline; florokinolonlar grubundan ciprofloxacin, danofloxacin ve enrofloxacin; makrolid/linkozamid grubundan lincomycin, neospiramycin,

spiramycin, erythromycin ve tylosin; diaminopirimidin grubundan ise trimethoprim'dir (Şekil 16, Tablo 17).

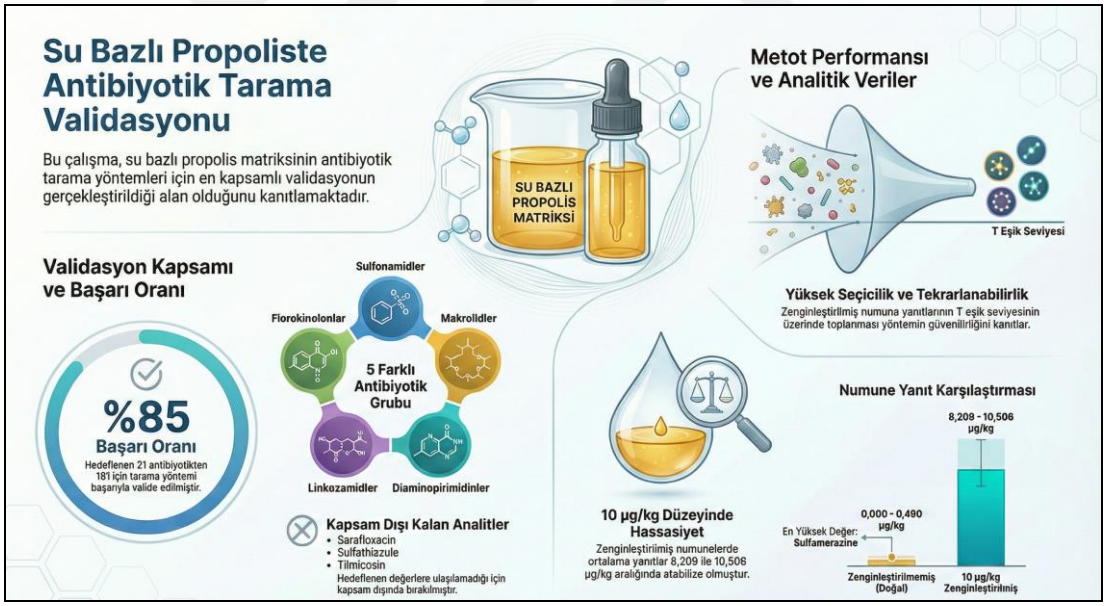


Şekil 16. Su bazlı propolis matriksi için örnek cihaz görüntüsü

Tablo 17. Su bazlı propolis validasyon raporu

	Analit	B (µg/kg)	B Sd	T	M 10 µg/kg	M 10 µg/kg Sd	Fm Cut-off µg/kg	T< analitik yanıt sayısı	STC 10	Fm Cut-off Değeri>T
1	Sulfadiazine	0.056	0.050	0.138	8.630	0.749	7.401	20	0	DOĞRU
2	Lincomycin	0.056	0.050	0.138	9.258	1.092	7.467	19	1	DOĞRU
3	Trimethoprim	0.293	0.128	0.503	9.522	0.604	8.532	19	1	DOĞRU
4	Sulfapyridine	0.067	0.059	0.164	9.824	1.208	7.844	19	1	DOĞRU
5	Sulfamerazine	0.490	0.238	0.880	8.469	0.975	6.869	20	0	DOĞRU
6	Ciprofloxacin	0.359	0.294	0.842	10.132	1.029	8.445	20	0	DOĞRU
7	Danofloxacin	0.114	0.080	0.246	8.970	1.180	7.034	19	1	DOĞRU
8	Enrofloxacin	0.067	0.059	0.164	8.734	0.542	7.846	20	0	DOĞRU
9	Neospiramycin	0.163	0.130	0.377	10.506	1.084	8.727	20	0	DOĞRU
10	Spiramycin	0.117	0.068	0.229	9.799	0.819	8.456	19	1	DOĞRU
11	Sulfamethazine	0.057	0.053	0.143	8.872	0.673	7.769	19	1	DOĞRU
12	Sulfachloropyridazine	0.290	0.184	0.591	8.566	0.703	7.413	20	0	DOĞRU
13	Sulfamethoxazole	0.154	0.070	0.269	9.268	0.915	7.768	20	0	DOĞRU
14	Sulfadoxine	0.040	0.042	0.109	8.518	1.043	6.807	20	0	DOĞRU
15	Sulfadimethoxine	0.200	0.107	0.376	9.020	0.638	7.974	20	0	DOĞRU
16	Sulfaquinoxaline	0.082	0.126	0.289	8.209	0.709	7.046	20	0	DOĞRU
17	Erythromycin	0.007	0.013	0.028	9.789	0.608	8.793	19	1	DOĞRU
18	Tylosin	0.000	0.001	0.003	10.305	1.362	8.071	19	1	DOĞRU

Zenginleştirilmemiş su bazlı propolis numunelerinde B ortalama yanıtları 0,000-0,490 µg/kg aralığında olup, en düşük B değeri tylosin için sıfıra yakın 0,000, en yüksek B değeri ise sulfamerazine için 0,490 olarak hesaplandı. T eşik seviyeleri 0,003-0,880 aralığında bulundu. 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilmiş su bazlı propolis numunelerinde M ortalama yanıtları 8,209-10,506 µg/kg aralığında hesaplandı. En düşük Fm sulfadoxine için 6,807 µg/kg, en yüksek Fm ise erythromycin için 8,793 µg/kg olarak belirlendi. Zenginleştirilmemiş numune yanıtlarının genel olarak çok düşük düzeylerde ve zenginleştirilmiş numune yanıtlarının birbirine yakın değerlerde bulundu. Bu değerler T eşik seviyesinin belirgin şekilde üzerinde toplanması, bu matriks için yöntemin yüksek seçicilik ve tekrarlanabilirlik sergilediğini gösterdi. Su bazlı propolis için sarafloxacin, sulfathiazole ve tilmicosin analitleri validasyon kriterlerini karşılamamış; bu üç analitte STC seviyesinde hedeflenen CCβ değerlerine ulaşılamadığı için, söz konusu antibiyotikler bu matriks için tarama metodunun kapsamı dışında kaldı (Şekil 17).

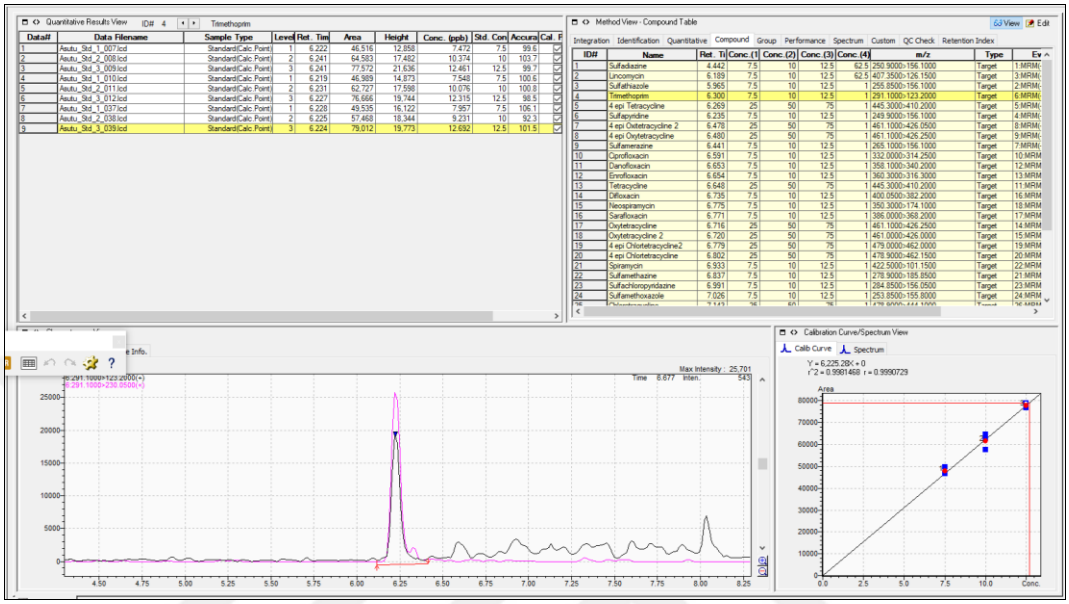


Şekil 17. Su bazlı propolis validasyonu

4.1.4. Arı sütü matriksinde validasyon bulguları

Arı sütü matriksinde, geliştirilen tarama yöntemi hedeflenen 21 antibiyotikten 15'i için STC düzeyinde başarıyla valide edilmiştir. Bu matrikste valide edilen antibiyotikler; sulfonamidler grubundan sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfadoxine, sulfadimethoxine ve sulfaquinoxaline; florokinolon

grubundan enrofloxacin; makrolid/linkozamid grubundan lincomycin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin, erythromycin ve tylosin; diaminopirimidin grubundan ise trimethoprim'dir (Şekil 18, Tablo18).



Şekil 18. Arı sütü matriksi için örnek cihaz görüntüsü

Tablo 18. Arı sütü validasyon raporu

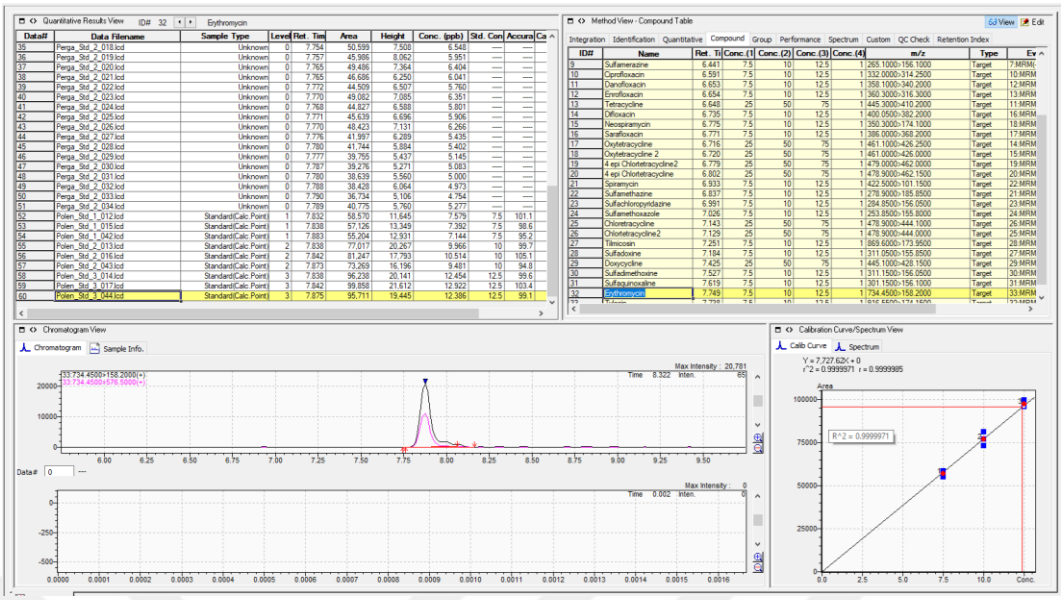
	Analit	B (µg/kg)	B Sd	T	M 10 µg/kg	M 10 µg/kg Sd	Fm Cut-off µg/kg	T< analitik yanıt sayısı	STC 10	Fm Cut-off Değeri>T
1	Sulfadiazine	0.240	0.218	0.597	9.952	0.744	8.732	20	0	DOĞRU
2	Lincomycin	0.087	0.092	0.237	10.478	0.851	9.082	20	0	DOĞRU
3	Trimethoprim	0.142	0.097	0.301	10.030	0.746	8.807	19	1	DOĞRU
4	Sulfapyridine	0.068	0.035	0.126	9.845	1.007	8.195	20	0	DOĞRU
5	Sulfamerazine	0.130	0.066	0.239	9.402	0.775	8.130	20	0	DOĞRU
6	Enrofloxacin	0.190	0.117	0.381	10.825	0.770	9.562	19	1	DOĞRU
7	Neospiramycin	0.131	0.123	0.332	9.947	1.129	8.095	19	1	DOĞRU
8	Spiramycin	0.350	0.270	0.794	11.170	0.911	9.675	19	1	DOĞRU
9	Sulfamethoxazole	0.277	0.160	0.538	10.652	0.918	9.147	20	0	DOĞRU
10	Tilmicosin	0.112	0.083	0.249	9.973	1.037	8.272	19	1	DOĞRU
11	Sulfadoxine	0.177	0.110	0.358	10.029	0.876	8.593	19	1	DOĞRU
12	Sulfadimethoxine	0.060	0.056	0.151	10.492	0.796	9.187	19	1	DOĞRU
13	Sulfaquinoxaline	0.364	0.306	0.866	10.049	0.706	8.890	20	0	DOĞRU
14	Erythromycin	0.011	0.006	0.021	10.707	0.731	9.508	19	1	DOĞRU
15	Tylosin	0.016	0.034	0.072	10.759	1.431	8.412	20	0	DOĞRU

Zenginleştirilmemiş arı sütü numunelerinde B ortalama yanıtlar 0,011-0,364 µg/kg aralığında olup, en düşük B değeri erythromycin için 0,011 µg/kg, en yüksek B değeri ise sulfaquinoxaline için 0,364 µg/kg olarak hesaplanmıştır. T eşik seviyeleri

0,021-0,866 arasında değişmektedir. 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilmiş arı sütü numunelerinde M ortalama yanıtları 9,402-11,170 µg/kg aralığında bulunmuş; Fm cut-off değerleri 8,095-9,675 µg/kg arasında hesaplanmıştır. En düşük Fm neospiramycin için 8,095 µg/kg, en yüksek Fm ise spiramycin için 9,675 µg/kg olarak belirlenmiştir. Protein ve lipid içeriği yüksek bir matriks olmasına rağmen, validasyonu sağlanan analitler için boş numune yanıtlarının düşük; zenginleştirilmiş numune yanıtlarının ise T'nin belirgin şekilde üzerinde olması, arı sütü matriksinde yönteminin hem seçicilik hem de duyarlılık açısından yeterli performans sergilediğini gösterdi. Buna karşın sarafloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, sulfachloropyridazine, sulfamethazine ve sulfathiazole için arı sütü matriksinde validasyon kriterleri karşılanamamış; bu altı antibiyotik için STC seviyesinde kabul edilebilir CCβ değerlerine ulaşılamadığı için söz konusu analitler bu matriks için tarama metodunun kapsamı dışında bırakıldı. Bulgular, bazı florokinolonlar ve belirli sülfonamidler için arı sütü matriksinde geri kazanım ve sinyal kararlılığının daha problemli olduğunu gösterdi.

4.1.5. Perga matriksinde validasyon bulguları

Perga, çalışılan beş matriks arasında en sınırlı validasyon kapsamının elde edildiği matrikstir. Perga matriksinde hedeflenen 21 antibiyotikten 10'u için validasyon kriterleri karşılanmış ve bu analitler STC düzeyinde tarama metodunun geçerli kapsamı içinde değerlendirilmiştir. Valide edilen antibiyotikler; sulfonamidler grubundan sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadoxine, sulfadimethoxine ve sulfaquinoxaline; makrolid/linkozamid grubundan ise lincomycin, tilmicosin, erythromycin ve tylosin'dir (Şekil 19, Tablo 19).



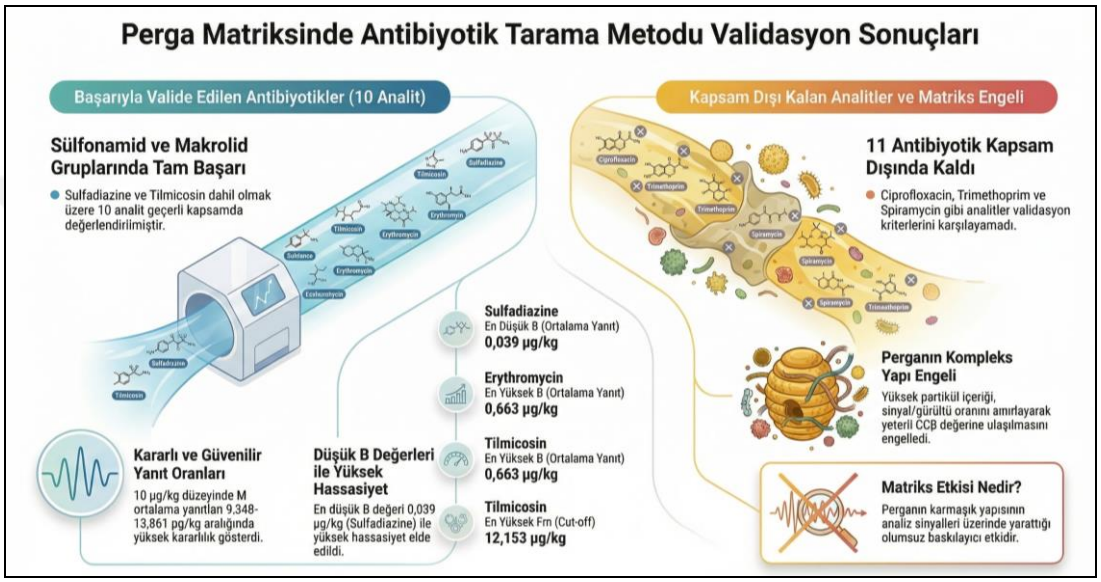
Şekil 19. Perga matriksi için örnek cihaz görüntüsü

Tablo 19. Perga validasyon raporu

	Analit	B µg/kg	B Sd	T	M 10 µg/kg	M 10 µg/kg Sd	Fm Cut-off µg/kg	T< analitik yanıt sayısı	STC 10	Fm Cut-off Değeri>T
1	Sulfadiazine	0.039	0.028	0.085	10.092	0.406	9.426	19	1	DOĞRU
2	Lincomycin	0.336	0.316	0.855	11.461	1.019	9.789	19	1	DOĞRU
3	Sulfamerazine	0.230	0.157	0.488	11.068	0.842	9.687	19	1	DOĞRU
4	Sulfamethazine	0.147	0.104	0.317	10.024	1.112	8.200	19	1	DOĞRU
5	Tilmicosin	0.145	0.082	0.279	13.861	1.041	12.153	20	0	DOĞRU
6	Sulfadoxine	0.053	0.027	0.097	10.963	1.005	9.315	19	1	DOĞRU
7	Sulfadimethoxine	0.063	0.037	0.124	11.063	0.547	10.166	19	1	DOĞRU
8	Sulfaquinoxaline	0.511	0.301	1.005	10.003	1.261	7.935	19	1	DOĞRU
9	Erythromycin	0.663	0.109	0.841	9.348	1.079	7.578	20	0	DOĞRU
10	Tylosin	0.098	0.127	0.306	11.142	0.741	9.927	19	1	DOĞRU

Zenginleştirme öncesi analiz edilen perga numunelerinde B ortalama yanıtları 0,039-0,663 µg/kg aralığında olup, en düşük B değeri sulfadiazine için 0,039 µg/kg, en yüksek B değeri ise erythromycin için 0,663 µg/kg olarak hesaplandı. T eşik seviyeleri 0,085-1,005 arasında değişmektedir. 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilerek elde edilen perga numunelerinde M ortalama yanıtları 9,348-13,861 µg/kg aralığında bulundu; Fm cut-off değerleri 7,578-12,153 µg/kg arasında hesaplandı. En düşük Fm erythromycin için 7,578 µg/kg, en yüksek Fm ise tilmicosin için 12,153 µg/kg olarak belirlendi. Perga matriksinde validasyonu sağlanan analitler için B değerlerinin görece düşük, zenginleştirilmiş numune yanıtlarının ise yüksek ve kararlı olması, yöntemin bu analitler için geçerli ve güvenilir bir tarama aracı olduğunu

göstermektedir. Buna karşılık, sarafloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, neospiramycin, spiramycin, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfapyridine, sulfathiazole ve trimethoprim için perga matriksinde validasyon kriterleri sağlanamamış ve bu 11 antibiyotik perga için tarama metodunun kapsamı dışında kalmıştır. Bu durum, bazı analitlerde perga matriksinin yüksek partikül içeriği ve kompleks yapısının sinyal/gürültü oranını sınırlandırdığını ve STC seviyesinde yeterli CCβ elde edilemediğini gösterdi (Şekil 20).



Şekil 20. Perga matriksi validasyonu

4.2. Matriksler Arası Nicel Karşılaştırma

Beş matriks birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodunun belirgin şekilde matriks bağımlı performans farklılıkları gösterdiği görülmektedir. Matriksler arası nicel karşılaştırma yapıldığında, valide edilen antibiyotik sayısının su bazlı propoliste 18, alkol bazlı propoliste 17, arı sütünde 15, polende 13 ve pergada 10 olduğu belirlendi. Bu dağılım, tarama metodu açısından en elverişli matrikslerin propolis ekstraktları olduğunu (su bazlı 18, alkol bazlı 17 analit); arı sütü ve polenin orta düzeyde kapsam sunduğunu, perganın ise en sınırlayıcı matriks olarak öne çıktığını gösterdi.

Analit bazında bakıldığında, yedi antibiyotiğin (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfadoxine, sulfadimethoxine, lincomycin, erythromycin ve tylosin) beş matriksin tamamında valide edilmiş olması, bu bileşikler için yöntemin matriks bağımsız yüksek tarama performansına ve güvenilirliğe sahip olduğunu ortaya koydu. Buna

karşılık, ciprofloxacin ve danofloxacin'in yalnızca su bazlı propolis matriksinde valide edilmiş olması, florokinolon grubunda matriks etkilerinin özellikle polen, perga ve arı sütünde daha belirgin olduğunu düşündürdü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tarama Metodunun Genel Validasyon Performansı

Çalışmamızda, 21 hedef antibiyotiğin farklı matrikslerde validasyon kriterlerini karşılama oranları belirlendi. Su bazlı ekstraksiyon neticesinde propolis matriksinde 18, alkol bazlı ekstraksiyon neticesinde propolis matriksinde ise 17 analitin kriterleri karşılaması, propolis kökenli matrikslerin antibiyotik kalıntı analizinde yöntem duyarlılığı ve doğruluğunu destekleyen bir performans sergilediğini göstermektedir. Bu sonuç, bal ve arı sütü gibi arı ürünlerinde çoklu antibiyotik kalıntısı için geliştirilen LC-MS/MS yöntemlerinde bildirilen yüksek duyarlılık ve matriks uyumluluğu ile paralellik göstermektedir. Sulfathiazole'ün sadece polen matriksinde validasyon kriterlerini karşılaması; sulfachloropyridazine'in ise yalnızca propolis matriksleri (alkol ve su bazlı) ile sınırlı kalması, bu analitlerin matriks bağımlı olarak sınırlı bir performans sergilediğine işaret etmektedir. Buna karşın, polen ve perga matrikslerinde validasyon başarı oranlarının daha düşük olması, kompleks biyolojik matrikslerdeki ko-ekstrakte bileşenlerin iyon baskılanması ve interferans yoluyla analitik hassasiyeti olumsuz etkileyebileceğine işaret etmektedir. Çok sınıflı antibiyotik kalıntı analizlerinde farklı hayvansal ve çevresel matrikslerde bildirilen belirgin matriks etkileri de bu bulguları desteklemekte ve matriks-spesifik optimizasyon gerekliliğini vurgulamaktadır (Jin ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2009).

Çalışmada seçilen analitler arasında özellikle sülfonamidler ve makrolid/linkozamid grubuna ait bileşiklerin tüm matrikslerde başarıyla valide edilmesi, bu sınıfların LC-MS/MS tabanlı çok kalıntılı yöntemlerle matriksler arası uyumunun literatürde bildirilen sonuçlarıyla uyumludur. Sulfamethoxazole'ün propolis matriksleri ve arı sütünde valide edilirken, polen ve pergada kriterleri sağlayamaması; trimethoprim'in ise alkol bazlı propolis, su bazlı propolis ve arı sütü matrikslerinde valide olup polen ve pergada valide edilememesi, özellikle bazı sülfonamidler ve trimethoprim için de matriks-spesifik kısıtlılıkların söz konusu olduğunu gösterdi. Bal ve diğer arı ürünlerinde antibiyotik kalıntılarını hedefleyen çok sınıflı yöntemlerde, sülfonamidler ve makrolidler için genellikle yüksek geri kazanım, iyi tekrarlanabilirlik ve düşük tespit sınırları rapor edilmekte; bu da söz konusu bileşiklerin iyonlaşma veriminin ve ekstraksiyon davranışının karmaşık

biyolojik matrikslerde dahi avantajlı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda bu analitlerin beş matriksin tümünde STC düzeyinde güvenle taranabilmesi, söz konusu literatürü arı sütü, polen ve perga gibi daha az çalışılmış arı ürünleri matrikslerine genişleten bir katkı sunmaktadır (Hajrulai-Musliu ve ark., 2023; Lopez ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2019). Arı ürünlerinin kimyasal bileşimi, yüksek şeker içeriği, fenolik bileşikler, balmumu, proteinler ve organik asitler nedeniyle klasik gıda matrikslerine kıyasla belirgin matriks etkisine sahiptir. LC-MS/MS temelli çok kalıntılı yöntemlerde, özellikle kompleks yem ve bal matrikslerinde matriks etkisinin ve ekstraksiyon veriminin ayrı ayrı değerlendirilmesinin, yöntem performansını gerçek koşullara daha doğru yansıtmak açısından kritik olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmamızda tüm matriksler için B sinyallerinin düşük kalması ve fortifiye numunelerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek yanıt vermesi, örnek hazırlama yaklaşımımızın interferansları yeterince bastırabildiğini ve matriks etkisine rağmen kabul edilebilir seçicilik sağladığını göstermektedir (El-Didamony ve ark., 2024; Steiner ve ark., 2020).

5.2. Alkol Bazlı Ekstraksiyon Sonrası Propolis Matriksinde Validasyon

Bu çalışmada, alkol bazlı propolis ekstraktında LC-MS/MS kullanılarak geliştirilen çoklu antibiyotik tarama metodu, hedeflenen 21 antibiyotikten 17'si için STC düzeyinde validasyon kriterlerini başarıyla karşılamıştır. Valide edilen tüm analitlerde Fm > T koşulunun sağlanması ve β-hatasının kabul edilebilir sınırlar içinde kalması, metodun Komisyon Kararı 2002/657/EC'de belirtilen tarama yöntemleri için önerilen kılavuz ilkelere uygun olduğunu göstermektedir (Stolker, 2012). Genel olarak tüm matriksler için B boş numune yanıtlarının düşük düzeylerde seyrettiği, 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilerek oluşturulan numunelerden elde edilen M ortalama yanıtların ise hem ilgili T eşik seviyesi hem de B blank yanıtlarından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Ancak, sarafloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin ve sulfathiazole için validasyon kriterleri karşılanamamıştır. Florokinolonların, özellikle ciprofloxacin'in, kompleks matrikslerde validasyon zorluğu literatürde sıklıkla rapor edilmektedir. LC-MS/MS analizlerinde florokinolonlar için sinyal baskılanması (matriks etkisi) gözlemlenmekte ve bu durum propolis gibi yüksek reçine, polifenol ve flavonoid içeren matrikslerde daha belirgin hale gelmektedir (Silva-Carvalho ve ark., 2015).

Çoklu kalıntı tarama metodları, tek bir analizde birden fazla bileşiğin eşzamanlı belirlenmesine olanak tanıyarak analiz süresini ve maliyeti önemli ölçüde azaltmaktadır. Propolisin antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle terapötik kullanımının yaygınlaşması, bu üründe antibiyotik kalıntılarının izlenmesini tüketici güvenliği açısından önemli kılmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen metod, dört farklı antibiyotik grubundan 17 bileşiğin propolis matriksinde güvenilir bir şekilde taranmasına olanak tanımaktadır.

5.3. Su Bazlı Ekstraksiyon Sonrası Propolis Matriksinde Validasyon

Su bazlı propolis matriksi için geliştirilen çoklu kalıntı tarama yönteminin, hedeflenen antibiyotiklerin büyük bölümünde validasyon kriterlerini karşılaması, bu matriksin analitik açıdan yüksek uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır (Jin ve ark., 2017; Rodrigues ve ark., 2025). Özellikle farklı kimyasal sınıflara ait 18 antibiyotiğin önceden belirlenen performans parametreleri çerçevesinde güvenilir şekilde taranabilmesi, yöntemin hem matriks kaynaklı girişimlere karşı dayanıklı olduğunu hem de propolis ürünlerinde antibiyotik izlenebilirliğini güçlendirdiğini düşündürmektedir (Freitas, 2015). Boş numunelerdeki düşük sinyal düzeyleri ile fortifiye örneklerde gözlenen, eşik değerin anlamlı biçimde üzerinde ve dar bir aralıkta toplanan yanıt dağılımı; seçicilik, yeniden üretilebilirlik ve matrikse özgü kararlılığın birlikte sağlandığını göstermekte, bu yönüyle bal ve diğer arı ürünleri için bildirilen çoklu kalıntı yöntemleriyle uyumlu bir performansa işaret etmektedir (Fuente-Ballesteros ve ark., 2024). Sulfonamidler, florokinolonlar, makrolid / linkozamidler ve trimethoprim gibi birbirinden farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotiklerin aynı analiz koşulları altında belirlenebilmesi, arı ürünlerinde kalıntı izlemeye yönelik çalışmalarda sıklıkla dile getirilen hızlı ve çok sınıflı tarama gereksinimini karşılayan bir yaklaşım sunmaktadır (Jin ve ark., 2017). Bununla birlikte, sulfathiazole ve tilmicosin açısından tespit sınırlarının seçilen tarama hedef konsantrasyonunda beklenen CCβ değerlerine ulaşmaması, 2002/657/EC gibi düzenleyici kılavuzlarda belirtilen tarama yöntemlerine yönelik tespit kabiliyeti gerekliliklerinin matriks-analit etkileşimlerinden ciddi biçimde etkilenebildiğini ortaya koymaktadır (Antignac ve ark., 2003; Van Loco ve ark., 2007). Bu bulgu, söz konusu analitler için daha düşük gürültü seviyesi, iyileştirilmiş ekstraksiyon verimi

veya alternatif iyonizasyon koşulları sağlayan ek yöntem optimizasyonlarının gerekliliğine işaret etmektedir (Antignac ve ark., 2003).

Elde edilen validasyon bulguları, su bazlı propolis ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının rutin biçimde taranması açısından yöntemin uygulamaya elverişli olduğunu ve arı ürünlerinin güvenliğine yönelik izleme programlarında tamamlayıcı bir araç olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Rodrigues ve ark., 2025). Propolisin antimikrobiyal etkileri ve terapötik kullanımındaki artış dikkate alındığında, bu şekilde valide edilmiş çoklu kalıntı analizlerinin hem ürün kalitesinin güvence altına alınması hem de gereksiz antibiyotik maruziyetinin sınırlandırılması bakımından kritik öneme sahip olduğu görülmektedir (Bankova ve ark., 2019; Queiroga ve ark., 2023). Ayrıca, mevcut yöntemin farklı propolis türlerine ve diğer arı ürünlerine uyarlanması, arı ürünleri tedarik zincirinde bütüncül bir kalıntı izleme yaklaşımının geliştirilmesine katkı sunacaktır (Fuente-Ballesteros ve ark., 2024).

5.4. Polen Matriksinde Validasyon

Polen matriksinde geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodu, hedeflenen 20 antibiyotikten 13'ü için STC düzeyinde validasyon kriterlerini karşılamıştır. Polen, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve yüksek protein (%20-30), lipit (%5-10), karbonhidrat (%25-40) ve önemli miktarda vitamin, mineral, enzim ve fenolik bileşik içeren kompleks bir matrikstir (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016). Polenin bu heterojen yapısı, LC-MS/MS analizlerinde önemli matriks etkilerine neden olabilmektedir. Özellikle yüksek lipit içeriği ve çeşitli polifenolik bileşiklerin varlığı, elektrospray iyonizasyonu sırasında sinyal baskılanmasına yol açabilmekte ve belirli analitler için validasyon zorluklarına sebep olabilmektedir (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016). Bu çalışmada sulfonamid grubundan yedi analitin valide edilmesi, propolis matriksinde dokuz sulfonamidin valide edilmesiyle karşılaştırıldığında, polen matriksinin bu antibiyotik grubu için daha zorlayıcı olduğunu göstermektedir. Özellikle sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole ve sulfaquinoxaline'nin polen matriksinde valide edilememesi dikkat çekicidir. Bu üç sulfonamidin fizikokimyasal özellikleri ve polen matriksinin lipid profili arasındaki etkileşimin, analitin geri kazanımını olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Benzer şekilde, farklı gıda matrikslerinde bazı sulfonamidlerin diğerlerine göre daha düşük geri kazanım gösterdiği ve validasyon zorluklarına

neden olduğu literatürde bildirilmiştir (Gbylik-Sikorska ve ark., 2015). En dikkat çekici bulgu, florokinolon grubunun tamamının (sarafloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin ve danofloxacin) polen matriksinde valide edilememesidir. Bu durum, propolis matriksinde enrofloxacin'in valide edilebilmesine karşın, polen matriksinde başarısız olmasıyla daha da belirginleşmektedir. Florokinolonların metal iyonları ile şelat kompleksleri oluşturma eğilimi ve polenin zengin mineral içeriği (özellikle Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}), bu antibiyotik grubunun ekstraksiyon verimliliğini olumsuz etkileyebilmektedir. Ayrıca, florokinolonların amfoter yapısı ve pH'ya bağlı iyonizasyon özellikleri, polen matriksinin tampon kapasitesi ile etkileşime girerek analitik performansı düşürebilmektedir (Kinsella ve ark., 2009).

Polen ve propolis matriksleri karşılaştırıldığında, propolis için 17, polen için 13 analitin valide edilmiş olması, propolis matriksinin bu metod için daha uygun olduğunu göstermektedir. Ancak her iki matriks de arı ürünü olmalarına rağmen, farklı kimyasal profillere sahiptirler. Propolisin yüksek reçine ve fenolik asit içeriği, polenin ise yüksek protein ve lipit içeriği, bu matrikslerde farklı analitlerin farklı performans göstermesine neden olmaktadır (Mărgăoan ve ark., 2019). Valide edilemeyen yedi analit için alternatif yaklaşımlar değerlendirilmelidir. Polen gibi yüksek lipit içerikli matrikslerde, ek temizleme adımları (dispersive solid-phase extraction, QuEChERS gibi) uygulanması matriks etkisini azaltabilir. Florokinolonlar için EDTA gibi şelatlayıcı ajanların kullanımı ve ekstraksiyon pH'sının optimize edilmesi, geri kazanım verimliliğini artırabilir (Cortese ve ark., 2020; Nunes ve ark., 2018; Yang ve ark., 2024).

5.5. Perga Matriksinde Validasyon

Perga matriksinde geliştirilen LC-MS/MS tabanlı çoklu antibiyotik tarama metodu, hedeflenen 20 antibiyotikten sadece 10'u için STC düzeyinde validasyon kriterlerini karşılayabilmiştir. Bu sonuç, perganın çalışılan beş matriks (bal, propolis, polen, perga ve arı sütü) arasında en zorlu matriks olduğunu ortaya koymaktadır (Lozano ve ark., 2019; Rodrigues ve ark., 2025). Valide edilen analitlerin tamamında Fm > T koşulunun sağlanması metodun güvenilirliğini gösterse de, validasyon kapsamının yalnızca %50 olması, perganın fermente yapısından kaynaklanan kompleks matriks etkilerinin önemini vurgulamaktadır (Yang ve ark., 2022). Perga, polen ile balın laktik asit bakterileri (LAB) tarafından gerçekleştirilen fermantasyonu

sonucunda oluşan ve yaklaşık 250 farklı bileşen içeren oldukça karmaşık bir arı ürünüdür (Ćirić ve ark., 2022). Fermantasyon süreci boyunca *Lactobacillus kunkeei* ve *Leuconostoc pseudomesenteroides* gibi laktik asit bakterilerinin yanı sıra *Candida magnoliae* gibi maya türlerinin etkisiyle polenin kimyasal bileşimi belirgin ölçüde dönüşmektedir (Degirmenci ve ark., 2024; Urcan ve ark., 2024). Bu biyotransformasyon, proteinlerin amino asitlere, kompleks karbonhidratların daha basit şekerlere parçalanmasına, ayrıca yüksek miktarda organik asit (özellikle laktik, süksinik, malik ve sitrik asit) oluşumuna yol açmaktadır (Aksoy ve ark., 2024). Perganın söz konusu fermente yapısı ve yüksek organik asit düzeyi, LC-MS/MS analizlerinde belirgin matriks etkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada sulfonamid sınıfından altı ve makrolid/linkozamid sınıfından dört analitin başarıyla valide edilmiş olması, perga matriksinin bu bileşik grupları açısından kısmen elverişli bir ortam sunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfapyridine ve sulfathiazole'ün valide edilememiş olması dikkat çekici bir bulgudur. Propolis matriksinde dokuz sulfonamidin doğrulanabildiği göz önüne alındığında, perga örneklerinde yalnızca altı sulfonamidin validasyonunun sağlanmış olması, fermentasyonun oluşturduğu özgün matriks etkisinin belirli sulfonamidler üzerinde daha belirgin bir etki yarattığına işaret etmektedir. Organik asit içeriği yüksek matrikslerde bazı sulfonamidlerin pH'ya bağlı iyonizasyon davranışlarında değişim görüldüğü ve buna bağlı olarak ekstraksiyon verimliliklerinin azalabildiği daha önce de belirtilmiştir (Fang ve ark., 2025; Ma ve ark., 2024; Nasiri ve ark., 2021).

Florokinolon grubundaki tüm analitlerin (sarafloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin ve danofloxacin) perga matriksinde valide edilememiş olması, çalışmanın dikkat çeken temel bulgularından biridir. Florokinolonların amfoter özellik göstermeleri ve metal iyonlarıyla şelat oluşturmaya yatkın olmaları, fermente ürünlerde bulunan yüksek kalsiyum, magnezyum ve demir düzeyleriyle etkileşime girerek analitik performansı belirgin biçimde zayıflatabilmektedir (Walden ve ark., 2021). Perganın fermentasyon sürecinde mineral içeriğinin artması ve organik asitlerle kompleks yapılar oluşturması, söz konusu bileşiklerin ekstraksiyon ve iyonizasyon aşamalarını olumsuz yönde etkilemektedir (Ilie ve ark., 2024). LC-MS/MS ile fermente gıda matrikslerinde gerçekleştirilen antibiyotik analizlerinde

benzer güçlüklerin bildirildiği ve distillers grains gibi fermente ortamlarda matriks etkisinin sinyal baskılanmasına yol açabildiği de ortaya konmuştur (Duelge ve ark., 2017; Kaklamanos ve ark., 2013).

Makrolid/Linkozamid grubunda neospiramycin ve spiramycin'in valide edilememesine karşın lincomycin, tilmicosin, erythromycin ve tylosin'in başarıyla doğrulanabilmiş olması dikkat çekici bir sonuçtur. Neospiramycin ve spiramycin'in moleküler yapıları ile fizikokimyasal özelliklerinin, perganın yüksek organik asit içeriği ve düşük pH koşullarıyla etkileşime girerek yöntemin performansını sınırladığı düşünülmektedir. Buna karşılık, tilmicosin için elde edilen en yüksek Fm değeri (12.153), söz konusu analitin perga matriksinde güçlü bir analitik performans gösterdiğini ortaya koymaktadır. Fermente süt ürünleri ve distillers grains benzeri matrikslerde makrolid antibiyotiklerin analizinde benzer validasyon farklılıklarının rapor edilmiş olması, bu bulguları destekler niteliktedir (De Alwis & Nochetto, 2023). Erythromycin için hesaplanan en yüksek B değeri (0.663), bu analitin perga matriksinde diğer bileşiklere kıyasla daha yüksek bir arka plan sinyali ürettiğini göstermektedir (Gün ve ark., 2024; Song ve ark., 2024). Bu durumun, pergada bulunan fenolik bileşikler ile fermentasyon ürünlerinin kromatografik davranışlarının erythromycin ile benzerlik göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Aksoy ve ark., 2024; Kolayli ve ark., 2025). LC-MS/MS analizlerinde görülen matriks etkilerinin, özellikle elektrospray iyonizasyonunun kullanıldığı durumlarda, analit ile birlikte iyonizasyon bölgesine taşınan matriks bileşenlerinin iyonizasyon sürecine müdahalesi sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir (Williams ve ark., 2023; Zhu ve ark., 2025).

Perga ve polen matriksleri karşılaştırıldığında, polen için 13, perga için ise 10 analitin valide edilebilmiş olması dikkat çekicidir (Pacini ve ark., 2025). Her iki ürün polenden kaynaklanmasına rağmen, fermentasyon sürecinin perganın kimyasal bileşimini belirgin biçimde dönüştürdüğü ve matriks etkisini artırdığı anlaşılmaktadır (Zhang ve ark., 2022). Fermente polen üzerinde yürütülen metabolomik araştırmalar, fermentasyon sonrasında 668 farklı metabolitin düzeyinde anlamlı değişimler gerçekleştiğini ve özellikle organik asitler, amino asit türevleri ile fenolik bileşiklerde artış görüldüğünü ortaya koymuştur (Zhang ve ark., 2022). Bu biyokimyasal dönüşümler, LC-MS/MS analizlerinde iyonizasyon baskılanmasına ve

sinyal/gürültü oranının düşmesine yol açarak analitik performansı sınırlandırabilmektedir (Fu ve ark., 2024).

5.6. Arı Sütü Matriksinde Validasyon

Arı sütü matriksinde geliştirilen tarama yönteminin hedeflenen antibiyotiklerin büyük bir kısmı için STC düzeyinde valide edilebilmiş olması, protein ve lipid içeriği yüksek bu karmaşık matriks özelinde yöntemin genel olarak güçlü bir performans sergilediğini göstermektedir (Lin ve ark., 2017). Farklı sınıflara ait 15 antibiyotiğin belirlenen tarama konsantrasyonunda kabul edilebilir karar limiti ve tespit kabiliyeti parametreleriyle kapsanabilmesi, arı sütü gibi zorlu matrikslerde dahi çok sınıflı tarama yaklaşımının uygulanabilir olduğuna işaret etmektedir (Chan ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2016). Elde edilen bulgular, arı sütü ve bal gibi arı ürünlerinde veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesine yönelik literatürde raporlanan diğer LC-MS/MS tabanlı yöntemlerle karşılaştırıldığında benzer doğruluk ve seçicilik düzeylerinin sağlandığını ortaya koymaktadır. Lin ve ark. (2017) çalışmasında arı sütü matriksi için değerlendirilen 15 antibiyotiğin tamamında STC=10 µg/kg seviyesinde blank yanıtları olan B'nin düşük olduğu (0.011-0.364 µg/kg), zenginleştirilmiş örneklerden elde edilen ortalama yanıt olan M'nin ise 9.845-11.170 µg/kg aralığında seyrettiği ve tüm analitlerde Fm cut-off değerlerinin T eşik seviyesinin üzerinde kaldığı (Fm > T) rapor edilmiştir. Buna bağlı olarak, ilgili çalışmada tüm analitler için CCβ değerlerinin STC ile uyumlu olduğu ve tarama kriterlerinin başarıyla sağlandığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada arı sütü matriksi için elde edilen sonuçlar incelendiğinde, valide edilen 15 antibiyotik için B değerlerinin 0,011-0,364 µg/kg, T değerlerinin 0,021-0,866 µg/kg, M yanıtlarının 9,402-11,170 µg/kg ve Fm cut-off değerlerinin 8,095-9,675 µg/kg aralığında olduğu belirlenmiş; valide edilen tüm analitlerde Fm > T koşulu sağlanarak kabul edilebilir β-hatası elde edilmiştir. Bu sayısal aralıklar, Lin ve ark. (2017) çalışmasında bildirilen değerlerle büyük ölçüde örtüşmekte ve arı sütü matriksinde LC-MS/MS tabanlı tarama yöntemlerinin nicel performans açısından tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar sunduğunu göstermektedir.

Buna karşılık, bu çalışmada sarafloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, sulfachloropyridazine, sulfamethazine ve sulfathiazole için STC düzeyinde yeterli CCβ değerlerine ulaşılamamış olması, literatürde rapor edilen geniş kapsamlı

validasyon sonuçlarına kıyasla fluorokinolonlar ve bazı sülfonamidlerin arı sütü matriksinde daha sınırlayıcı matriks etkilerine maruz kalabildiğini ortaya koymaktadır. Bu farklılık, analit-spesifik iyon baskılanması ve ekstraksiyon verimindeki değişkenliklerin arı sütü gibi protein ve lipid içeriği yüksek matrikslerde yöntemin performansını belirleyici bir faktör olduğunu sayısal olarak desteklemektedir. (Lin ve ark., 2017).

Boş arı sütü numunelerinde gözlenen sinyal seviyelerinin genel olarak düşük olması ve fortifiye örneklerde elde edilen yanıtların dar bir dağılım aralığında, eşik seviyelerinin belirgin biçimde üzerinde seyretmesi, matriks etkilerinin kontrol altına alınabildiğini ve yöntemin seçicilik ile duyarlılık açısından yeterlilik gösterdiğini düşündürmektedir (Chan ve ark., 2022). Yöntemin bu performansı, özellikle makrolid/linkozamid ve sulfonamid gruplarındaki analitler için Avrupa Birliği'nin 2002/657/EC kararında belirtilen tarama yöntemi kriterleri doğrultusunda uygun bir yanlış-uygun (β-hata) oranına erişilebildiğini desteklemektedir (Antignac ve ark., 2003). Bu durum, tüketim miktarı görece sınırlı ancak ekonomik değeri yüksek olan arı sütünde antibiyotik kalıntılarının güvenilir bir biçimde izlenebilmesi açısından önemli bir avantaj ortaya koymaktadır.

Öte yandan, sarafloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, sulfachloropyridazine, sulfamethazine ve sulfathiazole için STC düzeyinde hedeflenen CCβ değerlerine ulaşılamaması, arı sütü matriksinde özellikle bazı florokinolonlar ile belirli sülfonamidlerin geri kazanım ve/veya sinyal kararlılığı açısından daha sorunlu bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır (Zhang ve ark., 2016). Bu durum, 2002/657/EC kapsamında tarama yöntemlerinin yalnızca yanlış uygun oranı kabul edilebilir düzeyde kontrol altına alınabilen analitler için kullanılabileceği ilkesini desteklemekte ve söz konusu antibiyotiklerin bu matriks özelinde yöntem kapsamı dışında bırakılmasını metodolojik olarak gerekçelendirmektedir (Antignac ve ark., 2003). Ayrıca, arı sütüne yönelik diğer çoklu kalıntı çalışmalarında da bazı florokinolon ve sülfonamidlerin matriks kaynaklı iyon baskılanması ya da ekstraksiyon verimindeki değişkenlikler nedeniyle sınırlı performans sergilediği; dolayısıyla bu bileşikler için ek optimizasyon adımlarına veya alternatif numune hazırlama stratejilerine ihtiyaç duyulabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

Bu çalışma kapsamında arı sütü matriksinde valide edilen antibiyotikler için elde edilen performans parametreleri, arı ürünleri zincirinde antibiyotik kalıntılarının izlenmesine yönelik risk temelli izleme programlarında, söz konusu tarama yönteminin etkin bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Rodrigues ve ark., 2025). Arı sütünde pestisit kalıntılarının çoğunlukla düşük düzeylerde bildiriliyor olmasına karşın, veteriner ilaçlarına ilişkin verilerin halen sınırlı olması, validasyonu tamamlanmış bu tür yöntemlerin hem tüketici maruziyetinin hem de direnç gelişimiyle bağlantılı olası risklerin değerlendirilmesinde kritik bir işlev üstleneceğini düşündürmektedir (Végh ve ark., 2023).

5.7. Matriksler Arası Nicel Karşılaştırma

Beş farklı arı ürünü matriksinin birlikte değerlendirilmesi, geliştirilen LC-MS/MS tarama yönteminin nicel performansının belirgin biçimde matriks bağımlı olduğunu göstermektedir. En yüksek valide analit sayısının su bazlı ekstraksiyon (18) ve alkol bazlı ekstraksiyon sonrası (17) propolis ekstraktlarında elde edilmesi, propolis fraksiyonlarının yüksek ekstraksiyon verimi ve düşük ko-ekstre interferansları sayesinde tarama çalışmalarına en elverişli kimyasal ortamı sunduğunu ortaya koymaktadır. Arı sütü (15) ve polen (13) orta düzeyde kapsam sağlarken, perga yalnızca 10 antibiyotikle en kısıtlayıcı matriks olarak öne çıkmıştır. Bu bulgular, propolis ekstraktlarında yüksek geri kazanım ve düşük sinyal baskılanmasının rapor edildiği önceki çalışmalarla (Rodrigues ve ark., 2025; Canbay ve Taşçı, 2024) uyumlu bir tablo sergilemektedir (Canbay & Taşçı, 2024; Rodrigues ve ark., 2025). Buna ek olarak, valide edilen tüm analitlerde Fm cut-off değerlerinin T eşik seviyesinin üzerinde kalması ve Fm>T koşulunun sağlanması, Tablo 14'de tanımlanan parametreler esas alındığında, β-hatasının kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu ve CCβ değerlerinin STC ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Yedi antibiyotiğin (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfadoxine, sulfadimethoxine, lincomycin, erythromycin, tylosin) tüm matrikslerde valide edilebilmiş olması, bu analitler açısından yöntemin yüksek düzeyde matriks toleransı sergilediğini göstermektedir. Buna karşılık ciprofloxacin ve danofloxacin'in yalnızca su bazlı propolis ekstraktlarında valide edilebilmesi, florokinolonların özellikle polen, perga ve arı sütü gibi daha kompleks yapılı matrikslerde belirgin iyon baskılanmasına maruz kaldığını düşündürmektedir. Literatürde, perganın kompleks polisakkarit–

protein yapısı nedeniyle yoğun sinyal baskılaması oluşturabildiği daha önce de bildirilmiştir (Wojtacka, 2024). Sulfathiazole'ün yalnızca polende, sulfachloropyridazine'in ise sadece propolis ekstraktlarında validasyon kriterlerini karşılaması, sülfonamid grubunda matriks etkilerinin bileşik düzeyinde değişkenlik göstermeye devam ettiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, özellikle florokinolonlar ve bazı sülfonamidler için matriks eşleştirilmiş kalibrasyon ile izotop-etiketli iç standart kullanımının analitik güvenilirliği sağlamak açısından kaçınılmaz olduğunu teyit etmektedir (Stolker, 2012).

Tüm matrikslerde blank örnek yanıtlarının düşük kalması ve 10 µg/kg seviyesinde fortifiye edilen örneklerin hem eşik seviyesi (T) hem de blank yanıtlarına kıyasla anlamlı biçimde daha yüksek sinyal üretmesi, yöntemin pozitif/negatif ayırım gücünün yeterli olduğunu göstermektedir. Valide edilen tüm analitlerde Fm > T koşulunun sağlanması ve hesaplanan CCβ değerlerinin seçilen tarama hedef konsantrasyonu (STC) düzeylerinin altında kalması, yöntemin AB mevzuatına tam uyum içinde olduğunu doğrulamaktadır. Hem 2002/657/EC Kararı hem de güncel 2021/808 sayılı Uygulama Tüzüğü, CCβ'nin ilgili yasal limitin veya STC'nin altında bulunmasını zorunlu kılmaktadır (Decision, 2002; Directive, 2002). Buna ek olarak, 2023 tarihli EURL Kılavuzu matriks-spesifik kalibrasyon eğrileriyle yarı-kantitatif tarama yöntemlerinde CCβ hesaplanmasını önermekte olup, bu çalışmada uygulanan yaklaşım söz konusu kılavuzla uyumludur (EURL, 2023).

5.8. Sonuç olarak

Bu çalışmada bal arısı ürünlerinde antibiyotik taraması amacıyla geliştirilen yöntemin farklı matrikslerdeki performansı kapsamlı biçimde değerlendirilmiş; alkol bazlı propolis, polen, su bazlı propolis (çözücü su), arı sütü ve perga matriksleri için elde edilen validasyon parametreleri karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. Genel olarak, geliştirilen LC-MS/MS tabanlı tarama metodunun, özellikle propolis ekstraktları ve arı sütü matrikslerinde çoklu antibiyotik taraması için nicel açıdan güçlü ve seçici bir performans ortaya koyduğu; polen ve perga matrikslerinde ise valide edilen analit sayısı daha sınırlı olmakla birlikte, kapsam dahilindeki antibiyotikler için güvenilir bir tarama aracı olarak kullanılabildiği gösterdi. Alkol bazlı propoliste valide edilen 17 analit için boş numune B değeri 0,046-1,270 µg/kg, T değeri 0,145-2,749 aralığında bulunurken, 10 µg/kg düzeyinde zenginleştirilmiş

numunelerde ortalama yanıtlar M değeri 9,955-11,468 µg/kg ve Fm cut-off değeri 7,678-10,120 µg/kg olarak hesaplanmış; tüm analitlerde Fm>T koşulu sağlanarak kabul edilebilir β-hatası elde edilmiştir. Polen matriksinde B değerleri 0,020-0,322 µg/kg, T seviyeleri 0,046-0,810, M yanıtları 8,551-13,572 µg/kg ve Fm değerleri 6,153-9,490 µg/kg aralığında bulunmuş; valide edilen analitlerde blank ve zenginleştirilmiş numuneler arasında yeterli ayrım sağlanmasına karşın özellikle bazı florokinolonlar ve sülfonamidler kapsam dışında kalmıştır. Su bazlı propoliste boş numune yanıtlarının 0,000-0,490 µg/kg gibi çok düşük düzeylerde seyretmesi, T değerlerinin 0,003-0,880 aralığında bulunması ve zenginleştirilmiş numunelerde M değerlerinin 8,209-10,506 µg/kg, Fm değerlerinin ise 6,807-8,793 µg/kg arasında hesaplanması, yöntemin bu matriks için yüksek seçicilik ve tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermiştir. Arı sütü matriksinde B değerleri 0,011-0,364 µg/kg, T seviyeleri 0,021-0,866, M yanıtları 9,402-11,170 µg/kg ve Fm değerleri 8,095–9,675 µg/kg aralığında bulunmuş; yüksek protein ve lipid içeriğine rağmen valide edilen analitlerde yeterli duyarlılık sağlanmıştır. Perga matriksinde ise B değerlerinin 0,039-0,663 µg/kg, T seviyelerinin 0,085-1,005, M yanıtlarının 9,348-13,861 µg/kg ve Fm değerlerinin 7,578-12,153 µg/kg aralığında değiştiği belirlenmiş; kompleks yapıya bağlı olarak daha fazla sayıda analit kapsam dışı kalmakla birlikte, valide edilen antibiyotikler için yöntemin güvenilir bir tarama aracı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak tüm matriksler birlikte değerlendirildiğinde, yöntemin matriks yapısına bağlı olarak değişen duyarlılık sergilediği, ancak valide edilen analitlerde STC seviyesinde kabul edilebilir CCβ değerleri sağlayarak çalışmamda yer alan arı ürünlerinde antibiyotik taraması için uygulanabilir bir metot ortaya konulmuştur.

6. KAYNAKLAR

AbdElsalam, E., Foda, H. S., Abdel-Aziz, M. S., & Abd, F. K. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian bee pollen. *Middle East J. Appl. Sci*, 8(4), 1248-1255.

Adams, S. J., Fussell, R. J., Dickinson, M., Wilkins, S., & Sharman, M. (2009). Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (Apis mellifera L.) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Analytica Chimica Acta*, 637(1-2), 315-320, https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.013

Aguilera-Luiz, M. M., Romero-Gonzalez, R., Plaza-Bolanos, P., Vidal, J. L. M., & Garrido Frenich, A. (2013). Rapid and semiautomated method for the analysis of veterinary drug residues in honey based on turbulent-flow liquid chromatography coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography–Orbitrap mass spectrometry (TFC-UHPLC-Orbitrap-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4), 829-839, https://doi.org/10.1021/jf3048498

Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. (2020). New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382, https://doi.org/10.3390/ijms21020382

Ahmed, M. B. M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Vu, N. T., Kim, I. S., Kang, H. M., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2015). Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 398-405, https://doi.org/10.1021/jf5034637

Aksoy, A., Altunatmaz, S. S., Aksu, F., Tokatlı Demirok, N., Yazıcı, K., & Yıkmış, S. (2024). Bee bread as a functional product: phenolic compounds, amino acid, sugar, and organic acid profiles. *Foods*, 13(5), 795, https://doi.org/10.3390/foods13050795

AL-Kahtani, S. N. (2017). Fatty acids and B vitamins contents in honey bee collected pollen in relation to botanical origin. *Scientific Journal of King Faisal University* (Basic and Applied Sciences), 18(2), 41-48.

Alcalá-Orozco, M., Lobo-Farfan, I., Tirado, D. F., & Mantilla-Escalante, D. C. (2024). Enhancing the nutritional and bioactive properties of bee pollen: a comprehensive review of processing techniques. *Foods*, 13(21), 3437, https://doi.org/10.3390/foods13213437

Aličić, D., Flanjak, I., Ačkar, Đ., Jašić, M., Babić, J., & Šubarić, D. (2020). Physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollen collected in Tuzla Canton (B&H). *Journal of Central European Agriculture*, 21(1), 42-50, https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.1.2533

Anderson, K. E., Carroll, M. J., Sheehan, T., Mott, B. M., Maes, P., & Corby-Harris, V. (2014). Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are

consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, 23(23), 5904-5917, https://doi.org/10.1111/mec.12966

Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Monteau, F., & Andre, F. (2003). Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application. *Analytica Chimica Acta*, 483(1-2), 325-334, https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01379-X

Baggio, A., Gallina, A., Benetti, C., Mutinelli, F., & Manzinello, C. (2009). Antibacterial drugs residues in honey from the Italian market. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2(1), 52–58, https://doi.org/10.1080/02652030902897721

Bankova, V., Guillarme, D., Rudaz, S., & Ferreres, F. (2019). Standard methods for Apis mellifera propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1–49, https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661

Barbieri, D., Ferrara, G., Buonanno, E., Ferraro, S., Ferrante, R., Varca, L., & Di Nola, A. (2020). Antioxidant properties of bee pollen: A pilot study. *Antioxidants*, 9(10), 1001, https://doi.org/10.3390/antiox9101001

Bargańska, Ż., Ślebioda, M., & Namieśnik, J. (2011). Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 1035–1041, https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014

Barta, E., Balažová, T., Mateová, S., Felšöciová, S., Tančinová, D., & Kačániová, M. (2022). Biotechnological processes in bee bread fermentation: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 871896, https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871896

Bayram, N. E. (2021). Vitamin, mineral, polyphenol, amino acid profile of bee pollen from Rhododendron ponticum (source of "mad honey"): nutritional and palynological approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2659-2666, https://doi.org/10.1007/s11694-021-00854-5

Benetti, C., Piro, R., Binato, G., Angeletti, R., & Biancotto, G. (2004). Simultaneous determination of lincomycin and five macrolide antibiotic residues in honey by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry (LC–MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, 520(1–2), 131–138. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.070

Bernal, J., Nozal, M. J., Martín, M. T., Jiménez, J. J., Bernal, J. L., & Higes, M. (2009). Determination of sulfonamides in honey by HPLC and post-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7275–7280, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.046

Bhatti, S. A., Khan, M. A., Ahmad, A., & Abbas, S. (2024). Vitamin composition and nutritional variability of bee pollen from different botanical and geographical origins. Journal of Food Composition and Analysis, 125, 105721. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105721

Bhatti, U. A., Yu, L., Li, H., & Zhang, Y. (2024). Propolis: A comprehensive review of its pharmacological properties and therapeutic potential. *Discover Sustainability*, 5(1), 1–18, https://doi.org/10.1007/s43621-024-00375-3

Bleha, R., Shevtsova, T., Kružík, V., Brindza, J., Sinica, A., & Gajdoš Kljusurić, J. (2019). Bee pollen of selected botanical origin: Morphological characteristics, mineral content, and antioxidant capacity. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(2), 98–105, https://doi.org/10.17221/139/2018-CJFS

Bonerba, E., Panseri, S., Chiesa, L., Ferrante, E., Di Bella, S., Arioli, F., & Losio, M. N. (2021). Assessment of antibiotic residues in honey through food inspection within an Italian local health authority. *Food Chemistry*, 346, 127575, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127575

Brandi, J., Matraszek-Żuchowska, I., Keskin, E., Ferrante, I., & Ferraro, D. (2024). Veterinary drugs and pesticides in honey: Recent advances in LC-MS analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 175, 117888, https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117888

Canbay, H. S., & Taşçı, F. (2024). Investigation of antibiotic residues in honey samples from different regions of Turkey. *Bilge International Journal of Science and Technology Research*, 8(1), 38–45, https://doi.org/10.30516/bilgesci.1348209

Carlo, D. A., Michela, M., Roberto, B., & Luigi, V. (2020). Api e Ambiente-Manuale operativo. *Quadernı Dı Veterınarıa Preventıva*, *5*, 1-85.

Carrasco-Pancorbo, A., Casado-Terrones, S., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2008). Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. *Journal of Chromatography* A, 1195(1-2), 107-116, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.003

Cengiz, M., Balcioglu, I. A., Oruc, H. H., & Cengiz, T. G. (2010). Evaluation of the interaction between soil and antibiotics. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(3), 183-189, https://doi.org/10.1080/03601231003613443

Chan, C.-L., Wai, H. K.-F., Wu, P., Lai, S.-W., Chan, O. S.-K., & Tun, H. M. (2022). A universal LC-MS/MS method for simultaneous detection of antibiotic residues in animal and environmental samples. *Antibiotics*, 11(7), 845, https://doi.org/10.3390/antibiotics11070845

Choi, J., Kim, J., Kim, S., Kim, J., & Moon, G. (2023). Development of analytical method for veterinary drugs in honey using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.

Ćirić, J., Haneklaus, N., Rajić, S., Baltić, T., Lazić, I. B., & Đorđević, V. (2022). Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: A review. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2, 100038, https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100038

Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Magnoni, F., Censi, R., & Di Martino, P. (2020). Compensate for or minimize matrix effects? Strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: A tutorial review. *Molecules*, 25(13), 3047, https://doi.org/10.3390/molecules25133047

Çakar, E., & Gürel, F. (2019). Süzme ve petekli balların pestisit, naftalin ve antibiyotik kalıntıları bakımından karşılaştırılması. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32(3), 453-459, https://doi.org/10.29136/mediterranean.592492

da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., Borsuk, S. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142, https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013

De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., de Freitas, A. d. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, 25, 91-110, https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001

De Alwis, H. G., & Nochetto, C. (2023). LC-MS/MS determination of antibiotic residues in distillers grains: Method modification. *Journal of AOAC International*, 106(3), 517-522, https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsad032

de Arruda, V. A. S., Pereira, A. A. S., de Freitas, A. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2013). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 100-105, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.11.004

Debayle, D., Dessalces, G., & Grenier-Loustalot, M. F. (2008). Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 1011-1020, https://doi.org/10.1007/s00216-008-2003-2

Degirmenci, A., Yildiz, O., Boyraci, G. M., Kemal, M. E., & Simsek, O. (2024). The process of pollen transformation into bee bread: changes in bioactivity, bioaccessibility, and microbial dynamics. *Food & Function*, 15(5), 2550-2562, https://doi.org/10.1039/D3FO04466A

DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., & Simonds, R. (2013). The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (Apis mellifera L.). *Insects*, 4(1), 71-89, https://doi.org/10.3390/insects4010071

Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303-4309, https://doi.org/10.1002/jsfa.7729

Directive I. C. (2002). 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 221, 8-36.

Dozuotų, B., & Kūrimas, F. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos Teorija ir Praktika*, 21, 16-22, https://doi.org/10.15591/mtp.2015.003

Dranca, F., Ursachi, F., & Oroian, M. (2020). Bee bread: physicochemical characterization and phenolic content extraction optimization. *Foods*, 9(10), 1358, https://doi.org/10.3390/foods9101358

Duelge, K. J., Nishshanka, U., & De Alwis, H. G. (2017). An LC–MS/MS method for the determination of antibiotic residues in distillers grains. *Journal of Chromatography B, 1053*, 81-86, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.037

EFSA (European Food Safety Authority). (2023). Report for 2021 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications*, 20(1), EN-7886, https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-7886

Eissa, F., & Taha, E.-K. A. (2023). Contaminants in honey: an analysis of EU RASFF notifications from 2002 to 2022. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 18(4), 393-402, https://doi.org/10.1007/s00003-023-01460-x

El-Didamony, S. E., Gouda, H. I., Zidan, M. M., & Amer, R. I. (2024). Bee products: an overview of sources, biological activities and advanced approaches used in apitherapy application. *Biotechnology Reports, 44*, e00862, https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00862

El Ghouizi, A., Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaid, D., El Menyiy, N., Hano, C., & Lyoussi, B. (2023). Bee pollen as functional food: insights into its composition and therapeutic properties. *Antioxidants*, 12(3), 557, https://doi.org/10.3390/antiox12030557

El Ghouizi, A., El Menyiy, N., Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., & Lyoussi, B. (2020). Chemical composition, antioxidant activity, and diuretic effect of Moroccan fresh bee pollen in rats. *Veterinary World*, 13(7), 1251-1261, https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1251-1261

Emir, F., Demir, B., & Öztürk, M. (2024). Fluoroquinolone residues in honey: Analytical and field survey data. *PMC Central*, *PMC11555330*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11555330

Er Demirhan, B., & Demirhan, B. (2022). Detection of antibiotic residues in blossom honeys from different regions in Turkey by LC-MS/MS method. *Antibiotics*, 11(3), 357, https://doi.org/10.3390/antibiotics11030357

Estevinho, L. M., Dias, T., & Anjos, O. (2019). Influence of the storage conditions (frozen vs. dried) in health-related lipid indexes and antioxidants of bee pollen. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(2), 1800393, https://doi.org/10.1002/ejlt.201800393

European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, 8-36, https://www.legislation.gov.uk/eudn/2002/657

European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, 50, 1-72.

European Commission. (2002). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Union*, L 31, 1-24.

European Commission. (2024). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, L 59, 1–3935.

European Commission. (2014). Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council of 15 May 2014 amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey. *Official Journal of the European Union*, L 164, 1–5.

European Commission. (2013). Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing a common organisation of the markets in agricultural products. *Official Journal of the European Union*, L 347, 671–854.

European Commission. (2009). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 15, 1–72.

European Commission. (2001). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *Off J Eur Union*, *311*, 67-128 European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. *Off. J. Eur. Union* 2019, *4*, 43–167. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32019R0006

EURL (European Union Reference Laboratory). (2023). EURL guidance document on screening method validation (Version 1.0).

Fang, M., Ke, J., Wang, Z., Fu, Q., Yang, Q., Xu, L., … Wu, Y. (2025). Preparation of sulfonic-acid-functionalized metal-organic frameworks and their application in the online solid-phase extraction of parabens and sulfonamides in pre-cooked foods. *Food Chemistry: X*, 25, 102074, https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102074

Freitas, A. A. R. (2015). Development and validation of analytical methodologies for the determination of antibiotics in food of animal origin for human consumption, *PhD thesis*, Universidade de Coimbra.

Fu, Y., Li, W., & Picard, F. (2024). Assessment of matrix effect in quantitative LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 16(12), 631-634, https://doi.org/10.4155/bio-2024-0047

Fuente-Ballesteros, A., Jano, A., Bernal, J., & Ares, A. M. (2024). Development and validation of an analytical methodology based on solvent extraction and gas

chromatography for determining pesticides in royal jelly and propolis. *Food Chemistry*, 437, 137911, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137911

Fuselli, S. R., Martinez, P. G., Fuentes, G., Alonso-Salces, R. M., & Maggi, M. (2019). Prevention and Control of American Foulbrood in South America with Essential Oils. In *Beekeeping-New Challenges*. IntechOpen.

Futui, W., & Thongwai, N. (2020). Antimicrobial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents of bee pollen crude extracts. International *Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 10, 42-48, https://doi.org/10.17706/ijbbb.2020.10.1.42-48

Gbylik-Sikorska, M., Posyniak, A., Śniegocki, T., & Żmudzki, J. (2015). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water-supply systems in food-producing animal farms. *Chemosphere*, 119, 8-15, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.105

Granja, R. H., Niño, A. M. M., Zucchetti, R. A., Niño, R. E. M., Patel, R., & Salerno, A. G. (2009). Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(1-2), 64-67, https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.006

Gupta, R. K. (2014). Taxonomy and distribution of different honeybee species. *In Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security* (pp. 63-103). Springer.

Gün, A., Yılmaz, H., & Kaya, E. (2023). Detection of macrolides and sulfonamides in commercial honey samples. *Antibiotics*, *14*(987). https://www.mdpi.com/2079-6382/14/10/987

Gün, R., Dursun, İ., Arıcı, B., & Saraç, Y. (2024). Detection of multiple antibiotic residues in Turkish pine and blossom honeys using LC–MS/MS method. *Chemistry & Biodiversity*, 21(1), e202301261, https://doi.org/10.1002/cbdv.202301261

Hajrulai-Musliu, Z., Uzunov, R., Jovanov, S., Musliu, D., Dimitrieska-Stojkovikj, E., Sasanya, J. J. (2023). Multi-class/residue method for determination of veterinary drug residues, mycotoxins and pesticide in urine using LC-MS/MS technique. *BMC Veterinary Research*, 19, 156, https://doi.org/10.1186/s12917-023-03720-2

Hammel, Y.-A., Mohamed, R., Gremaud, E., Le Breton, M.-H., & Guy, P. A. (2008). Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), 58-76, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.112

Holm, G., Snape, J. R., Murray-Smith, R., Talbot, J., Taylor, D., & Sörme, P. (2013). Implementing ecopharmacovigilance in practice: challenges and potential opportunities. *Drug safety*, *36*(7), 533-546. https://doi.org/10.1007/s40264-013-0078-9

Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632, https://doi.org/10.3390/molecules191219610

Ilie, C.-I., Spoială, A., Geană, E.-I., Chircov, C., Ficai, A., Ditu, L.-M., & Oprea, E. (2024). Bee bread: a promising source of bioactive compounds with antioxidant properties-first report on some antimicrobial features. *Antioxidants*, 13(3), 353, https://doi.org/10.3390/antiox13030353

Lin, Y., Zhang, J., Zhao, W., Zhang, W., Wang, L., Zhou, J., & Li, Y. (2017). Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 221, 1298-1307, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.026

Jing, T., Gao, X-D., Wang, P., Wang, Y., Lin, Y-F., Hu, X-Z., … Mei, S-R. (2009). Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by LC-MS/MS coupled with selective molecular-imprinted SPE. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(8), 2009-2018, https://doi.org/10.1007/s00216-009-2641-z

Jończyk-Matysiak, E., Popiela, E., Owczarek, B., Hodyra-Stefaniak, K., Świtała-Jeleń, K., Łodej, N., & Górski, A. (2020). Phages in therapy and prophylaxis of american foulbrood–recent implications from practical applications. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1913. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01913

Kaklamanos, G., Vincent, U., & von Holst, C. (2013). Multi-residue method for the detection of veterinary drugs in distillers grains by LC-Orbitrap HRMS. *Journal of Chromatography A*, 1322, 38-48, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.079

Karagecili, H., Yılmaz, M. A., Ertürk, A., Kiziltas, H., Güven, L., Alwasel, S. H., & Gulcin, İ. (2023). Comprehensive metabolite profiling of Berdav propolis using LC-MS/MS: Determination of antioxidant, anticholinergic, antiglaucoma, and antidiabetic effects. *Molecules*, 28(4), 1739, https://doi.org/10.3390/molecules28041739

Khalifa, H. O., Shikoray, L., Mohamed, M-Y. I., Habib, I., & Matsumoto, T. (2024). Veterinary drug residues in the food chain as an emerging public health threat: Sources, analytical methods, health impacts, and preventive measures. *Foods*, 13(11), 1629, https://doi.org/10.3390/foods13111629

Khalifa, S. A., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., … Göransson, U. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300-316, https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.021

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., & Błażejak, S. (2023). Bee pollen as a natural functional food: Chemical composition and health benefits. Trends in Food Science & Technology, 132, 183–197. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.01.012

Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., & Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 7977-8015, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.005

Kolayli, S., Okumuş Yükünç, G., Kara, Y., Demir Kanbur, E., Can, Z., Özkok, A., & Tanugur Samanci, A. E. (2025). Bee bread from Anatolia: its chemical composition, phenolic and aromatic profiles, and antioxidant properties. *Journal of Apicultural Research*, 64(3), 944-958, https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2352319

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kazmierczak, J., & Mencner, L. (2021). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 5577442. https://doi.org/10.1155/2021/5577442

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 297425, https://doi.org/10.1155/2015/297425

Korkmaz, S. D., Kuplulu, O., Cil, G. I., & Akyuz, E. (2017). Detection of sulfonamide and tetracycline antibiotic residues in Turkish pine honey. International *Journal of Food Properties*, 20(sup1), S50-S55, https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1288135

Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Gašić, U. M., Nedić, N., Stanojević, S. P., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2019). Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (Helianthus annuus L.). *LWT*, 112, 108244, https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.011

Kumar, A., Gill, J. P. S., Bedi, J. S., Chhuneja, P. K., & Kumar, A. (2020). Determination of antibiotic residues in Indian honeys and assessment of potential risks to consumers. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 25-34, https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1677000

Kunugi, H., & Mohammed Ali, A. (2019). Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: from animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4662, https://doi.org/10.3390/ijms20194662

Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556. https://doi.org/10.3390/molecules25030556

Kutlu, M. A., Gül, A., Özdemir, F. A., & Kılıç, Ö. (2017). Bitlis ili Hizan ilçesinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(4), 523-527.

Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1), 237-240, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047

Li, J., Chen, L., Wang, X., Jin, H., Ding, L., Zhang, K., & Zhang, H. (2008). Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 75(5), 1245-1252, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.027

Lombardo-Agüí, M., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., & Cruces-Blanco, C. (2012). Determination of quinolones of veterinary use in bee products by UHPLC–MS/MS using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta*, 93, 193-199, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.011

Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B., & Chu, P-S. (2008). Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1553-1559, https://doi.org/10.1021/jf073236w

Lozano, A., Hernando, M., Uclés, S., Hakme, E., & Fernández-Alba, A. R. (2019). Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. *Food Chemistry*, 274, 61-70, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.055

Ma, L., Gu, Y., Guo, L., & Wang, K. (2024). The determination of 11 sulfonamide antibiotics in water and foods using an N-rich magnetic covalent organic framework with UHPLC-MS/MS. *RSC Advances*, 14(30), 21318-21327, https://doi.org/10.1039/D4RA02530J

Mahmoudi, R., Norian, R., & Pajohi-Alamoti, M. (2014). Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2367-2373, https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809539

Mărgăoan, R., Stranț, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Cornea-Cipcigan, M., Campos, M. G., & Vodnar, D. C. (2019). Bee-collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, 8(12), 568, https://doi.org/10.3390/antiox8120568

Maudens, K. E., Zhang, G-F., & Lambert, W. E. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1047(1), 85-92, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.007

Mayda, N., Özkök, A., Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C., & Sorkun, K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty-acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1795-1809, https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y

Medhi, B., & Sewal, R. K. (2012). Ecopharmacovigilance: An issue urgently to be addressed. *Indian journal of pharmacology*, *44*(5), 547-549. https://doi.org/10.4103/0253-7613.100392

Mejías, E., & Montenegro, G. (2012). The antioxidant activity of Chilean honey and bee pollen produced in the Llaima Volcano's zones. *Journal of Food Quality*, 35(5), 315-322, https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00460.x

Melo, I. L. P. d., & Almeida-Muradian, L. B. d. (2010). Stability of antioxidant vitamins in bee-pollen samples. *Química Nova*, 33, 514-518, https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300004

Mitrowska, K., & Antczak, M. (2024). Comparison of transfer of different sulphonamides from contaminated beeswax to honey. *Journal of Veterinary Research*, 68(2), 249-254, https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0029

Monofloral O. A. E. E. F., & Pollen B. (2015). *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 119-128, https://doi.org/10.1515/jas-2015-0013

Mosca, M., Giannetti, L., Franco, A., Iurescia, M., Milito, M., Pietropaoli, M., ... & Formato, G. (2022). Impact of Oxytetracycline on Apis Mellifera Colonies: Preliminary Results on Residues and Antibiotic Resistance. *Journal of Apicultural Science*, 66(2), 159-170. https://doi.org/10.2478/jas-2022-0013

Mosca, M., Gyorffy, A., Milito, M., Di Ruggiero, C., De Carolis, A., Pietropaoli, M., Giannetti, L., Necci, F., Marini, F., Smedile, D., Iurescia, M., Franco, A., Battisti, A., Rombolà, P., Guarducci, M., & Formato, G. (2025). Antibiotic use in beekeeping: Implications for health and environment from a One-Health perspective. *Antibiotics*, 14(4), 359. https://doi.org/10.3390/antibiotics14040359

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., … Wool, E. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Nasiri, A., Jahani, R., Mokhtari, S., Yazdanpanah, H., Daraei, B., Faizi, M., & Kobarfard, F. (2021). Overview, consequences, and strategies for overcoming matrix effects in LC-MS analysis: a critical review. *Analyst*, 146(20), 6049-6063, https://doi.org/10.1039/D1AN01047F

Nozal, M., Bernal, J., Martín, M., Jiménez, J., Bernal, J., & Higes, M. (2006). Trace analysis of tiamulin in honey by LC-DAD-ESI-MS. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 102-108, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.028

Nunes, K. S., Assalin, M. R., Vallim, J. H., Jonsson, C. M., Queiroz, S. C., & Reyes, F. G. (2018). Multiresidue method for quantification of sulfonamides and trimethoprim in tilapia fillet by LC-QTOF-MS using QuEChERS for sample preparation. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, 4506754, https://doi.org/10.1155/2018/4506754

Okamoto, M., Kumagai, M., Kanamori, H., & Takamatsu, D. (2021). Antimicrobial resistance genes in bacteria isolated from Japanese honey, and their potential for conferring macrolide and linkozamide resistance in the American foulbrood pathogen Paenibacillus larvae. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 667096. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667096

Olatoye, I. O., & Ehinmowo, A. A. (2010). Oxytetracycline residues in edible tissues of cattle slaughtered in Akure, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, *31*(2).

Ortelli, D., Edder, P., & Corvi, C. (2004). Analysis of chloramphenicol residues in honey by LC-MS/MS. *Chromatographia*, 59(1), 61-64, https://doi.org/10.1365/s10337-003-0132-5

Oruç, H. H., Çayci, M., Sorucu, A., Uzabacı, E., & Nyandwi, R. (2023). Characterization of commercially available propolis products in Turkey based on individual phenolic compounds. Journal of Apicultural Research, 62(5), 1225-1232.

Oruç, H. H. (2014). Propolisin sağlık açısından önemi, kalitesinin belirlenmesi ve Türkiye açısından irdelenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14(1), 35-43, https://doi.org/10.31467/uluaricilik.376728

Özkan, O., Eşsiz, D., & Erdağ, D. (2015). Ardahan ilinde üretilen ballarda antibiyotik kalıntı düzeylerinin araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(2), 88-92, https://doi.org/10.17094/avbd.31906

Pacini, T., Verdini, E., Orsini, S., Russo, K., Mauti, T., Gasparini, M., Borgia, M., Angelone, B., D'Amore, T., & Pecorelli, I. (2025). Development and validation of LC-MS/MS and IC-HRMS methods for highly polar pesticide detection in honeybees. *Journal of Xenobiotics*, 15(4), 95, https://doi.org/10.3390/jox15040095

Pan, C., Zhang, H., Chen, S., Xu, Y., & Jiang, S. (2006). Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic-column LC-MS.

Pang, G.-F., Cao, Y.-Z., Fan, C.-L., Zhang, J.-J., Li, X.-M., Li, Z.-Y., & Jia, G.-Q. (2003). LC-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(4), 534-541. https://doi.org/10.1007/s00216-003-1883-4

Pang, G.-F., Zhang, J.-J., Cao, Y.-Z., Fan, C.-L., Lin, X.-M., Li, Z.-Y., & Jia, G.-Q. (2004). Determination of streptomycin residues in honey by LC with post-column derivatization. *Journal of AOAC International*, 87(1), 39-44, https://doi.org/10.1093/jaoac/87.1.39

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2021). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food and Chemical Toxicology, 147, 111921. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111921

Pasho, I., Vaso, K., & Dardha, L. (2025). Nitroimidazoles in Albanian honey samples by LC-MS/MS analysis. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 18(2), 143-154, https://doi.org/10.1080/19393210.2025.2457134

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1259510, https://doi.org/10.1155/2017/1259510

Piva, S., Giacometti, F., Marti, E., Massella, E., Cabbri, R., Galuppi, R., & Serraino, A. (2020). Could honey bees signal the spread of antimicrobial resistance in the environment?. *Letters in applied microbiology*, *70*(5), 349-355. https://doi.org/10.1111/lam.13386

Posyniak, A., Jażdżewski, K., Pietruszka, K., Mitrowska, K., & Gajda, A. (2008). Improved analytical procedure for determination of sulfonamides in honey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy*, 52, 87-91.

Queiroga, M. C., Laranjo, M., Andrade, N., Marques, M., Costa, A. R., & Antunes, C. M. (2023). Antimicrobial, antibiofilm and toxicological assessment of propolis. *Antibiotics*, 12(2), 347, https://doi.org/10.3390/antibiotics12020347

Rebiai, A., & Lanez, T. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of Apis mellifera bee pollen from northwest Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 4(2), 155-163.

Resci, I., & Cilia, G. (2023). The use of honey bee (Apis mellifera L.) as biological monitors for pathogenic bacteria and antimicrobial resistance: A systematic review. *Environmental Pollution*, *333*, 122120. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122120

Reybroeck, W. (2002). Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. *Apiacta*, 37(1), 50-53.

Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F., & Herman, L. (2012). Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*, 158(1-2), 1-11, https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.012

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, *4*(3), 482. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482

Richards, E. D., Tell, L. A., Davis, J. L., Baynes, R. E., Lin, Z., Maunsell, F. P., Riviere, J. E., Jaberi-Douraki, M., Martin, K. L., & Davidson, G. (2021). Honey bee medicine for veterinarians and guidance for avoiding violative chemical residues in honey. Journal of the American Veterinary Medical Association, 259(8), 860-873.

Rodrigues, H., Leite, M., Oliveira, B., & Freitas, A. (2024). Antibiotics in honey: a comprehensive review on occurrence and analytical methodologies. *Open Research Europe*, 4, 125. DOI: 10.12688/openreseurope.17664.2

Rodrigues, H., Leite, M., Oliveira, M. B. P., & Freitas, A. (2025). Multi-analyte method for antibiotic residue determination in honey under EU Regulation 2021/808. *Antibiotics*, 14(10), 987, https://doi.org/10.3390/antibiotics14100987

Rodrigues, L., Smith, J., & Hernandez, P. (2024). Occurrence of veterinary antibiotic residues in honey and other bee products: A comprehensive review. *PMC Central*, PMC11555330. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11555330/

Saridaki-Papakonstadinou, M., Andredakis, S., Burriel, A., & Tsachev, I. (2006). Determination of tetracycline residues in Greek honey. *Trakia Journal of Sciences*, 4(1), 33-36.

Savarino, A. E., Terio, V., Barrasso, R., Ceci, E., Panseri, S., Chiesa, L. M., & Bonerba, E. (2020). Occurrence of antibiotic residues in Apulian honey: potential environmental risk. *Italian Journal of Food Safety*, 9(1), 8678, https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8678

Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., & Rice, D. (2008). Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by SPE-LC-

MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3509-3516, https://doi.org/10.1021/jf800293m

Shoaei, F., Talebi-Ghane, E., Ranjbar, A., & Mehri, F. (2024). Evaluation of antibiotic residues in honey: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Health Research*, 34(2), 1064-1075, https://doi.org/10.1080/09603123.2023.2188136

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 206439, https://doi.org/10.1155/2015/206439

Song, Q., Song, C., Chen, X., vd. (2024). Oxalate regulates crystal-cell adhesion and macrophage metabolism via JPT2/PI3K/AKT signaling to promote the progression of kidney stones. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14(6), 100956, https://doi.org/10.1016/j.jpha.2024.02.010

Sorucu, A., Oruç, H.H. Determination of biologically active phenolic compounds in propolis by LC–MS/MS according to seasons and altitudes. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019, 13:2461-2469. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00166-9

Steiner, D., Krska, R., Malachová, A., Taschl, I., & Sulyok, M. (2020). Evaluation of matrix effects and extraction efficiencies of LC–MS/MS methods as the essential part for proper validation of multiclass contaminants in complex feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(12), 3868-3880, https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07706

Stolker, A. A. M. (2012). Application of EU guidelines for the validation of screening methods for veterinary drugs. *Drug Testing and Analysis*, 4, 28-33, https://doi.org/10.1002/dta.1357

Sun, H., Ai, L., & Wang, F. (2007). Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC. *Chromatographia*, 66(5), 333-337, https://doi.org/10.1365/s10337-007-0329-0

Tamba-Berehoiu, R., Visovan, D. M., & Popa, C.-N. (2013). Study on the presence of antibiotic residues in honey intended for public consumption.

Tamošiūnas, V., & Padarauskas, A. (2008). Comparison of LC and UPLC coupled to MS–MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. *Chromatographia*, 67(9), 783-788, https://doi.org /10.1365/s10337-008-0579-5

Arı ürünleri tebliği. (2024). Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünleri Tebliği, No: 2024/6, *Resmî Gazete* (Sayı: 32529). https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2024/04/20240425-3.htm

Thanasarakhan, W., Kruanetr, S., Deming, R. L., Liawruangrath, B., Wangkarn, S., & Liawruangrath, S. (2011). Sequential injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics in pharmaceutical preparations and their residues in honey and milk samples using yttrium (III) and cationic surfactant. *Talanta*,*84*(5), 1401-1409. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.087

Thompson, T. S., & Noot, D. K. (2005). Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 551(1-2), 168-176, https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.077

Tian, B., Fadhil, N. H., Powell, J. E., Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2012). Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. MBio, 3(6), 10-1128. https://doi.org/10.1128/mBio.00312-12

Urcan, A. C., Marghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Bonta, V., & Muresan, C. I. (2022). Chemical composition and biological activities of bee pollen: A review. Plants, 11(4), 484. https://doi.org/10.3390/plants11040484

Urcan, A. C. (2025). Chemical Composition of Bee Bread. In *Bee Products – Chemical and Biological Properties* (ss. 419-472). *Springer*.

Urcan, A. C., Criste, A. D., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., Burtescu, R. F., Olah, N.-K., Cornea-Cipcigan, M., & Mărgăoan, R. (2024). Enhancing antioxidant and antimicrobial activities in bee-collected pollen through solid-state fermentation: A comparative analysis of bioactive compounds. *Antioxidants*, 13(3), 292, https://doi.org/10.3390/antiox13030292

Uzunöner, D., Acar, S., Akyıldız, İ. E., Erdem, Ö., Raday, S., & Damarlı, E. (2019). Simultaneous analysis of antibiotic residues in bee-pollen by the novel cost and time effective multi-class UHPLC-ESI-MS/MS method. *47th Apimondia International Apicultural Congress*, İstanbul, Türkiye.

Ülkü, N., Tayar, M., Kiraz, D., Özcan, A., Yibar, A., Kaygisiz, M., ... & Adaş, A. (2025). Transfer of Some Macrolide Group Antibiotics from Spiked Milk to Melting Cheese and Determination of Their Processing Factor with LC–MS/MS. *Food and Bioprocess Technology*, 18(2), 1905-1918.

Van Bruijnsvoort, M., Ottink, S. J., Jonker, K. M., & de Boer, E. (2004). Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A*, 1058(1-2), 137-142, https://doi.org/ 10.1016/j.chroma.2004.07.101

Van Loco, J., Janosi, A., Impens, S., Fraselle, S., Cornet, V., & Degroodt, J. M. (2007). Calculation of the decision limit (CCα) and the detection capability (CCβ) for banned substances. *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 8-12, https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.058

Varenina, I., Bilandžić, N., Luburić, Đ. B., Kolanović, B. S., Varga, I., Sedak, M., & Đokić, M. (2023). Determination of quinolones, macrolides, sulfonamides and tetracyclines in honey using QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, 148, 109676, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109676

Vasconcelos, M. R. D. S., Duarte, A. W. F., Gomes, E. P., Silva, S. C. D., & López, A. M. Q. (2017). Physicochemical composition and antioxidant potential of bee pollen from different botanical sources in Alagoas, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(4), 447-458, https://doi.org/10.1590/1413-70542017414009317

Végh, R., Csóka, M., Mednyánszky, Z., & Sipos, L. (2023). Pesticide residues in bee bread, propolis, beeswax and royal jelly – a review of the literature and dietary risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 176, 113806, https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113806

Verzegnassi, L., Savoy-Perroud, M.-C., & Stadler, R. (2002). Application of LC-ESI-MS/MS to the detection of 10 sulfonamides in honey. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 77-87, https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01341-9

Vidal, J. L. M., Aguilera-Luiz, M. M., Romero-González, R., & Frenich, A. G. (2009). Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by UPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1760-1767, https://doi.org/10.1021/jf8034572

Walden, D. M., Khotimchenko, M., Hou, H., Chakravarty, K., & Varshney, J. (2021). Effects of magnesium, calcium, and aluminum chelation on fluoroquinolone absorption rate and bioavailability: a computational study. *Pharmaceutics*, 13(5), 594, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050594

Wan, G. H., Cui, H., Zheng, H. S., Zhou, J., Liu, L. J., & Yu, X. F. (2005). Determination of tetracycline residues in honey using HPLC with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography B*, 824(1-2), 57-64, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.039

Wang, J. (2004). Determination of five macrolide antibiotic residues in honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 171-181, https://doi.org/10.1021/jf048414p ACS Publications

Wang, L.-F., Peng, J.-D., & Liu, L.-M. (2008). A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 630(1), 101-106, https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.066

Wang, L-F., Peng, J-D., & Liu, L-M. (2008). RP-HPLC coupled with resonance Rayleigh scattering for tetracycline antibiotics. *Analytica Chimica Acta*, 630(1), 101-106, https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.016

Williams, M. L., Olomukoro, A. A., Emmons, R. V., Godage, N. H., & Gionfriddo, E. (2023). Matrix effects demystified: strategies for complex samples. *Journal of Separation Science*, 46(23), 2300571, https://doi.org/10.1002/jssc.202300571

Wojtacka, J. (2024). The chemical residues in secondary beekeeping products of environmental origin. *Molecules*, 29(16), 3968, https://doi.org/10.3390/molecules29163968

World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Volume 2. Chapter 9.2. https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/ (accessed on 25 February 2025).

World Bank. (2017). Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future. Washington, *DC: World Bank*.

Wu, Y., & Zeng, Z. (2024). Antibiotic residues, antimicrobial resistance and intervention strategies of foodborne pathogens. *Antibiotics*, 13(4), 321, https://doi.org/10.3390/antibiotics13040321

Xu, J. Z., Ding, T., Wu, B., Yang, W. Q., Zhang, X. Y., Liu, Y., ... & Jiang, Y. (2008). Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 868(1-2), 42-48, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.027

Yang, Y-C., Chou, W-M., Widowati, D. A., Lin, I-P., & Peng, C-C. (2018). 10-Hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly shows bactericidal and anti-inflammatory activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 202, https://doi.org/10.1186/s12906-018-2241-2

Yang, Y., Li, X., Lin, J., & Bao, R. (2024). A modified QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for rapid determination of multiple antibiotics and sedative residues in freshwater fish. *Food Chemistry: X*, 22, 101268, https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101268

Yang, Y., Lin, G., Liu, L., & Lin, T. (2022). Rapid determination of multi-antibiotic residues in honey based on modified QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 374, 131733, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131733

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

2002/657/EC : AB tarama/doğrulama yöntemleri karar metni
% v/v : Hacimce yüzde
B : Boş numune ortalama sinyali
β-hata : Yanlış-uygunluk (false compliant) hatası
C18 : Oktadesilsilan (ters faz kolon türü)
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+} : Polende kompleks oluşturan metal iyonları
CCβ : β-hatasına karşı kontrol edilen decision limit
CE : Collision Energy (Çarpışma Enerjisi)
CRM : Sertifikalı Referans Malzeme
DL : Desolvation Line
EC : Avrupa Komisyonu (European Commission)
EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit (şelatör)
EFSA : Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ESI : Elektrosprey İyonizasyon
EU : Avrupa Birliği
EURL : Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı
Fm : Kesme değeri (fortifiye numune yanıtına dayalı karar seviyesi)
HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS : Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi
LOD : Limit of Detection
M : Fortifiye (zenginleştirilmiş) numunelerin ortalama yanıtı
MRM : Multiple Reaction Monitoring
m/z : Kütle/Yük oranı
N_2 : Azot gazı
pH : Hidrojen iyonu aktivitesi
ppm : Parts per million / Milyonda bir birim
mg/kg : Parts per million / Milyonda bir birim
µg/kg : Parts per billion / Milyarda bir birim
PTFE : Politetrafloroetilen
Q3 : Üçüncü Kuadrupol
QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe numune hazırlama yöntemi
RASFF : Avrupa Birliği'nin Gıda ve Yem Hızlı Uyarı Sistemi
RSD : Relative Standard Deviation
SDb : Boş numunelerin standart sapması
STC : Tarama Hedef Konsantrasyonu
STD1–STD2–STD3 : Hazırlanan standart çözeltiler
T : Eşik değer (blank ortalamasından hesaplanan)

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel yönlendirmeleri ve değerli destekleriyle çalışmama rehberlik eden tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa TAYAR'a; bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül EYİGÖR ve Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a; tez sürecinde sundukları katkı ve destekleri için Dr. Ali ÖZCAN ve Dr. Deniz KİRAZ'a içtenlikle teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca sağladıkları kurumsal desteklerden dolayı Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü yönetimine ve tez çalışmamın yürütülmesine maddi destek sağlayan Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM) şükranlarımı sunarım. Ayrıca, her zaman yanımda hissettiğim destekleri ve bana güç veren varlıkları için aileme en derin teşekkürlerimi iletirim.

9. ÖZGEÇMİŞ

Niyazi ÜLKÜ, ilk ve orta öğrenimini Bilecik ili Bozüyük ilçesinde bulunan Bozüyük Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. 2003 yılında başladığı Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2008 yılında mezun oldu. Mezuniyetinin ardından Pazaryeri İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışma hayatına başladı. 2018 yılından itibaren görev yaptığı T.C. Tarım ve Orman Bakanlığında, özellikle LC-MS/MS tabanlı analizlerde çalışma imkanı buldu. Çeşitli TAGEM projelerinde yürütücü ve araştırmacı olarak görev aldı.