



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE ÜRETİLEN
ÇİÇEK VE SALGI BALLARINDA SPE-LC-MS/MS İLE
BALDA PİROLİZİDİN ALKALOİDLERİNİN (PA) BELİRLENMESİ**

**İSMAİL COŞKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE ÜRETİLEN
ÇİÇEK VE SALGI BALLARINDA SPE-LC-MS/MS İLE
BALDA PİROLİZİDİN ALKALOİDLERİNİN (PA) BELİRLENMESİ**

**İSMAİL COŞKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN KOLA**

ADANA, 2025

JÜRİ ONAY SAYFASI

(ÇUKUROVA BÖLGESİNDE ÜRETİLEN ÇİÇEK VE SALGI BALLARINDA SPE-LC-MS/MS İLE BALDA PİROLİZİDİN ALKALOİDLERİNİN (PA) BELİRLENMESİ)

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında 21801001012 numaralı İsmail COŞKUN tarafından ilgili yönetmeliklerin belirlediği şartlar doğrultusunda tamamlanan Yüksek Lisans aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa AKYOL

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Zafer ERBAY

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Osman KOLA

Danışman

Tez Jürisi

Prof. Dr. Osman KOLA

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Sertaç ÖZER

Çukurova Üniversitesi

Doç. Dr. Murat Reis AKKAYA

Adana Alparslan Türkeş
Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

23/01/2025

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmada;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

23/01/2025

İsmail COŞKUN

ÖZET

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE ÜRETİLEN ÇİÇEK VE SALGI BALLARINDA SPE-LC-MS/MS İLE BALDA PİROLİZİDİN ALKALOİDLERİNİN (PA) BELİRLENMESİ

İsmail COŞKUN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KOLA

Ocak 2025, 104 sayfa

Balın ana bileşenleri fruktoz ve glikozdur (~%70, w/w). Bal ayrıca önemli miktarlarda disakkaritler ve trisakkaritleri (%10–15, w/w) ve su, mineraller, vitaminler, organik asitler, enzimler, lipidler, fenolik ve uçucu bileşikler, serbest amino asitler, proteinler ve bitki sekonder metabolit bileşikler dahil olmak üzere doğal kaynaklı çeşitli kimyasalları içerir. İnsan sağlığına faydalı etkiler sağlayan bileşiklere ek olarak, mikotoksinler ve pirolizidin alkaloidleri (PA'lar) gibi doğal toksinler de arı poleni ve diğer arı ürünlerinde bulunabilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, bal üretiminin yaygın olarak yapıldığı Çukurova bölgesinden çiçek balı (5 adet) temin edilmiştir. Bal numunelerinde pirolizidin alkaloid bileşenleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca bu bal numunelerinde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)'nde yer alan ballara ait diğer bazı özellikler (nem, şeker profili, suda çözünmeyen madde, serbest asitlik, elektrik iletkenliği, diastaz sayısı, HMF, delta C13 değeri, protein, prolin, naftalin) belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda örneklerde prolizidin alkaloidleri analizi harici diğer analizler bakımından TGK Bal tebliğine göre uygun, toplam prolizidin alkaloidlerin sonucu 0.25-216.91 µg/kg aralığında bulunmuştur. Bu değerler bakımından örnek sonuçları Avrupa Birliği'nin belirlemiş olduğu maksimum kalıntı limitinin altında (500 µg/kg) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında prolizidin alkaloid bakımından kapsamlı bölgesel bal ve bal ürünlerinin analizi yapılmalı, bu veriler sonucunda bal üretiminde önlemler alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Çukurova, Prolizidin Alkaloid, Bal

ABSTRACT

DETERMINATION OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS (PA) IN HONEY BY SPE-LC-MS/MS IN FLOWER AND SECRET HONEY PRODUCED IN CUKUROVA REGION

İsmail COŞKUN

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Osman KOLA

January 2025, 104 pages

The main components of honey are fructose and glucose (~70%, w/w). Honey also contains significant amounts of disaccharides and trisaccharides (10–15%, w/w), as well as various naturally occurring chemicals including water, minerals, vitamins, organic acids, enzymes, lipids, phenolic and volatile compounds, free amino acids, proteins, and plant secondary metabolite compounds. In addition to compounds that provide beneficial effects on human health, natural toxins such as mycotoxins and pyrrolizidine alkaloids (PAs) can also be found in bee pollen and other bee products.

In this thesis study, flower honey (5 samples) was obtained from the Çukurova region, where honey production is common. Pyrrolizidine alkaloid components and concentrations were determined in the honey samples. Additionally, other properties of the honey samples, as specified in the Turkish Food Codex Honey Regulation (Regulation No: 2020/7), were determined, including moisture content, sugar profile, insoluble substances, free acidity, electrical conductivity, diastase number, HMF, delta C13 value, protein, proline, and naphthalene.

As a result of the analysis, the other properties of the samples were found to be in compliance with the Turkish Food Codex Honey Regulation, except for pyrrolizidine alkaloid analysis. The total pyrrolizidine alkaloid content was found to range from 0.25 to 216.91 µg/kg. These values were found to be below the maximum residue limit set by the European Union (500 µg/kg). In light of these results, a comprehensive regional analysis of honey and honey products for pyrrolizidine alkaloids should be conducted, and measures should be taken in honey production based on these findings.

Keywords: Cukurova, Pyrrolizidine alkaloid, Honey

İthaf

Kıymetli Aileme,

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında yanımda olarak bilgi birikimi ve rehberliğiyle beni yönlendiren, akademik gelişimime büyük katkılar sağlayan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Osman KOLA'ya en içten şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma sürecinde, değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden ve desteğini her zaman hissettiren Doç. Dr. Murat Reis AKKAYA'ya; araştırmalarımda özverili katkılarıyla yanımda olan Araştırma Görevlisi Erva PARILDI'ya, Fadime ATLI, Burak ÖZGÖREN ve Ebru KURT'a teşekkür ederim. Verdikleri destek ve paylaştıkları deneyimler, çalışmamın başarısına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.

Ayrıca, çalışmalarım süresince beni cesaretlendiren, her zorlukta yanımda olarak motivasyon kaynağım olan, fedakarlıkları ve sevgileriyle beni güçlendiren sevgili eşim Gülşah COŞKUN ve canım kızım Defne Esme COŞKUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İsmail COŞKUN

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
<i>İthaf</i>	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Balın Tanımı, Çeşitleri ve Özellikleri	4
2.1.1. Balın Tanımı	4
2.1.2. Bal Çeşitleri ve Özellikleri	4
2.1.3. Balın İnsan Sağlığı Açısından Önemi	7
2.1.4. Dünyada ve Türkiye’de Bal Üretimi ve Ticareti	8
2.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin (PAs) Genel Özellikleri	9
2.2.1. PA’ların Kimyasal Yapısı ve Sınıflandırılması	9
2.2.2. PA’ların Kaynakları: Doğal ve Çevresel Etkenler	12
2.2.3. PA’ların Toksikolojik Etkileri	13
2.3. Balda PA Oluşumunun Kaynakları	15
2.4. PA’ların Balda Analizi İçin Kullanılan Yöntemler	20
2.4.1. Geleneksel Analitik Yöntemler	20
2.4.2. SPE-LC-MS/MS Yöntemi	21
2.5. Ulusal ve Uluslararası Yasal Düzenlemeler	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25
3.2. Balların Bazı Özelliklerine Ait Analizler ve Kullanılan Yöntemler	25

3.2.1.	Balda Nem Tayini	25
3.2.2.	Balda Şeker Bileşenleri Tayini	26
3.2.3.	Balda Suda Çözünmeyen Madde Tayini	29
3.2.4.	Balda pH tayini	30
3.2.5.	Balda Serbest Asitlik Tayini	30
3.2.6.	Balda Elektrik İletkenliği Tayini	31
3.2.7.	Balda Diastaz Sayısı Tayini	31
3.2.8.	Balda Hidroksimetilfurfural (HMF) Tayini	32
3.2.9.	Balda Protein (DUMAS yöntemi) ve Ham Bal Delta C13 Değerleri Arasındaki Fark	35
3.2.10.	Balda Protein (DUMAS yöntemi) ve Ham Bal Delta C13 Değerlerinden Hesaplanan C4 Şekerleri Oranı Karbon İzotop ($\delta^{13}C$) Analizi ve C4 Şeker Oranı Analizi	36
3.2.11.	Balda Prolin Miktarı Tayini	38
3.2.12.	Balda Naftalin Miktarı Tayini	40
3.2.13.	Balda Renk Tayini (L^* , a^* , b^*)	43
3.3.	Balda Prolizidin Alkaloidlerinin (PA) SPE-LC-MS/MS İle Belirlenmesi	43
3.4.	İstatistiksel Analiz ve Değerlendirme	49
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1.	Bal Örneklerinin Şeker İçerikleri (Fruktoz, Glikoz, Sakkaroz, Maltoz) ve Dağılımı	52
4.2.	Bal Örneklerinin Diastaz, Prolin, Naftalin ve HMF İçerikleri	54
4.2.1.	Bal Örneklerinin Enzim Aktivitesi ve Diastaz Sayısı	54
4.2.2.	Bal Örneklerinin Prolin İçeriği	55
4.2.3.	Bal Örneklerinde Naftalin Kalıntısı	56
4.3.	Bal Örneklerinin $\delta^{13}C_{bal}$, $\delta^{13}C_{protein}$ Değerleri, Protein-Bal $\delta^{13}C$ Farkı ve C4 Şeker Oranı Analizi	57
4.4.	Bal Örneklerinin İletkenlik, pH, Asitlik ve Serbest Asitlik Değerleri	59
4.5.	Bal Örneklerinin Prolizidin Alkaloidleri İçeriği	62
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	66
	KAYNAKÇA	69
	EKLER	77
	ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	PA'larda Yaygın Olarak Bulunan Necine Bazları	10
Şekil 2.	Necine çekirdeklerinin kimyasal yapısı (1) Pirolizidin, (2) Pirolizidin N-oksit, (3) 1,2-dehidropirolizidin, (4) Didehidropirolizidin	11
Şekil 3.	Necine yapılarına göre PA çeşitleri (1) Retronesin, (2) Heliotridin, (3) Otonecine, (4) Platinesin	11
Şekil 4.	Balda Karakteristik Belirteçler: Kalite ve Özgünlük Göstergeleri	20
Şekil 5.	Shimadzu Prominence HPLC Cihazı	27
Şekil 6.	Shimadzu LC2050C 3D Plus HPLC Cihazı	33
Şekil 7.	HMF Kalibrasyon Eğrisi	33
Şekil 8.	Shimadzu UV-1900i UV Spektrometre Cihazı	39
Şekil 9.	Shimadzu GCMS-TQ8040NX Cihazı	40
Şekil 10.	Naftalin Kalibrasyon Eğrisi	41
Şekil 11.	Alman Risk Değerlendirme Enstitüsü “BfR-PA-Honey-1.0/2013” no’lu Pirolizidin Analizi	43
Şekil 12.	Shimadzu LCMS-8045 Cihazı	43
Şekil 13.	Bal Örneklerinin Prolizidin Alkoloid İçerikleri	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7) Ballara Ait Diğer Bazı Özellikler	6
Tablo 2.	Dünya Bal Üretimi, Ton (2018-2022)	8
Tablo 3.	Türkiye Arıcılık İstatistikleri (2016-2023)	9
Tablo 4.	Türkiye ve Kıbrıs'tan Alınan Bal Örneklerinin Alındığı Bölgeler	19
Tablo 5.	Şeker Bileşenlerinin Kalibrasyon Denklemi ve Regrasyon Katsayısı	28
Tablo 6.	Pirolizidin Alkaloid Analizi Gradient ve Akış Hızı Tablosu	45
Tablo 7.	Prolizidin Alkaloid Standartları	46
Tablo 8.	Prolizidin Alkaloid Hesaplama ve Referans Kütle Geçiş İyonları	47
Tablo 9.	Prolizidin Alkaloidlerin Kalibrasyon Denklemi ve Regrasyon Katsayısı (r ²)	49
Tablo 10.	Bal örneklerine ait fizikokimyasal sonuçlar	51
Tablo 11.	Bal örneklerine ait Fruktoz, Glikoz, Sakkaroz, Maltoz ve Fruktoz/Glikoz Oran miktarları (g/100g)	52
Tablo 12.	Bal örneklerine ait Diastaz-Prolin-Naftalin-HMF miktarları	55
Tablo 13.	Bal örneklerine ait C13 Protein-C13 Hambal-Protein Hambal Farkı-C4 değerleri	58
Tablo 14.	Bal örneklerine ait İletkenlik-pH-Asitlik-Serbest Asitlik değerleri	59
Tablo 15.	Bal örneklerine ait Renk değerleri	61
Tablo 16.	Prolizidin Alkaloid İçerikleri	63

KISALTMALAR

BfR	: Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü
CONTAM	: Gıda Zincirindeki Bulaşanlara İlişkin Bilimsel Paneli
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Direct Scanning Calorimetre)
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ESI	: Elektron Spray İyonizasyonu
F+G	: Fruktoz+Glikoz
FGO	: Fruktoz/Glikoz Oranı
HMF	: Hidroksimetilfurfural
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IHC	: Uluslararası Bal Komisyonu
LCMSMS	: Likit Kromatografi Üç Kuadrupollü Kütle Spektrometresi
MRM	: LCMSMS cihazı kütle geçişleri
PA	: Pirolizidin Alkaloidleri
PDA	: Fotodiode Array Dedektörü
RID	: Kırılma İndeksi Dedektörü
RP-HPLC	: Ters farz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

SEMBOLLER

g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
°C	: Santigrad Derece
ppb, µg/kg	: Milyarda Bir
ppm, mg/kg	: Milyonda Bir
rpm	: Revolutions per Minute (1 Dakika İçerisinde Gerçekleştirilen Dönüş/Devir Sayısı)
µg	: Mikrogram

1. GİRİŞ

Bal, doğal yapısı ve zengin besin içeriği ile tarih boyunca hem besin kaynağı hem de tıbbi amaçlarla kullanılan değerli bir üründür. Balın kimyasal bileşimi ve kalite özellikleri, üretim kaynağı, coğrafi koşullar ve bitki örtüsü gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bunun yanı sıra, balın doğal bileşenleri arasında yer alan ve bitkisel kaynaklardan gelebilen pirolizidin alkaloidleri (PAs), toksik ve potansiyel kanserojen etkileri nedeniyle tüketici sağlığı açısından önemli bir risk unsuru oluşturmaktadır. Günümüzde, PAs kontaminasyonu özellikle çiçek ballarında sıkça gündeme gelmekte olup, bu bileşiklerin balda varlığı, türleri ve konsantrasyonları üzerine yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır.

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)'ne göre bal; “bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının, bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı, doğası gereği kristallenebilen doğal ürün” olarak tanımlanmaktadır. Bu tebliğde geçen bal çeşitleri ise kaynağına göre çiçek balı ve salgı balı olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Çiçek balı; “bitki nektarından elde edilen bal”, salgı balı; “bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin (Hemiptera) salgılarından elde edilen bal” olarak tanımlanmıştır (TGK, 2020). Üretim ve/veya pazara sunulmuş şekline göre ballar; petekli bal, doğal petekli bal, karakovan balı, süzme bal, petekli süzme bal, sızma bal, pres bal ve filtre edilmiş bal şeklinde sınıflandırılmaktadır (TGK, 2020). Bu Tebliğ kapsamında piyasaya sunulan veya insan tüketimi amacıyla herhangi bir gıda maddesinde bileşen olarak kullanılan balların kriterleri ve özellikleri de tanımlanmıştır (TGK, 2020).

Balın ana bileşenleri fruktoz ve glikozdur (~%70, w/w). Bal ayrıca önemli miktarlarda disakkaritler ve trisakkaritleri (%10–15, w/w) ve su, mineraller, vitaminler, organik asitler, enzimler, lipidler, fenolik ve uçucu bileşikler, serbest amino asitler, proteinler ve bitki sekonder metabolit bileşikleri dahil olmak üzere doğal kaynaklı çeşitli kimyasalları içerir. Balda az miktarlarda bulunmasına rağmen, bu kimyasal bileşenler parmak izi görevi görür ve balın botanik ve coğrafi kökeninin doğrulanması için potansiyel araçlar olarak tanımlanır (Dranca vd., 2022; Rasyiid ve Susandarini, 2020). İnsan sağlığına faydalı etkiler sağlayan bileşiklere ek

olarak, mikotoksinler ve pirolizidin alkaloidleri (PA'lar) gibi doğal toksinler de arı poleni ve diğer arı ürünlerinde bulunabilmektedir (De Jesus Inacio vd., 2020).

Balın kalitesi hem uluslararası standartlar (Codex Alimentarius standardı) hem de bal ile ilgili Avrupa Konseyi Direktifi ve ulusal düzeyde uygulanan yasa ve yönetmelikler tarafından açıkça tanımlanmıştır. Avrupa Birliği, balın dünyada en çok katkı içeren ve saf olmayan üçüncü ürün olduğunu ve AB pazarına girmeden önce test edilen numunelerin %20'sinin mevcut kalite standartlarını karşılamadığını açıklamıştır (Codex Alimentarius, 2001; European Council ve European Parliament, 2014). Balın kalitesi ile ilgili en önemli konulardan biri, izin verilmeyen maddelerin katılmasıyla tağşiş yapılmasıdır. Balın bileşiminin büyük bir kısmı şekerlerden oluştuğu için, bala düşük maliyetli tatlandırıcılar ve ticari şuruplar ekleyerek tağşiş, yapılan en yaygın hilelerden biridir. Bu katkı maddeleri arasında nişasta bazlı şeker şurupları (yüksek fruktozlu mısır şurubu, şeker kamışı şurubu, pirinç şurubu ve manyok nişastasından elde edilen yüksek fruktozlu şurup), pancar veya kamıştan üretilen şuruplar, yüksek fruktozlu inülin şurubu, hurma şurubu vb. bulunmaktadır (Se vd., 2019).

Balın bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri, balı üreten bal arısı türlerine ve coğrafi kökenlerine bağlı olarak değişmektedir. Balda bulunan sekonder metabolitler, bal arıları tarafından toplanan çiçek nektarlarından geldiğinden, her bal türünün sekonder metabolit içeriği, bal arıları tarafından ziyaret edilen bitkilerin türüne bağlı olarak değişmektedir. Bal arıları çiçekleri ziyaretleri sırasında polenlerin yanı sıra nektar da toplarlar ve poleni yiyecek olarak kovanlarına getirirler. Bal arıları çeşitli bitkileri ziyaret ettiğinden, arı tarafından toplanan nektar ve polen çeşitliliği balda bulunan sekonder metabolitlerde farklılıklara neden olur ve bu varyasyonlar balın fizikokimyasal özelliklerini de büyük ölçüde etkiler (Rasyiid ve Susandarini, 2020).

Bu yüksek lisans tezinin amacı, Çukurova bölgesinden temin edilen çiçek balı numunelerinin, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)'ne uygun olarak bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve balda bulunan pirolizidin alkaloidlerinin (PAs) miktarlarının modern analitik yöntemlerle tespit edilmesidir. Çalışma, bölgedeki bal üretiminin kalite standartlarını değerlendirmek ve balda potansiyel toksik maddelerin varlığını ortaya koyarak tüketici sağlığına yönelik riskleri incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, Çukurova bölgesinden 5 adet iek balı numunesi temin edilmiştir. Bal numunelerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen parametrelere uygunluğu (Nem oranı, Sakkaroz miktarı, Fruktoz/Glukoz oranı, Serbest asitlik, Elektrik iletkenliği, Diastaz sayısı, Hidroksimetilfurfural (HMF) miktarı, Bal protein değerleri ile karbon izotop ($\delta^{13}\text{C}$) farkları, Prolin miktarı, Naftalin miktarı vb.) değerlendirilmiştir. Ayrıca, balda pirolizidin alkaloidlerinin varlığı ve miktarı, katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile zenginleştirme ve sıvı kromatografi-tandem ktle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, bölgedeki bal üretiminde kalite ve güvenlik standartlarının sağlanması açısından değerlendirilmiştir. Bu kapsamda çalışma, Çukurova bölgesinden elde edilen bal örneklerinin kimyasal ve toksikolojik özelliklerini detaylı bir şekilde inceleyerek, bölge bal üretiminin potansiyel risklerini ve kalitesini ulusal standartlarla kıyaslamayı hedeflemektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Balın Tanımı, Çeşitleri ve Özellikleri

Bal, doğanın insanlığa sunduğu en değerli ürünlerden biri olarak, bal arıları tarafından bitki nektarları ve salgılarının toplanarak işlenmesi sonucu üretilen, zengin besin değerine sahip, doğal ve kristallenebilen bir üründür; bu bağlamda bal, kaynaklarına ve üretim şekline göre çeşitli türlere ayrılmaktadır.

2.1.1. Balın Tanımı

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)’ne göre bal; “bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının, bal arısı tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı, doğası gereği kristallenebilen doğal ürün” olarak tanımlanmaktadır (TGK, 2020).

2.1.2. Bal Çeşitleri ve Özellikleri

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)’ne göre bal çeşitleri kaynağına, üretim ve/veya pazara sunuluş şekline göre iki grup altında toplanmaktadır (TGK, 2020). Buna göre;

a) Kaynağına göre (TGK, 2020);

- 1) Çiçek balı: Bitki nektarından elde edilen balı,
- 2) Salgı balı: Bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin (Hemiptera) salgılarından elde edilen balları,
 - Çam balı: Bazı çam ağaçları (*Pinus brutia*, *P. nigra*, *P. pinea*) üzerinde yaşayan *Marchalina hellenica* (koşnil)’nın gelişim döneminde bu ağaçların karbonhidratça zengin tatlı öz suyundan oluşturduğu bal çiğinin, bal arıları tarafından toplanıp değişikliğe uğratarak ürettiği salgı balını,

b) Üretim ve/veya pazara sunuluş şekline göre (TGK, 2020);

- 1) **Petekli bal:** Petek gözlerinde yavru içermeyen, bal mumuyla kabartılan temel petekli çerçevelere depolanan ve peteğin tümü veya büyük bölümü sırlanmış olarak satışa sunulan balı,
- 2) **Doğal petekli bal:** Temel petek kullanılmadan, standart kovanlarda arılar tarafından peteği ile beraber üretilen balı,
- 3) **Karakovan balı:** Temel petek kullanılmadan, karakovanlarda arılar tarafından peteği ile beraber üretilen balı,
- 4) **Süzme bal:** Sırları alınan yavrusuz peteklerden santrifüj yolu ile elde edilen balı,
- 5) **Petekli süzme bal:** Süzme bal içerisinde petekli bal parçaları ile hazırlanmış balı,
- 6) **Sızma bal:** Sırları alınmış yavrusuz peteklerden, doğal akışı ile sızdırılarak elde edilen balı,
- 7) **Pres balı:** Yavrusuz peteklerin doğrudan veya 45°C'yi aşmamak üzere ısıtılarak preslenmesi ile elde edilen balı,
- 8) **Filtre edilmiş bal:** Süzme işlemi sırasında 0.2 mm'nin altında gözenek büyüklüğüne sahip filtrasyon malzemeleri kullanılarak yabancı organik veya inorganik maddelerin uzaklaştırılması sonucunda polen içeriği azalmış balı,

ifade eder.

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)'ne göre bal çeşitlerinin diğer bazı özellikleri ise Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğine Göre Ballara Ait Diğer Özellikler (TGK, 2020)

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
Nem (en fazla)	% 20	% 20	% 20	% 23
	% 23 Püren (<i>Calluna vulgaris</i>) ve Funda (<i>Erica spp</i>) ballarında			% 25 Püren ve Funda kaynaklı fırıncılık ballarında
Sakkaroz (en fazla)	5 g/100 g 10 g/100 g Yalancı akasya (<i>Robina pseudoacacia</i>), Adi yonca (<i>Medicago sativa</i>), Menzies Banksia (<i>Banksia meziei</i>), Tatlı yonca (<i>Hedysarum</i>), Kırmızı okaliptüs (<i>Eucalyptus camadulensis</i>), Meşin ağacı (<i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucyphia milliganii</i>) ve Narenciye ballarında 15 g/100 g Lavanta çiçeği (<i>Lavandula spp.</i>), Hodan (<i>Boraga officinalis</i>) ballarında	5 g/100 g	5 g/100 g	5 g/100 g
Fruktoz +Glukoz (en az)	100 g'da 60 g			
Fruktoz / Glukoz	0.9 – 1.4 1.0-1.85 Kestane (<i>Castanea sativa</i>) 1.2-1.85 Akasya (<i>Robinia pseudoacacia</i>) 1.0-1.65 Kekik (<i>Thymus spp.</i>)	1.0-1.4	1.0-1.4	-
Maltoz (% en fazla)	4			
Suda çözünmeyen madde (en fazla)*	0.1 g/100 g	0.1 g/100 g	0.1 g/100 g	0.1 g/100 g
Serbest asitlik (en fazla)	50 meq/kg	50 meq/kg	50 meq/kg	80 meq/kg
Elektrik iletkenliği	En fazla 0.8 mS/cm Kocayemiş (<i>Arbutus unedo</i>), Funda (<i>Erica spp.</i>), Okaliptüs (<i>Eucalyptus camadulensis</i>), İhlamur (<i>Tilia spp.</i>), Püren (<i>Calluna vulgaris</i>), Okyanus mersini (<i>leptospermum</i>), Çay ağacı (<i>Melaleuca spp.</i>) ve Pamuk (<i>Gossypium spp.</i>)'dan elde edilen ballar hariç En az 0.8 mS/cm Kestane balında	En az 0,8 mS/cm	En fazla 0.8 mS/cm	En fazla 0.8 mS/cm
			En az 0.8 mS/cm (Kestane balı ve salgı balı karışımlarında)	
Diastaz sayısı (en az)	8 3 Narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim bulunan ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda	8	8	-
HMF (en fazla)**	40 mg/kg			
Bal $\delta^{13}C$ değeri ($\delta^{13}C_{bal}$)	-23 ve daha negatif	- 23 ve daha negatif Çam balında -22.5 ve daha negatif	-23 ve daha negatif	
Balda protein ($\delta^{13}C_{protein}$) ve bal ($\delta^{13}C_{bal}$) $\delta^{13}C$ değerleri arasındaki fark	-1.0 veya daha pozitif	-1.0 veya daha pozitif Çam balında bu kriter aranmaz	-1.0 veya daha pozitif	-1.0 veya daha pozitif
Balda protein ve bal $\delta^{13}C$ değerlerinden hesaplanan C4 şekerleri oranı (en fazla)	%7	%7 Çam balında bu kriter aranmaz	%7	%7
Prolin miktarı (en az)	300 mg/kg 180 mg/kg Kanola, ihlamur, narenciye, lavanta, okaliptüs ballarında 120 mg/kg Biberiye, akasya ballarında 500 mg/kg Kestane ballarında	300 mg/kg	300 mg/kg	180 mg/kg
Naftalin miktarı (en fazla)***	10 ppb			

* Pres balında suda çözünmeyen madde miktarı 0,5 g/100 g'ı geçemez.

** Üretildiği bölge etiketinde belirtilmek koşulu ile tropikal ülke kaynaklı ballarda HMF miktarı en çok 80 mg/kg olur.

*** Balmumunda naftalin miktarı 10 ppb'den fazla olamaz.

2.1.3. Balın İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Bal, doğal ve yaygın olarak tüketilen bir ürün olarak, uzun zamandır sayısız sağlık faydası ile tanınmaktadır. Sadece besleyici bir tatlandırıcı değil, aynı zamanda tıbbi özelliklere sahip fonksiyonel bir gıdadır. Bilimsel çalışmalar, antioksidanlar, fenolik asitler ve flavonoidler dahil olmak üzere zengin biyolojik aktif bileşenler içeriği sayesinde balın insan sağlığını teşvik edici rolüne dair önemli kanıtlar sağlamıştır. Balın insan sağlığındaki önemine aşağıda kısaca değinilmiştir:

– Besleyici ve Tedavi Edici Özellikler

Bal, esas olarak fruktoz ve glikoz gibi karbonhidratlar, su, vitaminler, mineraller, amino asitler ve fenolik bileşiklerden oluşur. Eşsiz bileşimi, enerji sağlarken aynı zamanda antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler sunar. Araştırmalar, glisemik düzenleme, yara iyileştirme ve bağışıklık modülasyonu konusundaki kullanımını vurgulamaktadır (Ajibola, vd. 2015; Scepankova, vd. 2017).

– Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteler

Balın antioksidan aktivitesi, vücudu oksidatif strese ve serbest radikal hasarından koruyan fenolik bileşenler ve flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Bu antioksidanlar, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların riskini azaltmaya yardımcı olur. Bal ayrıca önemli antimikrobiyal özellikler sergiler, bu da onu yaraların tedavisinde ve enfeksiyonların önlenmesinde etkili kılar (Abdulwahid, vd. 2012; Scepankova, vd. 2017).

– Glisemik Düzenlemedeki Rolü

Balın kan şekeri seviyeleri üzerindeki etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapay tatlandırıcıların aksine, daha düşük bir glisemik indekse sahiptir, bu da ölçülü tüketildiğinde diyabetli bireyler için uygun hale getirir. Araştırmalar, balın açlık kan şekeri seviyelerini düzenlemeye ve lipid profillerini iyileştirmeye yardımcı olabileceğini göstermektedir (Cortés, vd. 2011; Abdulwahid, vd. 2012; Crittenden, 2011).

– Anti-inflamatuar ve Yaraların İyileşmesi

Balın anti-inflamatuar özellikleri, yaraların iyileşmesine ve iltihabı azaltmasına katkıda bulunur. Yara bakımında uygulanması, iyileşmeyi hızlandırır, iz oluşumunu en aza indirir ve antimikrobiyal aktivitesi sayesinde enfeksiyon riskini azaltır (Ajibola, vd. 2015; Scepankova, vd. 2017).

Bunun yanısıra, tarihsel olarak, bal çeşitli kültürlerde hem bir ilaç hem de bir besin maddesi olarak kullanılmıştır. Antik Mısır'dan Hindistan'daki Ayurveda uygulamalarına kadar, bal sağlık artırıcı özellikleri nedeniyle kutlanmıştır. Bu geleneksel kullanımlar, modern bilimsel bulgularla desteklenmekte ve çağlar boyunca önemini vurgulamaktadır (Cortés, vd. 2011; Abdulwahid, vd. 2012; Crittenden, 2011).

2.1.4. Dünyada ve Türkiye’de Bal Üretimi ve Ticareti

Tarım ve Orman Bakanlığının 10 Nisan 2024 tarihinde yayınlanan arıcılık ürün raporunda Dünyada 2022 yılında yaklaşık 1,8 milyon ton bal üretimi gerçekleştirilmiştir. Bal üretim miktarı 2022 yılında bir önceki yıla göre çok az bir değişim göstermiştir (Tablo 2). 2022 yılı dünya bal üretiminde %25,2’lik paya sahip olan Çin 462 bin ton üretimi ile ilk sırada yer alırken, bal üretiminde %6,5’lük paya sahip Türkiye 118 bin ton ile ikinci, %4,3’lük pay ile İran ise 79 bin ton üretimi ile üçüncü sırada yer almaktadır. (Tarım ve Orman Bakanlığı Arıcılık Raporu, 2024).

Tablo 2. Dünya Bal Üretimi (ton) (2018-2022)

Ülkeler	2018	2019	2020	2021	2022
Çin	446.879	444.054	458.100	472.700	461.900
Türkiye	107.920	109.330	104.077	96.344	118.297
İran	72.796	72.851	74.293	77.152	79.535
Arjantin	79.468	78.909	72.441	71.318	70.437
Ukrayna	71.279	69.937	68.028	68.558	63.079
Hindistan	63.826	64.514	65.250	66.278	74.204
Rusya	65.006	63.526	66.368	64.533	67.014
Meksika	64.253	61.986	54.165	62.080	64.320
ABD	69.857	71.179	66.948	57.364	56.849
Brezilya	42.268	45.801	51.508	55.828	60.966
Diğer	754.957	675.037	693.299	679.789	679.789
Dünya	1.838.509	1.757.124	1.774.477	1.771.944	1.830.768

Aynı rapordaki verilerine göre (Tablo 3), Türkiye’de bal üretimi 2023 yılında 114.886 tondur. Dünya bal üretiminde Çin’in ardından 2. sırada yer alan Türkiye, Dünya bal üretiminin %5.44’ünü karşılamaktadır. Türkiye’de arıcılık yapan işletme sayısı bir önceki yıla göre yüzde 5.25 oranında artarak 100.399 adete ulaşmıştır. Koloni sayısı ise bir önceki yıla göre yüzde 2.67 oranında artarak 9.224.881’e yükselmiş, balmumu üretiminde ise herhangi bir değişim olmamış ve 4.440 ton olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Türkiye’nin iller bazında en çok bal üretimi yapılan illeri Ordu (19.007 ton), Adana (12.280 ton), Muğla (8.082 ton) ve Sivas (6.383 ton) (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024).

Tablo 3. Türkiye Arıcılık İstatistikleri (2016-2023)

Yıl	İşletme Sayısı (Adet)	Koloni Sayısı (Adet)	Bal Üretimi (Ton)	Balmumu Üretimi (Ton)	Bal Verimi (kg/Koloni)
2023	100.399	9.224.881	114.886	4.440	11.03
2022	95.386	8.984.676	118.297	4.488	12.72
2021	89.361	8.733.394	96.344	3.766	11.03
2020	82.845	8.179.418	104.077	3.765	12.72
2019	80.675	8.128.360	109.33	3.971	13.45
2018	81.83	8.108.424	107.92	3.987	13.31
2017	83.21	7.991.072	114.471	4.488	14.32
2016	84.047	7.900.364	105.727	4.44	13.38

2.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin (PAs) Genel Özellikleri

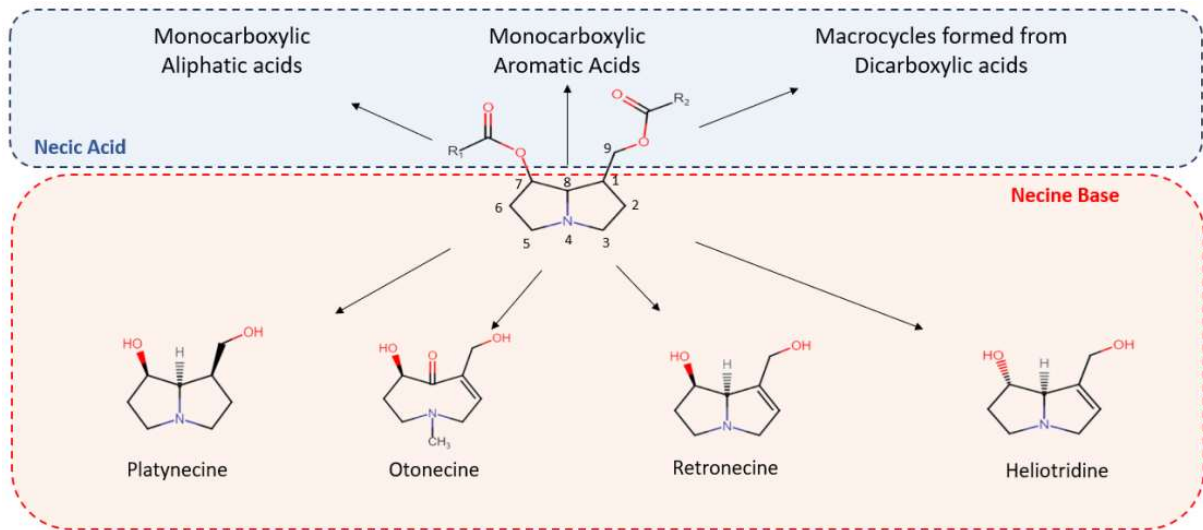
2.2.1. PA'ların Kimyasal Yapısı ve Sınıflandırılması

Binlerce yıldır bitkiler, otoburlara, mikroorganizmalara ve diğer bitkilere karşı bir savunma mekanizması olarak çok çeşitli sekonder metabolitler geliştirmiştir. Bilinen sekonder metabolitlerin yaklaşık 12.000'ini alkaloidler oluşturmaktadır (Brugnerotto vd., 2021). Pirolizidin alkaloidleri bitkilerin köklerinde N-oksitler olarak sentezlenir ve bitkinin geri kalanına taşınır, çiçeklerde, gövdelerde ve yapraklarda birikerek otçullara karşı bitki savunma ajanı olarak görev yapar (Jansons vd., 2022). Bu alkaloidler, ya doymuş ya da doymamış olan bir necine bazı ile yapısal olarak karakterize edilir ve genellikle ester türevlerini oluşturmak için necik asitleri ile bağlantılıdır.

Pirolizidin alkaloidleri (PA), florada (özellikle, *Fabaceae*, *Boraginaceae*, *Asteraceae* ve *Orchidaceae* bitki ailelerinde) bulunan hepatotoksik heterosiklik organik bileşiklerin yaygın bir

sınıfıdır ve genotoksik ve kanserojen etkileri olduğu bilinmektedir (Seremet vd., 2018). *Convolvulaceae*, *Poaceae* ve *Lamiaceae*'da ise en az bulunmaktadırlar. Dünyadaki çiçekli bitkilerin % 3'ünün pirolizidin alkaloidleri içerdiği tahmin edilmektedir (Smith ve Culvenor, 1981). Pirolizidin alkaloidlerinin en az 600 farklı kimyasal yapısı bilinmektedir (Picron vd., 2020). Kimyasal olarak, pirolizidin alkaloidleri (PA), bir 1-hidroksimetil-pirolizidin (necine bazı) ve alifatik mono veya dikarbon asitlerden (necic asitler) oluşan esterlerdir. Hidroksil gruplarından birinin veya her ikisinin esterleşmesine bağlı olarak, pirolizidin alkaloidleri monoesterler veya diesterler şeklinde mevcut olabilir. 6.000'den fazla bitkide 660'den fazla PAs ve PA N-oksit tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık yarısı hepatotoksisite sergilemektedir (Dreger vd., 2009; Radomska-Pandya vd., 2010; Peloso vd., 2023;)..

PAs, yaklaşık 660 tanımlanmış varyantla, N-oksitler de dahil olmak üzere, çeşitli kimyasal yapılar sergiler. Necine bazlarına göre dört türe ayrılırlar (Şekil 1): platynecine, otonecine, retronecine ve heliotridine (Xu vd., 2019; Robertson ve Stevens, 2014; Brugnerotto vd., 2021). Bunlar arasında, 1,2-doymamış PA'lar, potansiyel hepatotoksik, kanserojenik ve genotoksik etkileri nedeniyle özellikle endişe vericidir. Bu etkiler, metabolik aktivasyon sırasında reaktif pirrolik esterlerin oluşumundan kaynaklanır, bu da DNA gibi makromoleküllere bağlanarak hücrel hasara yol açabilir (Xu vd., 2019; Brugnerotto vd., 2021).



Şekil 1. PA'larda Yaygın Olarak Bulunan Necine Bazları (Al-Subaie vd., 2022).

PA'lar, necine ve necic asitlerin esterleridir. Necine, 4 farklı formda bulunabilen (platynecine, otonecine, retronecine ve heliotridine) bir pirolizidin bazlı amino alkoldür (yapısı kırmızı

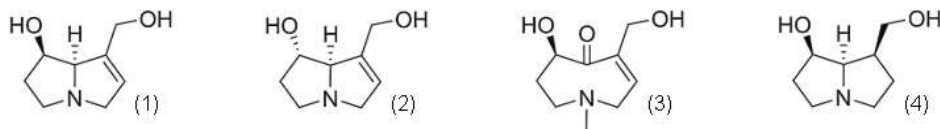
kutuda gösterilmiştir). Necic asit (yapısı üstteki mavi kutuda gösterilmiştir) üç farklı türde bulunur: monokarboksilik (alifatik ve aromatik) ve ayrı veya bir makrosiklik yapı oluşturan dikarboksilik asitler. Necine'in bir veya her iki hidroksil grubu necic asitler tarafından esterleştirilebilir ve C7 oksijenasyonu bulunmayan PA'lar da mevcuttur (Şekil 1).

Pirolizidin alkaloidleri bitkilerde nadiren serbest bazlar halinde bulunurlar ve genellikle esterler halinde bulunurlar. Esterler, yapısal çeşitlilik ile sonuçlanan bir veya daha fazla çeşitli necic asit ile esterleştirilmiş heterosiklik alkoller (ornitin ve arginin'den türetilen necine bazları veya necines) tarafından oluşturulur. Necine'in çekirdeği (Şekil 2) 1,2 pozisyonunda (dehidropirolizidin alkaloidleri) bir çift bağ ile doymuş veya doymamış olarak oluşur (Kalač ve Kaltner, 2021).



Şekil 2. Necine çekirdeklerinin kimyasal yapısı (1) Pirolizidin, (2) Pirolizidin N-oksit, (3) 1,2-dehidropirolizidin, (4) Didehidropirolizidin (Kalač ve Kaltner, 2021)

Necine yapısına göre PA'lar dört gruba ayrılabilir: retronesin-, heliotridin-, otonecine- ve platinesin (Şekil 3). Necic asitler çoğunlukla valin, lösin, izolösin ve treonin L-amino asitlerinden türetilen alifatik karboksilik asitlerdir. Necinelerin esterleşmesi genellikle C-7 ve/veya C-9 (-CH₂OH grubunda) pozisyonlarında gerçekleşir (Kalač ve Kaltner, 2021).



Şekil 3. Necine yapılarına göre PA çeşitleri (1) Retronesin, (2) Heliotridin, (3) Otonecine, (4) Platinesin (Kalač ve Kaltner, 2021)

Doymamış pirolizidin alkaloidleri hepatotoksiktir, yani karaciğere zarar verir (Schoental, 1959). PA'lar ayrıca hepatik veno-tıkalıcı hastalığa ve karaciğer kanserine neden olur. PA'lar

tümörijeniktir (Fu vd., 2002). PA tüketimiyle ilişkili hastalık, pirolizidin alkaloidoz olarak bilinir.

Pirolizidin alkaloidlerinin hem insanlarda hem de hayvanlarda karaciğer üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, hayvanlarla yapılan deneylerde pirolizidin alkaloidlerinin kanserojen olduğu da tespit edilmiştir (BFR, 2011).

2.2.2. PA'ların Kaynakları: Doğal ve Çevresel Etkenler

PA'lar, bitkilerde yaprak, çiçek ve tohum gibi çeşitli organlarda doğal olarak sentezlenir ve genellikle daha az toksik olan, ancak hayvan karaciğerlerinde oldukça reaktif ve toksik metabolitlere dönüşebilen N-oksitler şeklinde bulunur. PA içeren en çok çalışılan bitkiler arasında *Senecio*, *Echium*, *Crotalaria* ve *Eupatorium* türleri yer alır (Xu vd., 2019; Tábuas vd., 2024).

PA seviyelerini etkileyen birçok çevresel faktör bulunmaktadır. Bunlar;

- Toprak Bileşimi: PA'lar, PA üreten bitkilerden toprağa ve çevredeki diğer bitkilere geçebilir, bu da dolaylı kontaminasyon riskini artırır (Joosten ve van Veen, 2011; Peloso ve ark., 2023).
- İklim: İklim koşulları, PA sentezini ve birikimini etkiler. Kuraklık veya otobur saldırıları gibi stres faktörleri, savunma tepkisi olarak PA üretimini artırabilir (Robertson ve Stevens, 2014).
- İnsan Faaliyetleri: PA üreten yabani otların ürünlerle birlikte kazara hasat edilmesi ve kontamine bitkisel ürünlerin kullanımı, insan maruziyetine önemli ölçüde katkıda bulunur (Casado vd., 2022; Tábuas vd., 2024).

PA'lar, bal, çaylar, bitkisel infüzyonlar ve baharatlar gibi birçok gıda ürününde bulunabilir. Özellikle arıcılık ürünleri, arıların PA üreten bitkilerden nektar ve polen toplaması nedeniyle hassastır. Bu durum, Avrupa Birliği'ni, gıda ürünlerindeki PA seviyelerini sınırlamak için düzenlemeler yapmaya sevk etmiştir (Alvarado-Avila ve ark., 2022; Tábuas ve ark., 2024).

2.2.3. PA'ların Toksikolojik Etkileri

PAs, tohumlar, yapraklar ve çiçekler gibi bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunur. Gıda zincirine bal, bitki çayları, baharatlar ve gıda takviyeleri gibi ürünlerle, genellikle PA üreten bitkilerin hasat sırasında kazara karışması sonucu girebilir (Peloso vd., 2023; Wang vd., 2019). Ayrıca toprak transferi veya kasıtlı karıştırma yoluyla da kontaminasyon meydana gelebilir (Casado vd., 2022; Yavarik Alvarado-Avila vd., 2022).

PAs'ın toksisitesi, insan sağlığı için önemli riskler oluşturur; bu riskler arasında hepatik venöz oklüzif hastalık, karaciğer sirozu ve kronik maruziyet sonucunda potansiyel olarak ölümcül sonuçlar yer alır. Birçok ülkede, Avrupa Birliği tarafından belirlenen sınırlar da dahil olmak üzere, gıda ürünlerindeki PA seviyelerini kontrol altına almak için düzenlemeler yapılmıştır (Peloso vd., 2023; Xu vd., 2019).

Son birkaç yılda yapılan çok sayıda çalışmada, gıda, yem, bitkisel ürünler ve bal gibi bitkisel ve hayvansal kökenli ürünlerde endişe verici düzeyde PA kontaminasyonu olduğu vurgulanmıştır (Rizzo vd., 2022). Tahıllar, süt, et, yumurta, bal, polen ve bunların ürünleri gibi yaygın olarak tüketilen bazı gıdalar, eser seviyelerde PA'ları ve N-oksitlerini içerebildiğinden, insanlar için de olası sağlık riskleri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Jansons vd., 2022). İnsanlar, çeşitli ürünlerin tüketimi yoluyla PA'ları istemeden alabilmektedirler. Bu toksik bileşikler, PA üreten bitkilerle kontamine olmuş tahıllar, benzer görünümlü yabani otlarla (örneğin ragwort) sebze hasatları, bitkisel müstahzarlar, çaylar, bal, PA'larla kirlenmiş polen ve süt veya yumurta gibi diğer yiyeceklerle vücuda alınabilmektedir (Brugnerotto vd., 2021; Kowalczyk ve Kwiatek, 2018).

İnsanlar üzerinde PA'ların toksisitesi, bitkisel ilaçlar ve çaylarla birlikte alınan PA'lardan kaynaklanan zehirlenme vaka raporlarında ve yabani otlar içeren PA'lar ile kontamine olmuş tahıl ürünlerinin tüketiminin neden olduğu ölümler ve salgın vakalarında belgelenmiştir. PA'lar akut ve kronik intoksikasyona neden olabilmektedir. İnsanlarda PA'larla akut zehirlenme, karaciğer hasarı ile daha fazla ilişkilidir. Diyet yoluyla düzenli olarak az miktarlarda dehidro PA'ların verildiği durumda, kanser, hipertansiyon ve siroz gibi hastalıkların ortaya çıkma olasılığı yüksektir (Casado vd., 2022; Edgar vd., 2015).

Doymamış pirolizidin alkaloidleri hepatotoksiktir, yani karaciğere zarar verir (Schoental, 1959). PA'lar ayrıca hepatik veno-tıkayıcı hastalığa ve karaciğer kanserine neden olur. PA'lar tümörijeniktir (Fu vd., 2002). Günümüzde aşırı PA alımıyla ilişkili hastalık, pirolizidin alkaloidoz olarak bilinir. Yapılan araştırmalara göre, arı ürünleri insanların pirolizidin alkaloidine maruz kalmasında temel gıda kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Bal, polen, propolis ve arı sütü gibi pirolizidin alkaloidi içeren arı ürünlerinin tüketilmesi başta fetüsler ve yenidoğan bebekler olmak üzere insanlar için sağlık tehlikesi oluşturmaktadır (Ozansoy ve Küplülü, 2017). Pirolizidin alkaloid zehirlenmesi çoğu durumda orta dereceden şiddetli derecelere kadar çıkabilen karaciğer bozukluklarına neden olur. Mide ve bağırsak bozuklukları bu tür zehirlenmelerin ilk semptomlarıdır ve baskın olarak karın ağrısı ve kusma gözlenir. Zehirlenmenin 2 hafta veya 2 yıl ardından ölüm söz konusu olabilir, fakat alkaloid alımını devam etmiyorsa ve karaciğerde oluşan hasar çok ciddi değilse hastalar tamamen iyileşebilmektedir. Alkaloidin zehirleyici etkisi bazen alkaloidin alınmasından sonra görülmeyebilir. Bulantı, keskin mide ağrısı, karın duvarındaki damarların şişmesi sonucunda karında şişme ve ateş gibi erken klinik belirtileri de söz konusu olabilir. Yüksek ateş ve sarılık hastalığı görülebilir. Bazı durumlarda akciğerde etkilenebilir ve akciğer bozuklukları öldürücü olabilir.

Pirolizidin alkaloidlerini içerme olasılığı yüksek gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak ve tüketiciler için potansiyel sağlık riskini azaltmak için, bu kimyasal maddelerin tespitini sağlayan analitik yöntemler gıda güvenliği çalışmaları yapan kurumlarda hızla yürürlüğe konmalıdır. Ülke genelinde arıcılık ürünleri, bitkisel esaslı çaylar ve baharatlar başta olmak üzere, gıda ürünlerinde pirolizidin alkaloidleri miktarını belirlemeye yönelik kapsamlı bir çalışma yapılmalıdır.

Medyada, sosyal medyada, internet satış sitelerinde, kişisel bloglarda ve TV kanallarında pirolizidin alkaloidlerinin yol açabileceği sağlık risklerini dikkate almadan yapılan çok sayıda reklama ve öneriye rastlamak mümkündür. Genel olarak bu tip yayınların çoğu kısmi doğrulara yaslanan aldattıcı, yanıltıcı içeriklerle doludur. Örneğin, bazı ürünlerin tanıtım bilgilerinde çocukların günde bir ya da iki tatlı kaşığı ya da iki tablet tüketilebileceği önerisi yer almaktadır. Bu ürünlerin pirolizidin alkaloidleri içeriğinin ne olduğuna dair hiçbir bilgi yoktur. Bu durumda, günlük tüketim önerilerinin hangi kriterlere göre yapıldığı ve bu ürünlerin çocuklar (ve yetişkinler) için güvenilir olduğunun neye dayandırılarak söylendiği belirsizdir. T.C. Tarım

ve Orman Bakanlığı ile T.C. Sağlık Bakanlığı marketlerden, internet sitelerinden kolayca temin edilen arı ve arı ürünleri gibi bu tip ürünlerin yol açtığı-açacağı sağlık risklerini önlemek için hızla bir düzenleme yapmak ve bu tip ürünlerin satışını kontrol altına almak zorundadır.

2.3. Balda PA Oluşumunun Kaynakları

Balda pirrolizidin alkaloidlerinin (PA) oluşumu, arıların PA içeren bitkilerden topladığı nektar ve polenlere dayanır. PA, bitkiler tarafından doğal savunma mekanizması olarak üretilir ve dünya genelinde yaklaşık 6000 bitki türünde bulunur. Balda PA varlığı, gıda güvenliği açısından önemli bir risk oluşturur çünkü PA'lar genotoksik ve hepatotoksik etkilere sahiptir (Edgar vd., 2002; Kempf vd., 2008).

Başlıca PA kaynağı olan bitki aileleri şunlardır:

- *Boraginaceae* (*Echium spp.*, *Myosotis spp.*): Bu bitkiler, özellikle *Echium plantagineum* gibi türler, PA içeriği bakımından zengindir ve bal üretiminde sıkça PA kaynağı olarak rol oynar. Avustralya'da yapılan araştırmalarda, *Echium plantagineum* kaynaklı ballarda 0.27–0.95 ppm arasında değişen PA seviyeleri saptanmıştır. Bu balların ana alkaloidi ekimidin olarak tespit edilmiştir (Edgar vd., 2002).
- *Asteraceae* (*Senecio spp.*, *Eupatorium spp.*): *Senecio spp.* (ör. *Senecio jacobaea*) ve *Eupatorium spp.* bitkileri, yüksek PA seviyeleri ile dikkat çeker ve arılar tarafından sıklıkla ziyaret edilir. Bu bitkilerden üretilen ballarda PA varlığı yaygın olarak saptanmıştır. *Senecio jacobaea* kaynaklı ballarda PA miktarı 0.3–3.9 ppm arasında değişmiştir. Bu bitkilerin yaygınlığı, balda PA kontaminasyonuna yol açan önemli bir faktördür (Kempf vd., 2008; Kempf vd., 2010).
- *Fabaceae* (*Crotalaria spp.*): Bu bitki ailesi de PA üretimiyle bilinir. Özellikle tropikal bölgelerde bu bitkilere bağlı bal üretiminde PA kontaminasyonu görülebilir. *Crotalaria spp.* gibi bitkiler, özellikle tropikal bölgelerde PA içeren balların üretiminde önemli rol oynar (Roncada et al., 2023).

Arılar genellikle PA üreten bitkilerin çiçeklerinden beslenirler ve bu da balın toksik bileşiklerle kirlenmesine yol açar (Brugnerotto vd., 2021; Kowalczyk ve Kwiatek, 2018). Arılar, temel gıda kaynağı olarak nektar, polen ve diğer reçineli maddeleri floradan toplar ve sonuç olarak PA'yı nihai ürüne taşımış olurlar. Bu nedenle, PA'nın polen, nektar ve özsudaki doğal mevcudiyetinin yanı sıra, bal, arı sütü ve propolis gibi ürünlerde de PA oluşmaktadır (Brugnerotto vd., 2021). Balda PA varlığı, potansiyel bir toksisite riski oluşturduğundan, tüketicinin sağlığını tehlikeye atmaktadır. Genel olarak, bitkilerde tespit edilen PA'nın N-oksit olarak mevcut olduğu, balda ise esas olarak serbest baz olarak bulunduğu bilinmektedir. Arıların sindirim sisteminde N-oksit azalmasının olabileceği varsayılmaktadır (Reinhard vd., 2009).

Balın PA içeriği, bitkilerin yetiştiği bölge ve iklim koşullarına göre değişiklik gösterir. Örneğin, İtalya'da yapılan bir çalışmada Calabria bölgesindeki ballarda PA seviyelerinin diğer bölgelere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, PA içeren bitkilerin bölgedeki yaygınlığı ile ilişkilendirilmiştir (Roncada vd., 2023).

Arıcılık uygulamaları ve arıların kovanlarını yerleştirdiği alanlar da PA varlığı üzerinde doğrudan etkili olabilir. PA içeren bitki türlerinin yoğun olduğu alanlarda üretilen ballar, genellikle daha yüksek PA seviyelerine sahiptir. Arıların tercih ettiği PA üreten bitkiler arasında *Echium* spp., *Senecio* spp., ve *Eupatorium* spp. yer alır (Dübecke vd., 2011; Kempf vd., 2010).

PA, bitkilerden arılar tarafından toplanan polen ve nektar aracılığıyla bala geçer. PA içeren bitkilerin çiçekleri, özellikle PA seviyelerinin yüksek olduğu bölümler olarak dikkat çeker (Edgar vd., 2002). Ayrıca, PA içeren bitkilerin yetiştiği bölgelerdeki toprak ve su da dolaylı olarak kontaminasyona neden olabilir. Bitkiler, topraktaki PA bileşiklerini alarak bunları nektar ve polenlerine aktarabilir (Roncada vd., 2023).

PA oluşumu, arıların beslenme alışkanlıkları ve çevresel koşullara bağlıdır. PA içeren bitkilerden uzak bölgelerde arıcılık yapılması, balın PA kontaminasyonunu azaltmak için alınabilecek önlemlerden biridir.

Bal örneklerinde PA tespiti için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Çalışmalar, farklı coğrafi ve botanik kökenlere sahip balların

PA içeriğinin değişken olduğunu göstermiştir. Örneğin, İtalya'daki ballarda yapılan bir araştırmada, PA içeriği 0.9–33.1 µg/kg arasında bulunmuş ve en yaygın PA'nın ekimidin olduğu saptanmıştır (Roncada et al., 2023).

Balda PA varlığına dair yapılan önemli çalışmalarda, Almanya'daki perakende balların %9'unda PA bulunmuştur ve bu ballardaki PA miktarları 0.019–0.120 µg/g arasında değişmiştir (Kempf vd., 2008).

Avustralya'daki *Echium plantagineum* kaynaklı ballarda ekimidin ve türevleri tespit edilmiştir. Bu ballardaki PA seviyeleri 0.27–0.95 ppm arasında değişmiştir (Edgar et al., 2002).

Bazı PA türleri, karaciğerde biyotransformasyonla aktif toksik metabolitlere dönüşür ve bu da karaciğer hasarı ve kanser riskini artırır. EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi), PA'ların gıda yoluyla alınmasına ilişkin değerlendirmelerde bulunmuş, ancak ballar için henüz bir yasal sınır belirlenmemiştir (Kempf vd., 2010; Roncada vd., 2023).

Ülkemizde pirolizidin alkaloidler ile ilgili çalışmaların yok denecek kadar az olduğu yapılan araştırmalarda görülmüştür. Bu araştırmaların çoğunun da bitkisel çaylar ve baharatlar ile ilgili olduğu görülmektedir. Yüksek lisans ve doktora çalışmaları kapsamında 2009-2022 yılları arasında YÖK tez veri tabanında Eczacılık ve Farmakoloji alanda 4 çalışma yapıldığı ve bu çalışmaların hepsinin bitkisel çaylarda pirolizidin alkaloidlerinin tayini ve toksik özelliklerinin belirlenmesi üzerine olduğu saptanmıştır (Tanrıöver, 2022; Bulut, 2021; Gürbüz, 2021; Parlak, 2009). Yapılan incelemelerde, arı ürünlerinin (bal, polen, arı sütü, propolis, bal ve polen içeren gıda takviyeleri ve karışımları vb.) pirolizidin alkaloid içerikleri ve konsantrasyonları ile ilgili herhangi bir detaylı çalışma bulunmamaktadır. Bugüne kadar, ülkemizin zengin bal çeşitliliğine rağmen, üretilen çiçek, monoflora ve salgı ballarında PA içeriğini ve konsantrasyonunu belirlemeye, bölgesel ve çeşit farklılıklarına göre değerlendirildiği herhangi bir kapsamlı çalışma da bulunmamaktadır.

Türkiye ballarının da içerisinde yer aldığı pirolizidin alkaloidler ile ilgili ilk ve tek çalışma Barel vd. tarafından 2017 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada; 2013 ve 2015 yıllarında toplanan (Tablo 4) 81 bal örneğinde (İsrail-n=33, Türkiye-n=28, Kıbrıs--n=7, Tanzanya, n=11, Manuka=2) seneciyonin-, likopsamin-, ekimidin- ve heliotrin tipi PA'ları kapsayan serbest

bazlar ve N-oksitleri içeren 70 farklı PA'nın konsantrasyonu, LC-MS/MS kullanılarak belirlenmiştir. Ortalama PA konsantrasyonu Türk balları için 5,5 µg/kg (n=28) olarak belirlenmiştir (Barel vd., 2017). Bu çalışmada Türkiye'den 12 farklı ilden 28 adet bal numunesi alınmıştır. Bu ballardan 1 adedi salgı balı (çam balı), 27 adedi çiçek balıdır (Çiçek, Narenciye, Hayıt balı, Kocayemiş, Ayçiçeği, Kestane, İhlamur, Yayla, Çam, Kekik, Ormangülü). Bu çalışmada elde edilen bulgular "45th Apimondia Congress, İstanbul" da abstrakt olarak sunulmuş olup analizi yapılan bal örneklerine (Türkiye, n=28) ait sonuçlar detaylı bir şekilde bulunmamaktadır.

Ülkemizde daha çok ballarda polen içerikleri incelenmiş ve bu incelemeler sonucu pirolizidin alkaloid içeren bitki taksonları belirlenmiştir. Anzer balının polen analizinin yapıldığı bir çalışmada (Sorkun ve Doğan, 1995) ise pirolizidin alkaloid içeren Myosotis taksonuna ait polenlerin bulunduğu belirlenmiş (Sorkun ve Doğan, 1995; Edgar vd., 2002), ancak PA bileşenlerini tanımlamaya ve konsantrasyonunu belirlemeye yönelik herhangi bir analiz gerçekleştirilmemiştir.

Türkiye ballarının da içerisinde yer aldığı pirolizidin alkaloidler ile ilgili ilk ve tek çalışma Barel vd. tarafından 2017 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada; 2013 ve 2015 yıllarında toplanan (Tablo 4) 81 bal örneğinde (İsrail-n=33, Türkiye-n=28, Kıbrıs-n=7, Tanzanya, n=11, Manuka= 2) seneciyonin-, likopsamin-, ekimidin- ve heliotrin tipi PA'ları kapsayan ve serbest bazlar ve N-oksitleri içeren 70 farklı PA'nın konsantrasyonu, LC-MS/MS kullanılarak belirlenmiştir. Ortalama PA konsantrasyonu İsrail balları için 45.7 µg/kg (n=33), Türk balları için 5.5 µg/kg (n=28), Kıbrıs için 1118.3 µg/kg (n=7), Tanzanya için 13.7 µg/kg (n=11) ve Manuka balı için 15 µg/kg (n=2) olarak belirlenmiştir. En yüksek PA konsantrasyonu (2147 µg/kg) Kıbrıs balında bulunmuştur. Tüm ballarda PA'ların serbest baz formlarının baskın olduğu; PA-N-oksitler ortalama olarak toplam PA içeriğine sadece %3 katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Tanzanya, Türk ve Manuka (Yeni Zelanda) balında likopsamin tipi PA'ların daha baskın olmasına rağmen, heliotrin tipi PA'lar çoğu ülkede ve coğrafi bölgede bol miktarda bulunduğu görülmüştür. Türk balının daha fazla ekimidin tipi PA içerdiği, senecionine tipi PA'ların ise çoğunlukla İsrail'in güney kesiminden gelen ballarda ve daha azının ise İsrail'in orta ve kuzey bölgelerinden gelen ballarda bulunduğu belirlenmiştir (Barel vd., 2017).

Tablo 4. Türkiye ve Kıbrıs’tan Alınan Bal Örneklerinin Alındığı Bölgeler

Kod	Alındığı Ülke	Bölge	Balın Orijini	Yılı
Cyprus-1	KKTC	Topçuköy - İskele	Çiçek	2014
Cyprus-2	KKTC	Köprü köyü - Gazimağusa	Kekik	2014
Cy-3	KKTC	Taşkent - Lefkoşa	Orman	2014
Cy-4	KKTC	Vadili - Gazimağusa	Çiçek	2014
Cy-5	KKTC	Kantara Köyü-İskele	Çiçek	2014
Cy-6	KKTC	Vadili- Gazimağusa	Narenciye	2014
Cy-7	GKRY	Odou - Larnaka	Çiçek	2014
T-1	Türkiye	Adana	Narenciye	2013
T-2	Türkiye	Aydın	Hayıt balı (Viteks)	2013
T-3	Türkiye	Bursa	Kocayemiş	2014
T-4	Türkiye	Kırklareli	Çiçek	2014
T-5	Türkiye	Tekirdağ	Ayçiçeği	2014
T-6	Türkiye	Yalova	Kestane	2013
T-7	Türkiye	Karacabey - Bursa	İhlamur	2012
T-8	Türkiye	Bilecik-Adana-Ankara	Yayla	2014
T-9	Türkiye	Muğla	Çam	2014
T-10	Türkiye	Kağızman - Kars	Kekik (Thymus capitatus)	2013
T-11	Türkiye	Zonguldak	Ormangülü (Deli bal)	2014

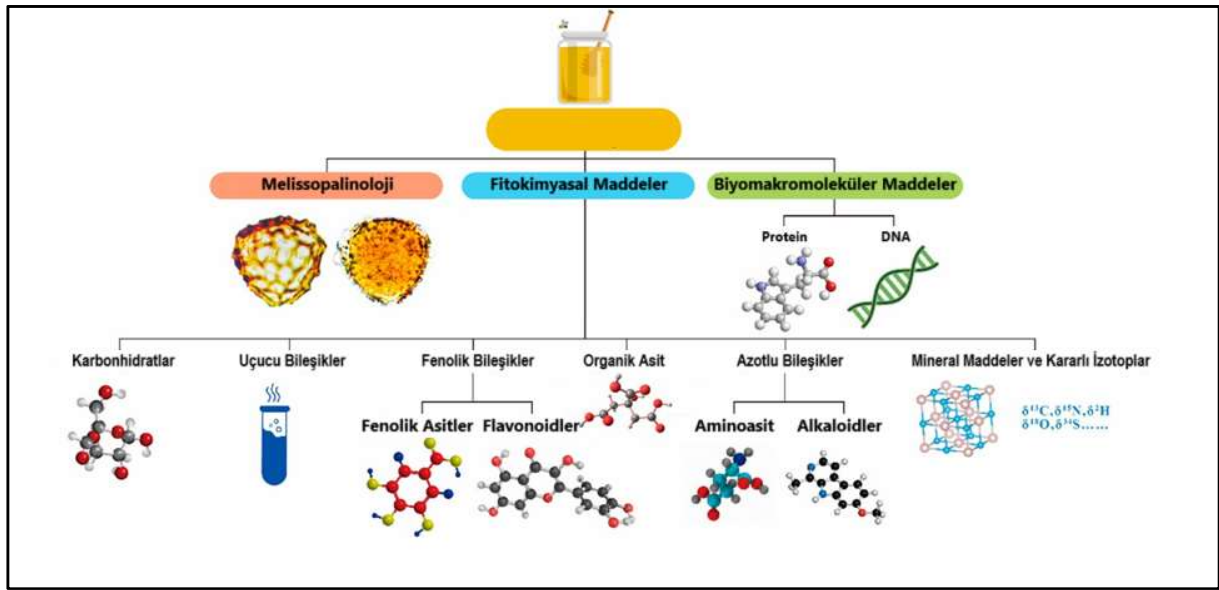
* Bu bilgiler Dr. Shimon Barel (Kimron Veterinary Institute, Israel) ve Prof.Dr. Ahmet Onur Girişgin (Uludağ Üniversitesi) ile yapılan görüşmeler sonucu alınmıştır (Barel vd., 2017).

Tablo 4’ün incelenmesiyle de görülebileceği gibi; bu çalışmada Türkiye’den 12 farklı ilden 28 adet bal numunesi alınmıştır. Bu ballardan 1 adedi salgı balı (çam balı) 27 adedi çiçek balıdır (Çiçek, Narenciye, Hayıt balı, Kocayemiş, Ayçiçeği, Kestane, İhlamur, Yayla, Çam, Kekik, Ormangülü).

Yapılan bu tez çalışmasında ise; Barel vd., (2017)’dan farklı olarak, bal üretiminin yaygın olarak yapıldığı Çukurova bölgesinden çiçek balı (5 adet) temin edilmiştir. Bal numunelerinde pirolizidin alkaloid bileşenleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca bu bal numunelerinde Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)’nde yer alan ballara ait diğer bazı özellikler (nem, şeker profili, suda çözünmeyen madde, serbest asitlik, elektrik iletkenliği, diastaz sayısı, HMF, delta C13 değeri, protein, prolin, naftalin) belirlenmiştir.

2.4. PA'ların Balda Analizi İçin Kullanılan Yöntemler

Bal, benzersiz tadı ve zengin besin ile tıbbi değerleri nedeniyle dünya genelinde tüketiciler tarafından yüksek talep gören bir ürün haline gelmiştir. Ancak, balın kaynağını belirlemek ve özgünlüğünü tespit etmek hâlâ zorlu bir süreçtir (Şekil 4). Balın bileşimleri, bitki kaynakları, hasat mevsimi, depolama süresi ve olgunluk durumu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Balın ayırt edilmesi, çoklu parametrelerin birleştirilmesi ve bunların çok değişkenli istatistiksel analizler ile desteklenmesiyle gerçekleştirilebilir (Wang vd., 2022).



Şekil 4. Balda Karakteristik Belirteçler: Kalite ve Özgünlük Göstergeleri (Wang vd., 2022).

Arı poleni gibi gıda matrislerindeki PA'ların tanımlanması ve miktar tayini, çoğunlukla kütle spektrometrisi (HPLC-MS) ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmektedir (De Jesus Inacio vd., 2020). Bunun yanında, UV-VIS spektrometre, ince tabaka kromatografisi, nükleer manyetik rezonans, GC-MS, LC-MS ve immünoloji tabanlı yöntemlerin yanı sıra, kapiler elektroforez ve enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) gibi PA'ların belirlenmesi için farklı yöntemler de mevcuttur (Jansons vd., 2022).

2.4.1. Geleneksel Analitik Yöntemler

PA'lar, bal gibi doğal gıdalarda bulunan toksik bileşiklerdir ve analiz edilmeleri hem halk sağlığı hem de gıda güvenliği açısından önemlidir. Bu analizlerde birçok yöntem kullanılmaktadır:

a) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC genellikle PA tespiti için kullanılır. Bu yöntemde PA bileşikleri, kromatografik kolondan ayrıştırılarak dedeksiyon yapılır. Ancak duyarlılık düzeyi ve analitik hassasiyet için genellikle kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiştir (Kowalczyk ve Kwiatek, 2022).

b) Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS)

GC-MS, PA'ların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır ancak genellikle PA bileşiklerinin çok iyi bir ekstraksiyonu ve ön işlem adımları gerektirir. Hızlı ve etkin bir metod olmasına rağmen bazı PA yapılarına duyarlılığı düşüktür (Beuerle ve ark., 2010).

c) Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyonu, PA'ları saflaştırmak ve matriks etkilerini azaltmak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. SPE, analitik hassasiyeti artırır ve genellikle HPLC-MS veya LC-MS/MS ile kombine edilir (Tábuas ve ark., 2024).

2.4.2. SPE-LC-MS/MS Yöntemi

SPE-LC-MS/MS yöntemi, PA'ların balda analizinde en yaygın ve etkin yöntemlerden biridir. Bu yöntemin öne çıkan özellikleri şunlardır:

a) Hazırlık Aşaması

Numune hazırlığında, bal matriksinden PA'ları ayırmak için öncelikle sülfürik asit kullanılarak ekstraksiyon yapılır. Daha sonra katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saflaştırılır. Bu aşama, matriks etkilerini en aza indirerek analizin doğruluğunu artırır (Kowalczyk ve Kwiatek, 2022).

b) Kromatografik Ayırım

HPLC veya LC, PA bileşiklerini kolondan ayırarak deteksiyona hazırlar. Bu aşamada, genellikle ters faz (C18) kolonlar kullanılır.

c) Kütle Spektrometrisi ile Analiz

Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS), hedef PA bileşiklerini hem nitel hem de nicel olarak belirlemek için kullanılır. Elektrospray iyonizasyon (ESI) yöntemi ile hassas ve tekrarlanabilir analiz sağlanır. Yöntem, Avrupa Birliği'nin gıda analiz standardına uygunluk sağlar (Rizzo ve ark., 2023).

d) Duyarlılık ve Ölçüm Sınırları

SPE-LC-MS/MS, mikrogram seviyesinde duyarlılığı ve düşük algılama sınırları (LOD/LOQ) ile dikkat çeker. Bu özellikler, PA'ların tüm varyantlarını tespit etmeyi mümkün kılar (Tábuas ve ark., 2024).

SPE-LC-MS/MS, PA'ların balda analizi için standart bir yöntem olarak kabul edilir. Bu yöntem, matriks etkilerini azaltır, duyarlılığı artırır ve regülatif standartlara uygun çözüm sunar.

2.5. Ulusal ve Uluslararası Yasal Düzenlemeler

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), çayları ve bitki çaylarını, PA'lar ile yüksek seviyede kontamine olması muhtemel ana gıda maddeleri olarak tanımlamış ve bunu halk sağlığını tehdit eden bir unsur olarak açıklamıştır (EFSA 2016, 2017). Ancak, PA konusunda yasal olarak, bilim dünyası ve yasal otoriler tarafından tehlikede olduğu kabul edilen ve dikkat çeken ilk gıda maddesi baldır (Picron vd., 2020). Bal, PA'ların ve bunların N-oksitlerinin potansiyel bir diyet kaynağı olarak tanımlanmıştır. Literatür verilerine göre, incelenen bal örneklerinin kontaminasyon yüzdesi %17 ile %91 arasında değişmektedir (Brugnerotto vd., 2021).

EFSA tarafından 2007 yılında, hayvan yemlerinde PA'ların bulunma riskinin değerlendirildiği bir rapor yayınlanmıştır. Bu raporda, yemden çiftlik hayvanlarının yenilebilir dokularına PA transferi belirlenmiş ve bu alkaloidlerin inek ve koyun sütüne (düşük oranda da olsa) ve ayrıca

yumurtalara geçtiği doğrulanmıştır. Öte yandan balın da PA kalıntılarının bulunduğu bir gıda maddesi olduğu tespit edilmiştir (EFSA, 2011).

2011 yılına kadar, günde kg canlı ağırlık başına 0.007 µg'dan daha az 1,2-doymamış PA alımı (60 kg olan yetişkinler için günde 0.42 µg 1,2-doymamış PA'ya karşılık gelir) tavsiye edilmiştir (Brugnerotto vd., 2021). 2011 yılında, Alman Bal Derneği tarafından başlatılan analizlerden elde edilen geniş bir veri çeşitliliği, Alman Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR) tarafından değerlendirilmiştir. Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR), mevcut verilere dayanarak, gıdalardaki ve özellikle baldaki pirolizidin alkaloidlerinin oluşturduğu sağlık risklerini, hem akut hem de kronik toksik etkilerini hesaba katarak gerçekleştirmiştir. Mevcut tüm verileri göz önünde bulundurarak, BfR, tüketicinin farklı gıdalarda bulunan genotoksik ve kanserojen özelliklere sahip 1,2-doymamış pirolizidin alkaloidlerine genel maruziyetinin mümkün olduğunca düşük tutulması gerektiği sonucuna varmıştır. Vücut ağırlığına göre günlük 0.007 µg/kg doymamış pirolizidin alkaloid alımı sınırının aşılması gerektiğini belirtmiştir (BfR, 2011).

PA'lar genotoksik ve kanserojen maddeler olduğundan, etkili bir yanıt eşiği belirlenemeyeceği açıklanmış ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), tolere edilebilir günlük alımın belirlenemeyeceği sonucuna varmıştır. Maruz kalma marjı yaklaşımına dayalı olarak, EFSA, 0.024 µg/kg vücut ağırlığı/gün'den (örneğin, 70 kg bir yetişkin için günde 1.66 µg PA) fazla toplam PA alımının risk yönetiminin harekete geçmesi için bir eşik olarak görülebileceğini bildirmiştir (EFSA, 2017).

8 Kasım 2011'de, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) Gıda Zincirindeki Bulaşanlara İlişkin Bilimsel Paneli (The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain-CONTAM) ile gıdalarda ve yemlerde pirolizidin alkaloidlerinin varlığı ile ilgili halk sağlığı riskleri hakkında bilimsel bir görüş yayınlamıştır. CONTAM Paneli, 1,2-doymamış pirolizidin alkaloidlerinin insanlarda genotoksik karsinogenler olarak hareket edebileceği sonucuna varmıştır. CONTAM Paneli, yüksek oranda bal tüketicisi olan küçük çocuklar ve yeni yeni yürüyen çocuklar için olası bir sağlık sorunu olduğu sonucuna varmıştır. Ayrıca, CONTAM Panelinin veri eksikliği nedeniyle miktarını belirleyemediği pirolizidin alkaloidlerine diyetle maruz kalmanın başka olası kaynakları da vardır. Herhangi bir oluşum verisi olmamasına rağmen, polen, çay, bitkisel infüzyonlar ve bitkisel diyet takviyelerinden elde edilen pirolizidin

alkaloidlerine maruz kalmanın, tüketicide potansiyel olarak hem akut hem de kronik etki riski oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

14 Aralık 2020 tarihli ve L 420 sayılı AB Resmi Gazetesi'nde yayımlanan (AB) 2020/2040 sayılı Komisyon Tüzüğü ile bazı gıdalarda maksimum pirolizidin alkaloid (PA) limitleri belirlenmiştir. Bu kapsamda (EC) 1881/2006/AT sayılı tüzüğün ise değiştirildiği bildirilmektedir. Söz konusu tüzük kapsamında bitkisel infüzyonlar, bitkisel içerikli çaylar, gıda takviyeleri, hodan otu yaprakları, yaban kerevizi, güveyi otu ve kimyon tohumu vb. ürünlerin PA limitleri belirlenmiş ve ülkemiz ihracatında önem arz eden bal, arı ürünleri ve karışımları (polen, polen ürünleri ve polen katkılı gıda takviyeleri) için PA limitleri 500 µg/kg olarak ifade edilmiştir (EFSA, 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında analiz edilen bal numuneleri, Çukurova Bölgesi'ndeki farklı lokasyonlardan temin edilmiş olup, doğrudan üreticilerden elde edilen beş farklı çiçek balı örneğini içermektedir. Numunelerin temini sırasında bölgenin flora yapısı göz önünde bulundurulmuş ve örnekler, farklı üreticilerden çeşitliliği temsil edecek şekilde seçilmiştir.

Bal numunelerinin taşınması ve depolanması süreçleri, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen standartlara uygun olarak titizlikle gerçekleştirilmiştir. Numunelerin analiz öncesi ve analiz sürecindeki tüm işlemlerinde hijyenik koşulların sağlanmasına özellikle dikkat edilmiştir. Bu kapsamda, numuneler temiz ve kuru bir ortamda saklanmış, herhangi bir yabancı kokunun numunelerin organoleptik özelliklerini etkilememesi için olası koku kaynaklarından uzak tutulmuştur. Ayrıca, bal örneklerinin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin korunması amacıyla doğrudan güneş ışığına maruz kalmaması sağlanmış ve saklama sıcaklığının 25 °C'yi aşmaması için sürekli kontrol altında tutulmuştur.

Bu şekilde, analiz sürecinde örneklerin doğal yapısında herhangi bir bozulma veya dış etkenlere bağlı değişiklik meydana gelmesinin önüne geçilmiştir ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi için optimum koşullar sağlanmıştır.

3.2. Balların Bazı Özelliklerine Ait Analizler ve Kullanılan Yöntemler

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7) kapsamında yer alan ürünlerden bu yönetmelikte belirtilen kurallara uygun olarak numune alınmıştır. Daha sonra, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7)'ne göre proje kapsamında toplanan balların diğer bazı özellikleri (nem miktarı, sakkaroz ve fruktoz-glukoz oranı, elektrik iletkenliği, diastaz sayısı, hidroksimetilfurfural (HMF) miktarı, C4 şeker oranı) analiz edilmiştir.

3.2.1. Balda Nem Tayini

Bu çalışmada, bal örneklerinin nem miktarının belirlenmesi amacıyla TS 13365 Bal Standardı ve resmi AOAC yöntemi referans alınmış ve analizler refraktometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nem tayin sürecinde aşağıda belirtilen aşamalar takip edilmiştir:

Öncelikle, refraktometre cihazının doğru ölçüm yapabilmesi için analiz öncesinde kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon için distile su veya kalibrasyon standardı kullanılmış ve cihazın referans değeri doğrulanmıştır. Kalibrasyonun ardından, analiz için her bir bal örneğinden 1-2 gram alınmış ve ölçüm sırasında sıcaklık değişimlerinin önüne geçilmesi amacıyla numuneler 20-25 °C sıcaklık aralığında tutulmuştur. Numunelerin ışıık, koku ve nem gibi dış etkenlerden korunması için örnekler, temiz ve kuru cam kaplarda muhafaza edilmiş, doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmamıştır.

Nem tayini aşamasında, hazırlanan bal numuneleri refraktometre gözüne dikkatlice yerleştirilmiş ve cihazın kapağı kapatılarak ışığın homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Cihaz ekranında ölçüm değeri kaydedilmiş ve elde edilen refraktif indeks değeri kullanılarak balın nem yüzdesi hesaplanmıştır. TS 13365 standardına göre, bal örneklerinin nem içeriği en fazla %20 olmalıdır.

Tüm analiz sonuçları kaydedilmiş ve her bir örnek için üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçüm değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak her örneğin nihai nem miktarı hesaplanmıştır. Bu süreç, elde edilen verilerin güvenilirliğini sağlamak ve ölçüm hatalarının önüne geçmek amacıyla uygulanmıştır. Sonuç olarak, bal numunelerinin nem değerleri TS 13365'te belirtilen sınır değerler ile karşılaştırılmış ve kalite kriterleri doğrultusunda değerlendirilmiştir (TSE, 2008a).

3.2.2. Balda Şeker Bileşenleri Tayini

Bu çalışmada bal örneklerindeki şeker profili ve miktarını belirlemek amacıyla Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. Analiz, şeker bileşenlerinin ayrılması ve kantitatif tayini için optimize edilmiş koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Analiz Koşulları aşağıda verilmiştir:

Cihaz ve Donanım:

- **Cihaz** : HPLC Shimadzu Prominence serisi (Kyoto, Japonya) (Şekil 5)
- **Dedektör** : RID (Refraktif İndeks Dedektörü) 280 nm dalga boyunda
- **Kolon** : Inertsil NH₂ kolon (4.6 x 250 mm, 5.0 µm, Inertsil NH₂ GL Sciences, Japonya)
- **Enjektör** : Otomatik enjektör (enjeksiyon hacmi: 20 µL)



Şekil 5. Shimadzu Prominence HPLC Cihazı

Mobil Faz:

- **A Fazı** : Ultra saf su (Merck Milipore Direct Q-3) ve Asetonitril (Merck 10030) karışımı
- **Karışım Oranı** : %80 Asetonitril- %20 Ultra saf su (izokratik akış modu)

Akış Hızı : 1.3 mL/dk

Kolon Sıcaklığı : 30 °C

Analiz Süresi : 20 dakika

Kalibrasyon Standartları ve Kalibrasyon Eğrisi:

Standart çözeltiler aşağıdaki bileşikler kullanılarak %99 saflıkta hazırlanmıştır:

- **Glikoz:** Sigma Aldrich G7021
- **Fruktoz:** Sigma Aldrich F0127
- **Sakkaroz:** Sigma Aldrich 84097
- **Maltoz:** Sigma Aldrich 63418

Standart çözeltiler, Glikoz ve Fruktoz için 1.0-3.0 g/100 g; Sakkaroz ve Maltoz için 0.3-0.6 g/100 g konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Elde edilen veriler ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve regresyon sabiti ile denklem Tablo 5'te sunulmuştur. Kalibrasyon görüntüleri detaylı olarak Ek 48-51'de verilmiştir.

Tablo 5. Şeker Bileşenlerinin Kalibrasyon Denklemi ve Regrasyon Katsayısı

Şeker Bileşenleri	Kalibrasyon Denklemi	R2
Fruktoz	$y=1.67753e-006x$	0.9999
Glikoz	$y=1.90489e-006x$	0.9994
Sakkaroz	$y=1.61882e-006x$	0.9938
Maltoz	$y=2.26846e-006x$	0.9990

Örnek Hazırlığı:

- TS 13359 metoduna göre, her bir bal örneğinden 5 gram alınarak temiz bir cam behere aktarılmıştır.
- Üzerine 40 mL ultra saf su eklenmiş ve çözelti, iyice karıştırılmıştır.
- Elde edilen çözelti, içerisine 25 mL metanol eklenmiş olan 100 mL’lik balon joje içerisine aktarılmış ve çizgiye kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır.
- Hazırlanan çözelti, homojenize edildikten sonra 0.45 µm’lik naylon enjektör filtreden geçirilmiş ve HPLC örnek şişelerine (vial) aktarılmıştır.
- Enjekte edilen örnek miktarı 20 µL olarak belirlenmiş ve analiz HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir.

Analiz öncesinde tüm çözeltilerin oda sıcaklığına getirilmesine özen gösterilmiştir.

Analiz Prosedürü

- HPLC sisteminin başlangıç kararlılığı sağlanana kadar mobil faz ile yaklaşık 10 dakika süreyle sistem dengeye getirilmiştir.
- Standart çözeltiler sırasıyla cihaza enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.
- Örnek çözeltileri, her biri üç tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir.

Veri Analizi

- Hedef bileşiklerin pik alanları entegre edilerek, standart eğrisi kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.
- Elde edilen analiz sonuçları, şeker bileşenlerinin miktarını (g/100 g) vermiştir.

Kalite Kontrol

- Her analiz serisinde, bir kontrol numunesi ile ölçümlerin doğruluğu kontrol edilmiştir.
- Pik simetrisi ve çözünürlük kontrol edilmiştir. Analizlerin güvenilir kabul edilebilmesi için pik simetri değeri ≤ 1.5 ve çözünürlük değeri ≥ 2 olmasına dikkat edilmiştir.

Bu prosedür ile bal numunelerinin şeker bileşenleri belirlenmiş ve TS 13365 standartlarına uygunlukları değerlendirilmiştir.

3.2.3. Balda Suda Çözünmeyen Madde Tayini

Bu çalışmada, bal örneklerinde suda çözünmeyen katı madde miktarının tayini TS 3036 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için yaklaşık 20 g bal örneği hassas terazide tartılarak 250 mL'lik kuru bir behere alınmış ve üzerine 40-50 mL 80 °C'de ısıtılmış distile su eklenerek homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti, önceden kurutulmuş ve darası alınmış cam süzgeç kroze (gözenek boyutu 1.5-40 μ m) yardımıyla süzölmüştür. Kroze üzerinde kalan katı maddeler, 80 °C'de ısıtılmış su ile 5-6 kez yıkanarak tüm çözünür bileşenlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kroze, 135 $\pm$ 2 °C'deki kurutma fırınında en az 1 saat süreyle kurutulmuş ve ardından desikatörde soğutularak analitik terazide tekrar tartılmıştır. Kroze ve katı madde toplam ağırlığından krozenin darası çıkarılarak katı madde miktarı belirlenmiştir.

Suda çözünmeyen madde miktarı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%KM = \frac{M \times 100}{M_0}$$

Burada:

- **% KM** : Suda çözünmeyen katı madde yüzdesi
- **M** : Bulunan katı madde miktarı (g)
- **M₀** : Deney numunesi miktarı (g)

Elde edilen değerler, balın saflık ve kalite değerlendirmesi için analiz edilmiş ve TS 3036 standardında belirtilen sınır değerlerle karşılaştırılmıştır. Standarda göre, suda çözünmeyen katı madde miktarı iek balında en fazla %0.1, salęı balında ise %0.5 olmalıdır (TSE, 2010).

3.2.4. Balda pH tayini

Bu çalışmada bal örneklerinin pH analizi, TS 13360 ve Uluslararası Bal Komisyonu (IHC) yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde pH metre, pH 4.00 ve pH 7.00 tampon zelteleri kullanılarak kalibre edilmiştir. rnek hazırlığı için 10 g bal rneği, 75 mL distile su ile 100 mL'lik bir behere alınarak homojenize edilmiştir.

Homojen çözeltinin pH ölçümü, cam elektrotlu pH metre ile gerçekleştirilmiş ve kararlı bir değer elde edilene kadar ölçüm yapılmıştır. Elde edilen pH değeri kaydedilmiş ve balın kalite değerlendirmesi için analiz edilmiştir. Balın pH değeri genellikle 3.2-4.5 arasında olup, düşük pH değerleri balın mikrobiyal dayanıklılığını artırmaktadır. Standart değerlerden sapmalar, balın saflığı ve doğal yapısında bozulma belirtisi olarak değerlendirilmiştir. (Bogdanov, 2009).

3.2.5. Balda Serbest Asitlik Tayini

Bu çalışmada, bal örneklerindeki serbest asitlik miktarının belirlenmesi TS 13360 (Mart 2008) standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 10 g bal rneği 250 mL'lik bir behere alınarak üzerine 100 mL distile su eklenmiş ve homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırılmıştır. Titrasyon işlemi, 0.1 N sodyum hidroksit (NaOH) zeltisi kullanılarak pH 8.3'e ulaşana kadar yapılmıştır.

Serbest asitlik miktarı, titrasyonda harcanan NaOH hacmi, çözeltinin normalitesi ve bal rneği miktarı kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Asitlik (meq/kg)} = \frac{V \times N \times 1000}{M}$$

Burada:

- **V** : Titrasyonda kullanılan NaOH hacmi (mL)
- **N** : NaOH zeltisinin normalitesi (0.1 N)
- **M** : Bal rneği miktarı (g)

Standarta göre serbest asitlik değeri 50 meq/kg'dan düşük olmalıdır. Yüksek asitlik değerleri, balın fermantasyona uğradığının veya bozulduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (TSE, 2008c).

3.2.6. Balda Elektrik İletkenliği Tayini

Bu çalışmada bal örneklerinin elektrik iletkenlik tayini, TS 13360 (Mart 2008) standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 20 g bal örneği 250 mL'lik bir behere alınmış ve üzerine 100 mL distile su eklenerek homojen bir çözelti elde edilene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözelti, ölçüm öncesinde 20 ± 0.5 °C sıcaklığa getirilmiştir.

Kalibre edilmiş iletkenlik ölçer, çözeltiye daldırılarak kararlı bir değer elde edilene kadar ölçüm yapılmış ve sonuç milisiemens (mS) cinsinden kaydedilmiştir.

TS 13360 standardına göre çiçek balının elektrik iletkenlik değeri en fazla 0.8 mS/cm olmalıdır. Salgı balında ise bu değer genellikle 0.8 mS/cm'nin üzerinde ölçülmektedir. Yüksek iletkenlik değerleri, mineral madde içeriğinin yüksek olduğunu ve balın salgı balı olma ihtimalini gösterirken, standart dışı değerler safsızlık ya da bozulma belirtisi olarak değerlendirilmiştir (TSE, 2008d).

3.2.7. Balda Diastaz Sayısı Tayini

Bu çalışmada bal örneklerindeki diastaz aktivitesinin belirlenmesi için TS 13360 (Mart 2008) standardına uygun bir prosedür izlenmiştir. Analiz için yaklaşık 10 g bal örneği hassas terazide tartılarak 100 mL'lik bir behere alınmıştır. Bal örneği, 30-45 mL saf su ile çözündürülerek homojen bir çözelti elde edilmiştir. Daha sonra bu çözelti, 100 mL'lik ölçülü balon jöjeye aktarılmış ve işaret çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. Çözelti iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

Hazırlanan çözelti, deney tüplerine eşit miktarda dağıtılmış ve tüpler 38 °C sıcaklıkta sabit tutulan su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüpler, enzimin substrat üzerindeki etkisinin gerçekleşmesi için 60 dakika süreyle su banyosunda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler hızla su banyosundan çıkarılarak, enzimatik reaksiyonun durdurulması amacıyla daha önce hazırlanmış olan buzlu su içerisine daldırılmış ve hızla soğutulmuştur.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra, her bir tüpe bir damla %0.1 N iyot çözeltisi eklenmiş ve çözelti karıştırılmıştır. İyot çözeltisi, reaksiyon ortamındaki nişasta miktarını belirlemek için renk değişimi oluşturan bir göstergedir. Mavi renk oluşumu, tüpte nişastanın tam olarak parçalanmadığını ve hala bulunduğunu gösterir. Bu nedenle, ilk mavi renk oluşumu gözlenen tüp, reaksiyon sınırını belirlemek için "limit tüp" olarak kabul edilmiştir.

Mavi renk gözlenmeden önceki tüpe karşılık gelen diastaz aktivitesi değeri, Tablo 1’de yer alan referans değerlere göre okunmuş ve kaydedilmiştir. Bu yöntem, balın enzimatik aktivitesini ölçerek, balın ısıtıl işlem görüp görmediğini ve tazeliğini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır.

TS 13360 standardına göre, balın diastaz sayısı en az 8 olmalıdır. Ancak narenciye balı gibi bazı özel bal türlerinde doğal olarak düşük diastaz aktivitesi kabul edilebilir. Düşük diastaz sayısı, balın uzun süreli depolamaya veya yüksek sıcaklıklara maruz kaldığını gösterir. Bu analiz, balın kalitesini ve doğal özelliklerini değerlendirmek için kullanılan önemli bir kalite kontrol prosedürüdür (Anonim 2002; TSE, 2008e).

3.2.8. Balda Hidroksimetilfurfural (HMF) Tayini

Bu çalışmada bal örneklerindeki hidroksimetilfurfural (HMF) miktarının belirlenmesi amacıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. HMF analizinde kullanılan cihaz ve analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Analiz Koşulları

- **Cihaz:** HPLC Shimadzu i-series LC-2050 3D Plus (Kyoto, Japonya) (Şekil 6)
- **Dedektör:** PDA dedektör (280 nm)
- **Kolon:** Inertsil C18 (4.6 x 150 mm, 5.0 µm, GL Sciences, Japonya)
- **Enjektör:** Otomatik enjektör (20 µL enjeksiyon hacmi)

Mobil Faz:

- **A Fazı:** Asetonitril (Merck 10030)
- **B Fazı:** Ultra saf su (Merck Milipore Direct Q-3)
- **Karışım Oranı:** %5 Asetonitril - %95 Saf Su (izokratik akış)
- **Akış Hızı:** 1.0 mL/dk

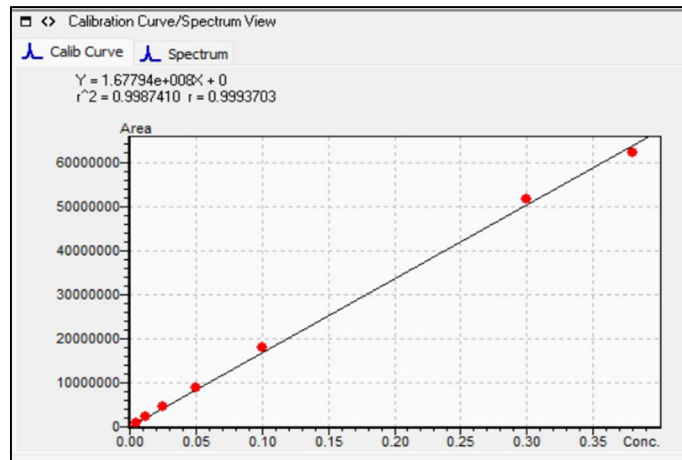
- **Kolon Sıcaklığı:** 30 °C
- **Analiz Süresi:** 20 dakika



Şekil 6. Shimadzu LC2050C 3D Plus HPLC Cihazı

Kalibrasyon Standartları

Analiz için %98 saflıkta **HMF (Sigma Aldrich 53407)** standart çözeltisi kullanılmıştır. Standart solüsyonlar 0.05-100 mg/kg konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi (Şekil 7), cihaz tarafından ölçülen pik alanları kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. HMF Kalibrasyon Eğrisi

Örnek Hazırlığı

Bal örneklerinin HMF içeriğinin belirlenmesi için TS 13356 standardına uygun bir prosedür izlenmiştir:

- 1 g bal örneği, 10 mL saf su eklenerek girdap karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir.
- Karışıma 1 mL Carrez I ve 1 mL Carrez II çözeltileri eklenerek berraklaştırma sağlanmıştır.
- Hazırlanan çözelti, 7100 xg kuvvetinde 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan üst faz, 0.45 µm'lik filtre kullanılarak süzölmüş ve HPLC cihazında analiz için viallere alınmıştır. Tüm çözeltiler, analiz öncesinde oda sıcaklığına getirilmiştir.

Analiz Prosedürü

- HPLC sistemi, mobil faz ile yaklaşık 10 dakika boyunca dengelenerek kararlı hale getirilmiştir.
- Standart çözeltiler sırasıyla enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.
- Örnek çözeltileri, her biri üç tekrarla analiz edilmiştir.

Veri Analizi

- HMF pik alanları cihaz yazılımında entegre edilerek standart eğri yardımıyla konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.
- Elde edilen sonuçlar, HMF miktarını mg/kg cinsinden vermiştir.

Kalite Kontrol

- Her analiz serisi için bir kontrol numunesi çalışılarak cihazın doğruluğu kontrol edilmiştir.
- Pik simetrisi ≤ 1.5 ve çözünürlük ≥ 2 değerleri kontrol edilerek analiz güvenilirliği değerlendirilmiştir.

Bu yöntem, balın HMF içeriğini değerlendirmede kullanılmış ve elde edilen değerler kalite kontrolü açısından değerlendirilmiştir. HMF miktarının yüksek olması, balın ısıtma işlem gördüğüne veya uzun süreli depolamaya maruz kaldığına işaret etmektedir. Bu analiz, balın

tazelik ve saflık durumunun belirlenmesinde önemli bir ölçüt olarak kullanılmıştır (Rufian-Henares vd. 2006; TSE, 2008f).

3.2.9. Balda Protein (DUMAS yöntemi) ve Ham Bal Delta C13 Değerleri Arasındaki Fark

Bu çalışmada, bal örneklerinde karbon izotop oranı ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) farkı, TS 132629 standardına uygun olarak belirlenmiştir. Bu yöntem, balın şeker ve protein fraksiyonlarının karbon izotop değerlerinin ölçülmesi esasına dayanır. Karbon izotop analizinde, saf baldan ekstrakte edilen protein fraksiyonu referans alınarak, balın şeker fraksiyonundaki karbon izotop oranı ile karşılaştırma yapılmıştır.

Saf balda, protein ve şeker fraksiyonlarının karbon izotop oranları birbirine oldukça yakın değerler verir. Bunun nedeni, bal proteinlerinin arılar tarafından nektarın enzimatik dönüşümü ile üretilmesidir. Bu süreçte, balın içerdiği proteinlerin karbon izotop oranı sabit kalır ve kaynağın biyolojik izini yansıtır. Ancak bala mısır şurubu veya şeker kamışı şurubu gibi dış katkı maddelerinin eklenmesi, balın toplam karbon izotop oranını değiştirir. Katkı maddeleri C4 bitki kaynaklı olduğu için ^{13}C oranını artırırken, protein fraksiyonunun karbon izotop oranı aynı kalır. Bu nedenle, şeker ve protein fraksiyonları arasındaki karbon izotop farkı, minimum düzeydeki taşışın bile tespit edilmesini sağlar.

Bal örneklerinin analizinde, izotop oranlarının ölçümü İzotop Oranı Kütle Spektrometresi (IRMS) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen delta ($\delta^{13}\text{C}$) değerleri, uluslararası referans standart Pee Dee Belemnite (PDB) izotop standardına göre hesaplanmıştır. Balın şeker ve protein fraksiyonları arasındaki karbon izotop farkı aşağıdaki formül ile belirlenmiştir:

$$\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{şeker}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$$

TS 132629 standardına göre, bu farkın %1.0'yi aşmaması gerekmektedir. Şeker ve protein fraksiyonları arasındaki $\delta^{13}\text{C}$ farkının %1.0 üzerinde olması, bala dışarıdan mısır şurubu veya şeker kamışı şurubu gibi katkı maddesi eklendiğini gösterir (Bilgen Çınar, 2010; Kambur ve ark., 2015; Kutlu ve Bengü, 2015).

Bu analiz, balın doğal yapısını koruyup korumadığını değerlendirmek ve saflığını belirlemek için yaygın olarak kullanılan uluslararası geçerliliğe sahip güvenilir bir yöntemdir. Elde edilen sonuçlar, balın tağşiş olup olmadığının tespiti için önemli bir veri kaynağı sunmaktadır.

3.2.10. Balda Protein (DUMAS yöntemi) ve Ham Bal Delta C13 Değerlerinden Hesaplanan C4 Şekerleri Oranı Karbon İzotop ($\delta^{13}\text{C}$) Analizi ve C4 Şeker Oranı Analizi

Bu çalışmada bal örneklerindeki karbon izotop oranı ($\delta^{13}\text{C}$) analizi, TS 13362 standardına uygun olarak IRMS (İzotop Oranı Kütle Spektrometresi) cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2012; TSE, 2007). Karbon izotop ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) analizi, balın protein ve şeker fraksiyonlarının karbon izotop oranlarının ölçülmesi ve bu oranların referans standart ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntem, bala dışarıdan mısır şurubu, şeker kamışı şurubu veya nişasta bazlı şeker gibi katkı maddelerinin eklenip eklenmediğinin tespit edilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Saf balda protein ve şeker fraksiyonlarının karbon izotop değerleri birbirine yakın olup, bu fark genellikle %1.0'yi geçmez. Ancak tağşiş edilmiş ballarda şeker fraksiyonundaki $\delta^{13}\text{C}$ değeri artarken, protein fraksiyonunun değeri sabit kalır. Bu fark, enzimatik tepkimeler sonucu oluşan doğal bal proteinlerinin izotop değerlerinin değişmemesi ile açıklanmaktadır.

Karbon izotop oranları, izotop oran kütle spektrometresi (IRMS) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bu cihaz, örnekteki karbon-13 (^{13}C) ve karbon-12 (^{12}C) izotoplarının bağlı oranlarını ölçerek, izotop oranını uluslararası referans olan Pee Dee Belemnite (PDB) standardına göre delta ($\delta^{13}\text{C}$) değeri olarak ifade etmektedir.

Örnek Hazırlığı

Şeker Fraksiyonu:

- 10 g bal örneği, 40 mL saf su ile karıştırılarak çözdürülmüştür.
- Karışıma 1 mL Carrez I ve 1 mL Carrez II çözeltileri eklenerek proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır.
- Homojenize edilen çözelti, 7100 xg kuvvetinde 10 dakika santrifüj edilmiştir ve santrifüj sonrası üst faz (şeker fraksiyonu) saflaştırılarak analiz için ayrılmıştır.

Protein Fraksiyonu:

- Santrifüj sonucu elde edilen çökelti (protein fraksiyonu), filtre edilerek kurutulmuş ve analiz için hazır hale getirilmiştir.

Analiz Prosedürü

- Hazırlanan şeker ve protein fraksiyonları, IRMS cihazına enjekte edilmiştir.
- Cihaz, örneklerin karbon izotop oranını ölçmüş ve PDB standardına göre $\delta^{13}C$ değerleri (‰ cinsinden) hesaplanmıştır.
- Karbon izotop oranı aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$$\delta^{13}C(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{örnek}}}{R_{\text{standart}}} - 1 \right) \times 1000$$

Burada:

- **R(örnek)** : Örnekteki $^{13}C/^{12}C$ oranı
- **R(standart)** : PDB standardındaki $^{13}C/^{12}C$ oranı

Veri Analizi ve Değerlendirme

TS 13362 standardına göre, balın şeker ve protein fraksiyonları arasındaki $\delta^{13}C$ farkı ‰1.0'yi geçmemelidir. Şeker fraksiyonu ile protein fraksiyonu arasındaki izotop farkı şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\Delta\delta^{13}C = \delta^{13}C_{\text{şeker}} - \delta^{13}C_{\text{protein}}$$

Saf ballarda bu fark genellikle ‰1.0'nin altındadır. Ancak dışarıdan nişasta bazlı şeker (C4 bitkilerinden elde edilen şekerler, örn. mısır şurubu) eklenmesi durumunda şeker fraksiyonunun $\delta^{13}C$ değeri yükselmekte, protein fraksiyonu sabit kalmaktadır. Bunun sonucunda şeker ve protein fraksiyonları arasındaki fark, taşıdığı ortaya koyacak şekilde artmaktadır.

Bu analiz, balın karbon izotop oranının ölçülmesiyle, taşıdığı en düşük düzeyde dahi tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Balın karbon izotop değerinin PDB standardına göre ölçülmesi, örneğin saflığının ve doğal yapısının değerlendirilmesinde güvenilir bir yöntemdir.

Bu sayede, katkı maddesi içeren balların tespiti yapılabilmekte ve kalite kontrol süreçleri güçlendirilmektedir.

3.2.11. Balda Prolin Miktarı Tayini

Balın protein içeriği, arıların salgıları, polen ve nektar kaynaklı bileşenlerden oluşmaktadır ve genellikle toplam bal içeriğinin %0.1-0.5'i arasında değişmektedir (De-Melo ve ark., 2017). Baldaki aminoasitlerin %50-85'ini prolin amino asiti oluşturmaktadır ve bu nedenle balın protein içeriğinin değerlendirilmesinde prolin miktarı temel bir parametre olarak kabul edilmektedir. Prolin miktarı, balın türüne, kaynağına ve işlenme şekline bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunun yanı sıra, balda toplam 26 farklı amino asit tanımlanmıştır (Hermosin ve ark., 2003). Bu amino asitler arasında alanin, arginin, asparajin, aspartik asit, fenilalanin, glisin, glutamik asit, glutamin, histidin, izolösin, lösin, metiyonin, ornitin, serin, sistein, tirozin, treonin, triptofan, valin, α -alanin, β -alanin ve γ -aminobütirik asit bulunmaktadır (Rebena ve Herodes, 2010; Keckes ve ark., 2013).

Prolin amino asiti diğer amino asitlerden yapısal farklılık göstermektedir. Prolin, yan zincirinde üç karbon atomunun halka yapısı oluşturması nedeniyle birincil amin grubu içermez. Bu halka yapısı, peptid bağındaki nitrojen atomuna bağlıdır ve bu yapı, prolinin klasik bir amino asit yerine bir imin asidi olarak sınıflandırılmasına neden olur (Baş, 2019).

Bu çalışmada, bal örneklerindeki prolin miktarının belirlenmesi TS 13357 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (TSE, 2008g).

Örnek Hazırlığı

- 5 g bal örneği, 100 mL saf su ile çözülerek homojen bir çözelti elde edilmiştir.
- Hazırlanan çözeltilerden 0.5 mL alınarak test tüplerine aktarılmıştır.
- Tüplere sırasıyla 1 mL formik asit ve 1 mL ninhidrin çözeltisi eklenmiş ve karışım 15 dakika süreyle karıştırılmıştır.

Reaksiyon İşlemi

- Tüpler kaynar su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir.
- Sürenin sonunda, tüpler 70 °C su banyosunda 10 dakika daha bekletilerek reaksiyon tamamlanmıştır.

Renk Gelişimi ve Ölçüm

- Her tüpe 5 mL 1:1 (v/v) propanol:saf su karışımı eklenmiştir.
- Karışım, 45 dakika bekletildikten sonra reaksiyon karışımının absorbansı 510 nm dalga boyunda, çift ışık yollu spektrofotometrede (Shimadzu 1900i UV spektrometre, Kyoto, Japonya) kör numuneye karşı okunmuştur (Şekil 8).



Şekil 8. Shimadzu UV-1900i UV Spektrometre Cihazı

Veri Analizi

- Prolin miktarı, oluşturulan standart eğri kullanılarak mg/kg cinsinden hesaplanmıştır.
- Elde edilen değerler, balın kalite kontrol kriterleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Prolin miktarı mg/kg cinsinden belirlenmiştir.

Prolin tayini, balın saflığını ve kaynağını belirlemede önemli bir parametredir. Saf ballarda prolin miktarı belirli bir sınırın üzerinde olmalıdır. Düşük prolin değerleri, balın tağşiş edildiğini veya doğal yapısının bozulduğunu gösterebilir. Bu yöntem, balın amino asit içeriği ve protein fraksiyonunu objektif bir şekilde ölçerek kalite kontrol süreçlerinde güvenilir sonuçlar sağlamaktadır.

3.2.12. Balda Naftalin Miktarı Tayini

Bu çalışmada, bal örneklerindeki naftalin kalıntı miktarının belirlenmesi amacıyla Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) yöntemi kullanılmıştır. Naftalin gibi uçucu organik bileşiklerin tespiti için yüksek hassasiyetli bir analiz yöntemi olan GC-MS, örneklerin gaz fazındaki bileşenlerinin ayrılması ve kütle spektrometresi ile tanımlanması esasına dayanır.

Analiz Koşulları

- **Cihaz** : GC-MS Shimadzu GCMS-TQ8040NX (Kyoto, Japonya)
(Şekil 9)
- **Dedektör** : MS dedektörü
- **Kolon** : GL Sciences Inertcap 5ms (15 m x 0.25 mm x 0.25 µm, GL Sciences, Japonya)
- **Enjektör** : Otomatik enjektör (enjeksiyon hacmi: 500 µL)
- **Taşıyıcı Gaz** : Yüksek saflıkta helyum gazı (Linde)
- **Kolon Akış Hızı**: 1.91 mL/dk
- **İnlet Basıncı** : 50 kPa
- **İnlet Sıcaklığı**: 200 °C



Şekil 9. Shimadzu GCMS-TQ8040NX Cihazı

Kolon Sıcaklık Programı:

- 50 °C’de 2 dakika tutulmuş ve ardından 10 °C/dakika hızla 250 °C’ye çıkarılmıştır.

Dedektör Parametreleri:

- Arayüz Sıcaklığı: 270 °C
- İyon Kaynağı Sıcaklığı: 200 °C
- Solvent Kesme Zamanı: 2.50 dakika

Etken Madde Geçiş İyonları:

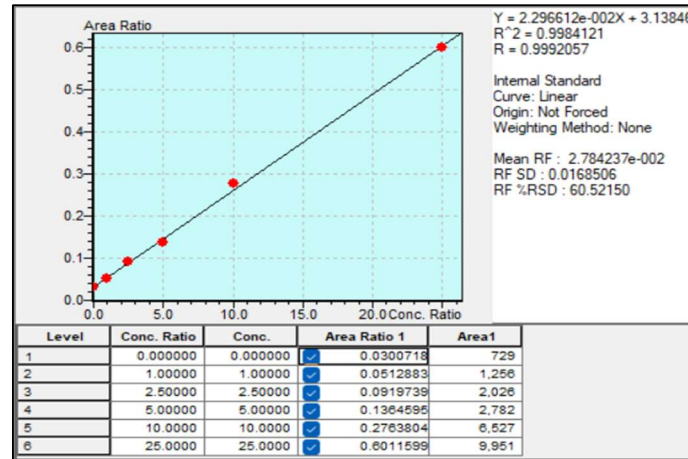
- Naftalin D8 (ISTD): 136 (hedef iyon), 108 (referans iyon)
- Naftalin: 128 (hedef iyon), 127-129 (referans iyonlar)

Alıkonma Zamanları (RT):

- Naftalin D8 (ISTD): 6.78 dakika
- Naftalin: 6.82 dakika

Kalibrasyon Standartları

Analiz için %98 saflıkta Naftalin D8 (Sigma Aldrich 176044) ve %99 saflıkta Naftalin (Sigma Aldrich 147141) kullanılmıştır. Standart solüsyonlar 1.0-20.0 µg/kg konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi detayları Şekil 10'da verilmiş olup, ilgili kromatogramlar Ek-51 ile Ek-58 arasında sunulmuştur.



Şekil 10. Naftalin Kalibrasyon Eğrisi

Örnek Hazırlığı

- Bal numunelerinden 1.0 g alınarak amber renkli, sızdırmaz septumlu 20 mL’lik cam headspace tüplere aktarılmıştır.
- Her numune analiz öncesinde otomatik örnekleyici (autosampler) kullanılarak 80 °C sıcaklıkta 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu işlem, uçucu bileşiklerin gaz fazına geçmesini ve tüpün üst kısmında birikmesini sağlamıştır.
- Tüpün gaz fazındaki üst kısmından 500 µL gaz autosampler şırıngası yardımıyla çekilerek doğrudan GC-MS cihazına enjekte edilmiştir.

Analiz Prosedürü

- GC-MS sistemi, mobil faz ile yaklaşık 10 dakika süreyle dengelenerek başlangıç kararlılığı sağlanmıştır.
- Kalibrasyon çözeltileri sırayla cihaza enjekte edilerek standart eğri oluşturulmuştur.
- Her bal örneği üç tekrarlı analiz edilmiştir.

Veri Analizi

- Pik alanları cihaz yazılımı tarafından entegre edilerek standart eğri kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.
- Elde edilen sonuçlar, hedef bileşik olan naftalin miktarını µg/kg cinsinden vermiştir.

Kalite Kontrol

- Her analiz serisi için bir kontrol numunesi çalışılarak analiz doğruluğu kontrol edilmiştir.
- Pik simetrisi ve çözünürlük değerleri değerlendirilmiş ve pik simetrisi ≤ 1.5 , çözünürlük ≥ 2 olan ölçümler analiz için kabul edilmiştir.

Naftalin tayini, balın uçucu organik bileşik içeriklerinin değerlendirilmesi için kritik bir parametredir. Yüksek naftalin miktarları, ürünün üretim, işleme veya depolama süreçlerinde kirliliğe maruz kaldığını gösterebilir. Bu yöntem, balda kalıntı analizi için uluslararası standartlarla uyumlu, güvenilir ve yüksek hassasiyetli bir yöntemdir.

3.2.13. Balda Renk Tayini (L^* , a^* , b^*)

Bu çalışmada, bal numunelerinin renk özellikleri, masaüstü Minolta Spektrofotometre CM-5 (Konica Minolta, Tokyo, Japonya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Renk ölçümleri, CIELAB renk uzayı sistemine göre gerçekleştirilmiş ve ölçümler sırasında D65 standart ışık kaynağı ve 10° gözlem açısı referans alınmıştır.

Renk değerleri, CIELAB sisteminde aşağıdaki parametreler ile ifade edilmiştir:

- L^* : Parlaklık değeri (0: siyah, 100: beyaz)
- a^* : Kırmızı-yeşil eksen (pozitif değerler kırmızıya, negatif değerler yeşile yönelir)
- b^* : Sarı-mavi eksen (pozitif değerler sarıya, negatif değerler maviye yönelir)

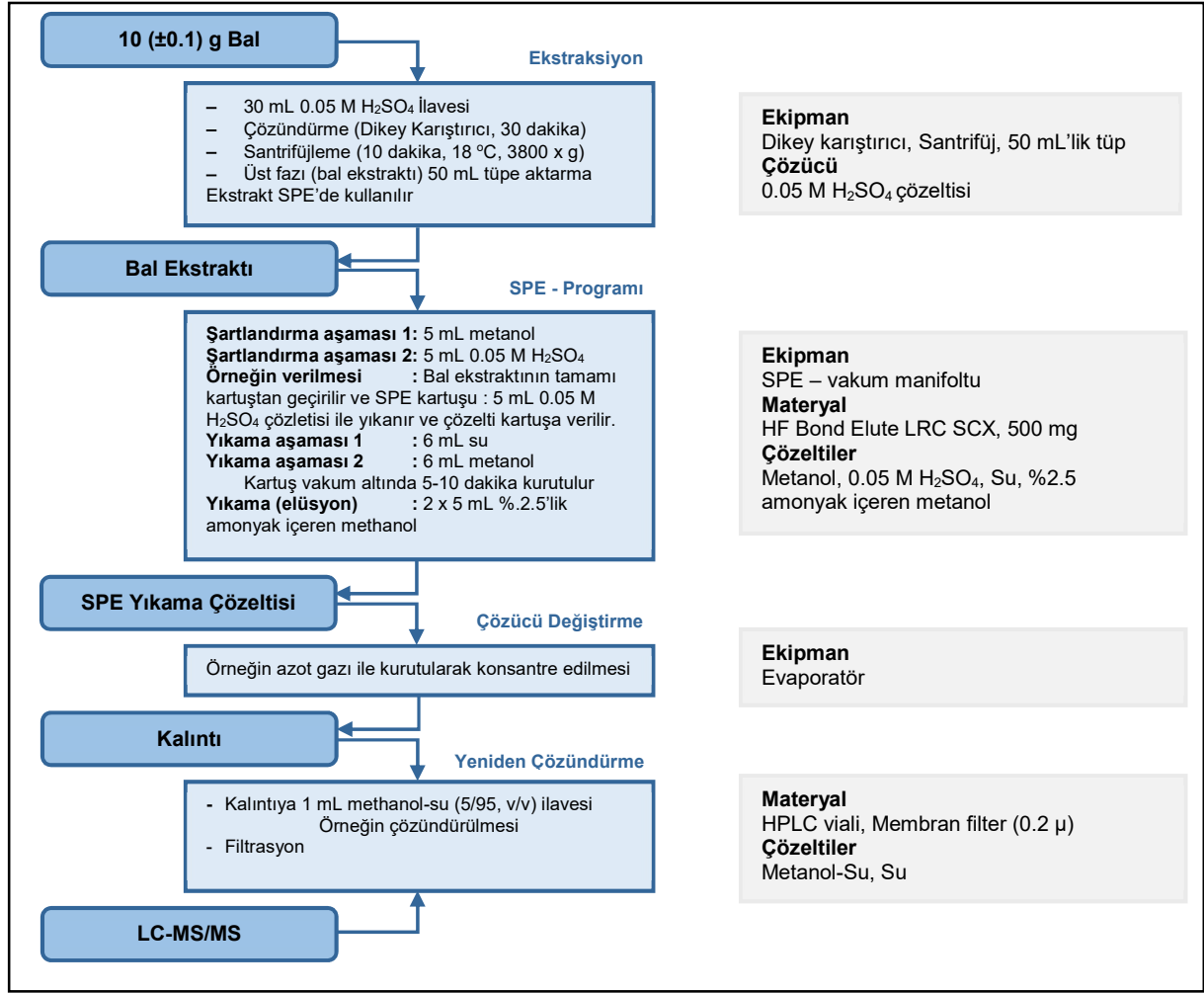
Yapılan ölçümler ile balın görünüm özellikleri kantitatif olarak değerlendirilmiş ve renk farklılıkları, balın türüne ve kaynağına göre analiz edilmiştir. CIELAB renk parametreleri, balın fiziksel kalite özelliklerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir ölçüm standardıdır.

3.3. Balda Pirolizidin Alkaloidlerinin (PA) SPE-LC-MS/MS İle Belirlenmesi

Bu çalışmada bal numunelerindeki pirolizidin alkaloidleri (PA) miktarı, BfR-PA-Honey-1.0/2013 protokolüne uygun olarak SPE-LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 11). Pirolizidin alkaloidleri, toksik potansiyele sahip doğal bileşikler olup arıların nektar topladığı bitkilerden bala geçebilmektedir. Bu nedenle balın güvenilirliği açısından PA tayini önem arz etmektedir.

Analiz Koşulları

- **Cihaz** : Shimadzu LCMS-8045NX (Kyoto, Japonya) (Şekil 12)
- **Dedektör** : MS/MS dedektörü
- **Kolon** : GL Sciences InertSustainSwift C18 (100 mm x 4.6 mm x 3 μ m)
- **Enjektör** : Otomatik enjektör (enjeksiyon hacmi: 5 μ L)



Şekil 11. Alman Risk Değerlendirme Enstitüsü “BfR-PA-Honey-1.0/2013” no’lu Piroлизidin Analizi



Şekil 12. Shimadzu LCMS-8045 Cihazı

Mobil Faz

- **A Fazı** : 5 mM amonyum format (%0.1 formik asit ile hazırlanmış)
- **B Fazı** : 5 mM amonyum format (%0.1 formik asit ile metanol içinde hazırlanmış)
- **Gradient Programı:** Analiz başlangıcında A fazı %95, B fazı %5 oranında başlatılmış ve belirli aralıklarla karışım oranı değiştirilmiştir (Tablo 6).
- **Kolon Fırını Sıcaklığı:** 40 °C
- **Analiz Süresi:** 20.5 dakika

Tablo 6. Prolizidin Alkoloid Analizi Gradient ve Akış Hızı tablosu

Zaman (dk)	Akış (ml/dk)	A	B
0.01	0.75	95	5.0
1	0.75	95	5.0
13	0.75	50	50.0
16	0.75	285	71.5
16.01	0.75	5	95.0
18	0.75	5	95.0
18.01	0.75	95	5.0

Dedektör Parametreleri:

- İyon kaynağı: ESI (Elektrosprey İyonizasyon), MRM modu
- Nebulizör gaz akış hızı (azot): 3 mL/dk
- Kurutma gaz akış hızı (azot): 5 mL/dk
- Isıtma gaz akış hızı (azot): 15 mL/dk
- Arayüz sıcaklığı: 400 °C
- DL sıcaklığı: 300 °C
- Isıtıcı blok sıcaklığı: 400 °C

Etkin Maddeler ve Geçiş İyonları

PA bileşikleri için hedef ve referans iyonlar ile alıkonma zamanları, MS/MS geçiş bilgileri ve pik zamanları detaylı tablolar ile gösterilmiştir (Tablo 7-8).

Kalibrasyon Standartları

Analiz için pirolizidin alkaloidlerinin saf standartları kullanılmıştır. Standart solüsyonlar 1.0-20.0 µg/kg konsantrasyon aralığında hazırlanarak matris uyumlu kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon denklemleri ve regresyon katsayıları (r^2) verilmiş olup detaylı kromatogramlar Ek-8 ile Ek-35 arasında sunulmuştur.

Tablo 7. Pirolizidin Alkaloidlerinin (PA) SPE-LC-MS/MS ile Belirlenmesinde Kullanılan Standart Maddeler

No	ÜrünKodu	Açıklama	Marka
1	PHL86541-10 mg	Echimidine perchlorate	Sigma-Aldrich
2	PHL83590-5 mg	Echimidine n-oxide new phyproof®	Sigma-Aldrich
3	PHL83432-5 mg	Erucifoline phyproof®	Sigma-Aldrich
4	PHL83433-5 mg	Erucifoline n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
5	PHL83237-10 mg	Europine hydrochloride phyproof®	Sigma-Aldrich
6	PHL83238-10 mg	Europine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
7	PHL80403-10 mg	Heliotrine phyproof®	Sigma-Aldrich
8	PHL83236-10 mg	Heliotrine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
9	PHL82424-10 mg	İntermedine phyproof®	Sigma-Aldrich
10	PHL83446-5 mg	İntermedine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
11	PHL83434-5 mg	Jacobine phyproof®	Sigma-Aldrich
12	PHL83435-5 mg	Jacobine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
13	PHL80412-10 mg	Lasiocarpine phyproof®	Sigma-Aldrich
14	PHL83220-10 mg	Lasiocarpine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
15	PHL89726-10 mg	Lycopsamine phyproof®	Sigma-Aldrich
16	PHL83220-10 mg	Lycopsamine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
17	PHL89251-20 mg	Monocrotaline	Sigma-Aldrich
18	PHL82629-10 mg	Monocrotaline n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
20	PHL82630-10 mg	Retrorsine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
21	PHL89789-10 mg	Senecionine phyproof®	Sigma-Aldrich
22	PHL82631-5 mg	Senecionine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
23	PHL89275-10 mg	Seneciphylline phyproof®	Sigma-Aldrich
24	PHL82632-5 mg	Seneciphylline n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
25	PHL83436-5 mg	Senecivernine phyproof®	Sigma-Aldrich
26	PHL83437-5 mg	Senecivernine n-oxide phyproof®	Sigma-Aldrich
27	PHL89274-10 mg	Senkirkine phyproof®	Sigma-Aldrich
28	PHL83438-10 mg	Trichodesmine phyproof®	Sigma-Aldrich

Tablo 8. Prolizin Alkoloid Hesaplama ve Referans Kütle Geçiş İyonları

Prolizin Alkoloidler	Alıkonma Süresi (RT)	Hesap İyonu	Referans İyonlar
Monocrataline N-Oxide	4.23	342.10>137.10	342.10>118.10;342.10>119.20
Monocrataline	5.08	326.10>120.20	326.10>237.20;326.10>194.20;326.10>121.10;326.10>138.10
Erucifoline N-Oxide	5.37	366.10>120.30	366.10>136.10;366.10>119.00;366.10>94.10
Intermedine	5.61	300.10>138.20	300.10>156.10;300.10>120.10
Europine	5.82	330.10>156.20	330.10>138.10;330.10>120.20;330.10>94.10
Lycopsamine	5.88	300.10>138.20	300.10>156.20;300.10>120.10
Europine N-Oxide	5.89	346.10>111.00	346.10>172.10;346.10>94.00
Intermedine N-Oxide	5.92	316.10>138.00	316.10>111.00;316.10>172.00;316.10>94.00
Lycopsamine N-Oxide	6.14	316.10>138.10	316.10>111.10;316.10>172.20;316.10>94.20
Jacobine N-Oxide	6.22	368.10>120.00	368.10>296.10;368.10>94.10
Erucifoline	8.10	350.10>120.20	350.10>138.20;350.10>94.10
Retrorsine N-Oxide	8.29	368.10>118.10	368.10>136.10;368.10>119.10
Heliotrine	8.36	314.10>156.10	314.10>138.20;314.10>120.10
Heliotrine N-Oxide	8.60	330.10>172.10	330.10>138.20;330.10>111.10
Jacobine	8.75	352.10>155.10	352.10>120.10;352.10>94.00
Seneciphylline N-Oxide	8.86	350.10>118.10	350.10>136.20;350.10>120.20
Trichodesmine	9.70	354.10>120.10	354.10>222.20;354.10>122.00
Retrorsine	10.29	352.10>120.20	352.10>138.00;352.10>324.30
Senecionine N-Oxide	10.29	352.10>118.20	352.10>136.00;352.10>94.10
Senecivernine N-Oxide	10.40	352.10>118.10	352.10>120.10;352.10>136.00;352.10>94.10
Seneciphylline	10.62	334.10>120.20	334.10>138.00;334.10>306.00
Senkirkine	11.07	366.20>168.10	366.20>150.10;366.20>122.00\r\n0.00;0.00
Echimidine N-Oxide	11.79	414.20>254.00	414.20>352.30;414.20>137.10;414.20>220.10
Senecionine	12.35	336.10>120.10	336.10>138.20;336.10>308.20
Senecivernine	12.64	336.10>120.10	336.10>138.20;336.10>308.10
Echimidine	13.74	398.20>120.10	398.20>220.10;398.20>238.10;398.20>118.10
Lasiocarpine N-Oxide	13.91	428.20>254.20	428.20>136.10;428.20>94.10
Lasiocarpine	15.71	412.20>120.10	412.20>220.10;412.20>336.10;412.20>138.20

Örnek Hazırlığı

- 10 ± 0.1 g bal örneği, 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerine 30 mL 0.05 N sülfürik asit çözeltisi eklenerek karışım elde edilmiştir.
- Numune, oda sıcaklığında 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırılmış ve 3800 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası üst faz, güçlü katyon değişim materyali (SPE) kullanılarak saflaştırılmıştır. SPE kartuşları önceden %2.5 amonyak içeren metanol çözeltisi ile şartlandırılmıştır.
- Elüat, azot gazı ile buharlaştırılarak kurutulmuş ve metanol/su karışımında çözündürülüp LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Analiz Prosedürü

- LC-MS/MS sistemi, mobil faz ile yaklaşık 10 dakika boyunca dengelenmiştir.
- Standart çözeltiler sırasıyla enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.
- Bal örnekleri her biri üç tekrarla analiz edilmiştir.

Veri Analizi

- Pik alanları entegre edilerek kalibrasyon eğrisi yardımıyla (Tablo 9) PA konsantrasyonları hesaplanmıştır.
- Analiz sonuçları, hedef bileşiklerin $\mu\text{g/kg}$ cinsinden miktarlarını vermiştir.

Kalite Kontrol

- Her analiz serisinde bir kontrol numunesi çalışılmıştır.
- Pik simetrisi ve çözünürlük değerleri kontrol edilmiş olup analizlerin kabul edilebilmesi için pik simetrisi ≤ 1.50 çözünürlük ≥ 2 kriterleri sağlanmıştır.

Pirolizidin alkaloid tayini, balın güvenilirliğinin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. PA miktarının yüksek çıkması, bitkisel kaynaklı kontaminasyonu veya çevresel faktörlere bağlı kirliliği gösterebilir. Bu yöntem, LC-MS/MS cihazı ile yüksek hassasiyetli bir analiz sunmakta ve bal örneklerinde düşük düzeydeki PA miktarlarını dahi tespit edebilmektedir.

Tablo 9. Prolizin Alkoloidlerin Kalibrasyon Denklemi ve Regrasyon Katsayısı (R^2)

Prolizin Alkoloidler	Kalibrasyon Denklemi	R^2
Monocrataline N-Oxide	$y=428.537x-12,475.4$	0.9999
Monocrataline	$y=752.192x-51,520.7$	0.9998
Erucifoline N-Oxide	$y=101.932x+5,047.69$	0.9994
Intermedine	$y=998.64x+18,753.8$	0.9998
Europine	$y=655.437x-30,185.8$	0.9997
Lycopsamine	$y=698.501x+63,673.7$	0.9992
Europine N-Oxide	$y=429.080x+69,128.5$	0.9984
Intermedine N-Oxide	$y=478.193x+36,271.5$	0.9993
Lycopsamine N-Oxide	$y=549.022x+4,930.06$	0.9998
Jacobine N-Oxide	$y=479.887x+6,968.68$	0.9999
Erucifoline	$y=353.517x-16,204.7$	0.9998
Retrorsine N-Oxide	$y=182.745x-3,938.47$	0.9983
Heliotrine	$y=723.716x-1,596.31$	0.9997
Heliotrine N-Oxide	$y=1.86675e+006x+9,164.47$	0.9998
Jacobine	$y=196.86x+19,100.7$	0.9998
Seneciphylline N-Oxide	$y=0.99975x+5,547.26$	0.9997
Trichodesmine	$y=583.253x-71,328.7$	0.9994
Retrorsine	$y=237.571x+625.404$	0.9997
Senecionine N-Oxide	$y=332.342x-32,927.7$	0.9986
Senecivernine N-Oxide	$y=319.271x-2,786.65$	0.9995
Seneciphylline	$y=292.175x-49,656.4$	0.9993
Senkirkine	$y=821.353x+5,267.17$	0.9999
Echimidine N-Oxide	$y=953.635x+7,780.71$	0.9999
Senecionine	$y=163.077x-11,838.9$	0.9998
Senecivernine	$y=219.276x-19,176.4$	0.9997
Echimidine	$y=2.18225e+006x-196.805$	0.9998
Lasiocarpine N-Oxide	$y=462.815x+2,376.5$	0.9999
Lasiocarpine	$y=2.89435e+006x-350.437$	0.9996

3.4. İstatistiksel Analiz ve Değerlendirme

Bu çalışmada, her bir pirolizidin alkaloid (PA) bileşiğine ait analizler üç kez tekrarlanmış ve elde edilen veriler ortalama değer $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Bulgular, farklı bal türleri ve bölgeler arasında pirolizidin alkaloid seviyelerindeki anlamlı farklılıkları değerlendirmek amacıyla varyans analizi (ANOVA) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bal çeşitlerine ait ortalama değerler arasındaki gruplamaların belirlenmesi için Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu test, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları tespit etmek için kullanılmıştır. Ayrıca, temel bileşen analizi (PCA) kullanılarak, bal örneklerinin pirolizidin alkaloid içerikleri ve diğer bazı kimyasal özellikleri açısından bölgesel orijinlerine göre uzaklıkları değerlendirilmiştir. PCA analizi, bal örneklerinin benzerlik ve farklılıklarını görselleştirmek için çok değişkenli bir istatistiksel araç olarak tercih edilmiştir.

Tüm matematiksel ve istatistiksel analizler, RStudio yazılımının 2023.06.2 Build 561 sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen bulgular, bal türleri arasındaki kimyasal farklılıkların ve bölgesel varyasyonların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla yorumlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tablo 10'da, analiz edilen bal örneklerinin temel fizikokimyasal özellikleri detaylı bir şekilde sunulmuştur. Bu tabloda, balın nem, elektriksel iletkenlik, toplam asitlik, pH, suda çözünmeyen madde miktarı gibi kalite kriterlerine ek olarak prolin, diastaz, HMF ve naftalin gibi önemli bileşenlerin minimum, maksimum ve ortalama değerleri, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2020/7) standartları ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu veriler, bal örneklerinin kalite kriterlerine uygunluğunun değerlendirilmesine ve saflık ile doğallık düzeylerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Tablo 10. Bal örneklerine ait fizikokimyasal sonuçlar

Özellikler	Minimum	Maksimum	Ortalama	TGK Bal Tebliği (2020/7)
Nem (%)	13.70	15.60	15.7	En fazla 20.00
L*	30.89±0.09	39.47±0.09	34.60	
a*	-2.79±0.03	1.65±0.03	- 0.63	
b*	13.21±0.11	19.44±0.11	15.68	
Elektriksel iletkenlik (mS/cm)	0.20±0.01	0.34±0.00	0.29	En fazla 0.80
Toplam asitlik (meq/kg)	16.87±0.06	19.77±0.06	18.23	En fazla 50.00
pH	3.89±0.07	4.01±0.07	3.96	
Suda çözünmeyen madde (%)	0.03	0.09	0.06	En fazla 0.10
Prolin (mg/kg)	180.33±15.57	572.67±42.15	337.53	En az 300.00
Diastaz (DU)	8.62±0.56	24.57±1.07	13.80	En az 8.00
Fruktoz (%)	31.24±0.49	32.79±0.43	31.72	
Glikoz (%)	26.93±0.26	29.38±0.36	28.65	
F+G (%)	58.17	61.99	60.37	En az 45.00
FGO	1.07±0.00	1.16±0.01	1.11	0.90-1.40
Maltoz (%)	0.77±0.03	1.02±0.06	0.90	
Sakkaroz (%)	0.00±0.00	0.67±0.04	0.34	En fazla 5.00
HMF (mg/kg)	1.91±0.05	12.11±0.03	6.57	En fazla 40.00
C4 şeker oranı	-27.14±1.83	-3.77±0.65	-13.41	
C13 Protein	-24.40±0.04	-21.79±0.16	-23.39	
C13 Hambal	-25.42±0.10	-24.94±0.06	-25.12	
Protein ve Hambal Farkı	0.57±0.12	3.33±0.18	1.73	
Naftalin (µg/kg)	8.67±0.05	9.07±0.03	8.88	En faz 10.00

*, p≤0.05, **, p≤0.01, ***, p≤0.001, F+G: Fruktoz + Glikoz, FGO: Fruktoz/Glikoz Oranı, HMF:Hidroksimetilfurfural

4.1. Bal Örneklerinin Şeker İçerikleri (Fruktoz, Glikoz, Sakkaroz, Maltoz) ve Dağılımı

Balın temel bileşenlerinin büyük bir kısmını şekerler ve su oluşturmakta olup, enzimler ve diğer bileşenler daha düşük oranlarda bulunmaktadır. Balın yaklaşık %80'lik kısmı şekerlerden, %17'si sudan ve geriye kalan %3'lük kısmı ise enzimler ve diğer az miktardaki bileşiklerden meydana gelmektedir. Balın içerdiği şeker profili, balın kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. Özellikle doğal balın kimyasal yapısındaki değişiklikler, balın saflığı ve doğallığı açısından büyük önem taşımaktadır. Balda yaygın olarak karşılaşılan hileler, arıların şeker şurubu ile beslenmesi ya da doğrudan doğal bala şeker şurubu eklenmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Çukurova bölgesinden temin edilen 5 adet çiçek balında yapılan çalışmamızda ise glikoz oranı %26.93 ile %29.38 arasında (ortalama %28.65), fruktoz oranı ise %31.24 ile %32.79 arasında (ortalama %31.72) tespit edilmiştir. Ayrıca fruktoz/glikoz oranı (FGO) %1.07 ile %1.16 arasında (ortalama %1.11) bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 1. Bal örneklerine ait Fruktoz, Glikoz, Sakkaroz, Maltoz ve Fruktoz/Glikoz Oran miktarlar (g/100 g)

Kod	Fruktoz*	Glikoz***	F+G	FGO***	Sakkaroz***	Maltoz**
768	32.79±0.43 ^a	29.20±0.42 ^a	61.99	1.12±0.01 ^b	0.67±0.04 ^a	0.86±0.06 ^{bc}
792	31.34±0.58 ^b	29.32±0.49 ^a	60.66	1.07±0.00 ^d	0.38±0.04 ^b	0.95±0.04 ^{ab}
793	31.89±0.53 ^{ab}	29.38±0.36 ^a	61.26	1.09±0.01 ^d	0.00±0.00 ^d	0.91±0.03 ^{ab}
800	31.36±0.30 ^b	28.42±0.24 ^a	59.77	1.10±0.00 ^c	0.21±0.02 ^c	1.02±0.06 ^a
829	31.24±0.49 ^b	26.93±0.26 ^b	58.17	1.16±0.01 ^a	0.45±0.02 ^b	0.77±0.03 ^c

*, p≤0.05, **, p≤0.01, ***, p≤0.001, F+G: Fruktoz+Glikoz, FGO: Fruktoz/Glikoz Oranı

Çetin ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 50 adet çiçek balı örneğinde glikoz oranının %19.08 ile %33.87 arasında (ortalama %27.61), fruktoz oranının ise %23.36 ile %45.05 arasında (ortalama %33.43) değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Çetin vd., 2011). Bu veriler, balın içerdiği şeker miktarlarının oldukça geniş bir aralığa sahip olabileceğini göstermektedir.

Fruktoz ve glikoz oranlarının yanı sıra FGO değeri de balın önemli bir kalite kriteridir. Bu oran, balın kaynağına ve kristalleşme eğilimine dair bilgiler sunmaktadır. Literatürde ideal bir balın

%27.25-%44.26 oranında fruktoz ve %22.03-%40.75 oranında glikoz içermesi gerektiği belirtilmiştir (Durmaz, 2020; Caner, 2010). Fruktoz/glikoz oranının yüksek olması balın kristalleşmeye daha az eğilimli olduğuna, buna karşılık glikoz oranının yüksek olması ise balın oda sıcaklığında kristalleşmeye daha yatkın olduğuna işaret etmektedir.

Türkiye’de son yıllarda 357 çam balı örneğinde yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada ise glikoz oranı %16.59 ile %41.52 arasında (ortalama %25.55), fruktoz oranı %19.54 ile %44.72 arasında (ortalama %28.73) ve fruktoz/glikoz oranı %0.70 ile %1.51 arasında (ortalama %1.13) olarak rapor edilmiştir (Uçurum vd., 2023). Söz konusu değerler, bal tebliği sınırları ve önceki çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu sonuçlar, farklı bal türleri arasında glikoz, fruktoz ve FGO değerlerinin geniş bir değişim aralığına sahip olabileceğini, ancak belirli sınırlar dahilinde kaldığı sürece doğal ve saf bal olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, balın kimyasal kompozisyonunun detaylı bir şekilde incelenmesi, balın kalite özelliklerinin belirlenmesi ve olası hilelerin tespiti açısından önemli bir araçtır. Özellikle şeker profili ve FGO değerleri, balın kristalleşme eğilimi ve kaynağı hakkında bilgi sağlayarak, tüketicilere güvenilir ve kaliteli ürünlerin sunulmasına katkıda bulunmaktadır. Çetin ve ark. (2011) çalıştıkları çiçek balı örneklerinin 23 adedinde sakkaroz oranını %0.46–17.10 (ortalama 5.53) olarak tespit etmiştir. Sakkaroz miktarının yüksek olması, çiçek balı örneklerinde taşış olabileceğini göstermektedir (Durmaz, 2020; Çetin vd., 2011).

Yapmış olduğumuz araştırmada, analiz edilen bal örneklerinde sakkaroz oranı %0.21 ile %0.67 arasında değişim göstermiş olup, ortalama %0.34 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, balın kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan sakkaroz düzeyinin, analiz edilen örneklerde oldukça düşük seviyelerde bulunduğunu ortaya koymaktadır. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2020/7) uyarınca, balda sakkaroz miktarının en fazla 5 g/100 g (%5) olması gerektiği belirtilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda incelenen bal örneklerindeki sakkaroz miktarlarının ilgili yasal düzenlemelerde belirtilen sınır değerlerin oldukça altında olduğu görülmüştür.

Sakkaroz oranı, bala dışarıdan şeker şurubu eklenip eklenmediğinin ya da arıların şeker bazlı beslenme ile yönlendirilip yönlendirilmediğinin tespit edilmesinde kritik bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Doğal ve saf bal, düşük sakkaroz içeriği ile karakterize edilirken, yasal

sınırların üzerindeki sakkaroz miktarları, balın saflığını olumsuz yönde etkileyen uygulamalara işaret edebilir. Bu nedenle, sakkaroz düzeyinin belirlenmesi, balın kalite kontrol süreçlerinde önemli bir yere sahiptir.

Çalışmamızda elde edilen sakkaroz oranlarının tüm örneklerde Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen limitler ile uyumlu olması, analiz edilen bal örneklerinin doğal yapısının korunmuş olduğunu ve herhangi bir dış müdahale belirtisi taşımadığını göstermektedir. Bu bulgular, tüketicilerin güvenilir ve kalite standartlarına uygun ürünlere erişimini sağlamak adına önemli bir veri kaynağı sunmaktadır. Sonuç olarak, bal üretiminde saflık ve kalite kriterlerinin korunması, balın kimyasal bileşenlerinin detaylı incelenmesi ve ulusal düzenlemelere uygunluk açısından büyük önem taşımaktadır.

4.2. Bal Örneklerinin Diastaz, Prolin, Naftalin ve HMF İçerikleri

Balın kalite ve doğallık değerlendirmesinde belirleyici rol oynayan diastaz, prolin, naftalin ve hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği, hem balın üretim sürecine hem de depolama koşullarına dair önemli bilgiler sunmaktadır. Diastaz enzimi, balın tazelik göstergesi olup yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmesi nedeniyle üretim ve işleme sürecinin kontrolünde kritik bir parametredir. Prolin ise balın saflığının ve kaynağının belirlenmesinde temel bir aminoasit olup, tağşişe uğramış ballarda düşük seviyelerde bulunur. HMF, balın termal işleme ve depolama koşullarına maruz kalıp kalmadığını ortaya koyan bir bileşen olarak özellikle tazelik ve raf ömrü değerlendirmelerinde kullanılmaktadır. Naftalin ise bal peteklerinin saklanması sırasında kullanılan bazı fumigantlardan kaynaklanabilen toksik bir bileşiktir ve sağlık açısından risk teşkil edebileceği için dikkatle izlenmesi gereken bir kalıntıdır. Bu bölümde, analiz edilen bal örneklerinin diastaz, prolin, HMF ve naftalin içerikleri incelenerek, örneklerin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen kalite kriterleri ile uyumluluğu değerlendirilmiştir (Tablo 12).

4.2.1. Bal Örneklerinin Enzim Aktivitesi ve Diastaz Sayısı

Balın kalitesini ve tazeliğini belirlemede enzim aktiviteleri önemli bir göstergedir. Balda yaygın olarak bulunan temel enzimler invertaz, glukozidaz ve diastaz olup, özellikle diastaz sayısı, balın üretim sürecindeki işleme düzeyini ve doğallığını değerlendirmede önemli bir kriterdir

(Uçurum vd., 2023). Diastaz enzimi, amilaz enzimi ailesine dahil olup nişastayı daha küçük moleküllere parçalayan bir enzimdir ve yüksek sıcaklıklarda hızla etkisiz hale gelir. Yüksek sıcaklık işlemleri sırasında diastaz enziminin zarar görmesi, balın tadında ve renginde bozulmalara neden olabilmektedir. Bu nedenle Uluslararası Bal Komisyonu (IHC), Codex Alimentarius Bal Standardı ve Avrupa Birliği Bal Direktifleri'nde diastaz sayısı, balın saflığı ve doğal yapısının korunup korunmadığını gösteren bir kalite ölçütü olarak yer almaktadır (Huang vd., 2019; Uçurum vd., 2023).

Tablo 2. Bal örneklerinin Diastaz, Prolin, Naftalin ve HMF içerikleri

Kod	Diastaz* (DU)	Prolin* (mg/kg)	Naftalin* (µg/kg)	HMF* (mg/kg)
768	24.57±1.07 ^a	390.33±21.55 ^b	8.67±0.05 ^c	1.91±0.05 ^e
792	11.73±0.25 ^c	572.67±42.15 ^a	9.07±0.03 ^a	6.22±0.02 ^c
793	8.62±0.56 ^d	270.00±30.20 ^c	8.99±0.05 ^a	8.02±0.09 ^b
800	8.7±0.66 ^d	180.33±15.57 ^d	8.93±0.09 ^{ab}	12.11±0.03 ^a
829	15.4±0.85 ^b	274.33±18.77 ^c	8.76±0.10 ^{bc}	4.58±0.06 ^d

*: p≤0.001

Uçurum ve arkadaşları (2023), Türkiye'de 357 çam balı örneği üzerinde yaptıkları çalışmada diastaz sayısını 4.10–32.36 aralığında (ortalama 14.11) tespit etmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne (Tebliğ No: 2020/7) göre narenciye balı haricindeki ballarda diastaz sayısının en az 8 olması gerekmektedir. Araştırmamızda analiz edilen bal örneklerinde diastaz sayısı 8.62–24.57 arasında (ortalama 13.80) bulunmuştur (Tablo 12). Bu değerler, bal tebliği ile uyumlu olmakla birlikte bazı numunelerde diastaz değeri yasal sınıra yakın bulunmuştur. Özellikle 792 ve 800 kodlu numunelerde diastaz sayısının alt sınıra yakın olması dikkat çekicidir. Bu bulgu, balın işleme koşullarının ve kaynağının enzim aktivitesine etkisi ile açıklanabilir.

4.2.2. Bal Örneklerinin Prolin İçeriği

Prolin, balda doğal olarak en yüksek miktarda bulunan ve saflığı gösteren temel aminoasittir. Bal dışındaki şeker şurupları ve yapay katkılarla prolin seviyesi artırılmaz, bu da prolinin gerçek balın ayırt edilmesinde önemli bir belirteç olmasını sağlar (Uçurum vd., 2023). Literatürde, prolin seviyesinin, arıların beslenme şekline ve balın botanik kaynağına göre farklılık gösterebileceği belirtilmektedir (Can vd., 2015; Çetinkaya vd., 2024). Doğal çiçek

ballarında en az 300 mg/kg prolin bulunması gerekmektedir. Ancak, narenciye, lavanta, okaliptüs, ihlamur, kanola gibi bal çeşitlerinde bu limit 180 mg/kg olarak belirlenmiştir (Anonim, 2012).

Çalışmamızda analiz edilen bal örneklerinin prolin değerleri değişkenlik göstermiştir. Özellikle 768 ve 792 kodlu numunelerde prolin değerleri Bal Tebliği'nde belirtilen limit olan 300 mg/kg'ın üzerinde tespit edilmiştir. Ancak 800 kodlu numunede prolin seviyesi 180 mg/kg ile sınır değer altında kalmıştır. Bu durum, numunenin narenciye balı olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir. Çiçek kaynaklı ballarda düşük prolin seviyeleri, genellikle arıların şekerli su ile beslenmesinden kaynaklanan safsızlık belirtisi olarak kabul edilmekte, ancak narenciye gibi ballarda doğal varyasyonlar olabilmektedir.

Hidroksimetilfurfural (HMF) İçeriği

HMF, şekerli gıdalarda uygulanan yüksek sıcaklık işlemleri sırasında Maillard reaksiyonları sonucunda oluşan bir bileşiktir ve balın tazeliğini belirlemede önemli bir kriterdir. HMF seviyesinin yüksek olması, balın raf ömrü boyunca uygun olmayan koşullarda saklandığı veya yüksek sıcaklıklara maruz kaldığını göstermektedir (Can vd., 2015; Uçurum vd., 2023). Ayrıca, HMF oluşumu, balın türüne göre değişim gösterebilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne (Tebliğ No: 2020/7) göre baldaki HMF miktarının en fazla 40 mg/kg olması gerekmektedir.

Araştırmamızda HMF değerleri 1.91–12.11 mg/kg arasında (ortalama 6.57 mg/kg) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, analiz edilen bal örneklerinin HMF içeriklerinin tebliğ sınırları içerisinde olduğunu göstermektedir. HMF seviyelerinin en yüksek olduğu numuneler 800 ve 793 kodlu örneklerdir. Bu örneklerdeki diastaz aktivitesinin de diğer örneklerle göre daha düşük olması, HMF artışı ile diastaz kaybı arasındaki ilişkiye işaret etmektedir. Literatürde, diastaz aktivitesindeki azalmaların HMF seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Çetinkaya vd., 2024).

4.2.3. Bal Örneklerinde Naftalin Kalıntısı

Naftalin, polisiklik aromatik bir hidrokarbon olup, endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Bal peteklerinin saklanması sırasında, bal güvesi (*Galleria*

mellonella) mücadelesinde fumigant olarak naftalin ve kükürt dioksit kullanılabilir (Tosuno, 2016). Ancak naftalin kalıntısı, toksik etkilerinden dolayı balda bulunması istenmeyen bir bileşiktir ve Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne (Tebliğ No: 2020/7) göre balmumunda naftalin miktarı en fazla 10 ppb olmalıdır.

Çalışmamızda analiz edilen bal örneklerinin naftalin seviyeleri 8.67–9.07 ppb (ortalama 8.88 ppb) olarak tespit edilmiştir. Bu değerler tebliğde belirtilen sınır değerler ile uyumludur. Bal örneklerinde tespit edilen naftalin miktarının düşük olması, üretim ve depolama sırasında balın uygun koşullarda muhafaza edildiğini ve potansiyel bir kirlenme riskinin düşük olduğunu göstermektedir.

Araştırma bulgularımız, analiz edilen bal örneklerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen yasal kriterlere genel olarak uyumlu olduğunu göstermektedir. Diastaz sayısı, prolin, HMF ve naftalin değerleri, balın kalite ve doğruluğunun korunmuş olduğunu, ancak bazı örneklerde bölgesel flora farklılıklarının ve üretim süreçlerinin bileşen içeriklerinde değişkenliğe yol açabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, balın biyokimyasal bileşenlerinin analiz edilmesinin kalite kontrol süreçlerinde önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

4.3. Bal Örneklerinin $\delta^{13}\text{C}_{\text{bal}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$ Değerleri, Protein-Bal $\delta^{13}\text{C}$ Farkı ve C4 Şeker Oranı Analizi

Balın karbon izotop profili, saflığının ve doğal yapısının belirlenmesinde önemli bir analiz yöntemidir. Bu kapsamda, $\delta^{13}\text{C}$ değerleri, balda kullanılan karbon kaynaklarının izlenmesi açısından kritik bir parametredir. Balın $\delta^{13}\text{C}$ değeri ($\delta^{13}\text{C}_{\text{bal}}$) ile bal proteinlerinin $\delta^{13}\text{C}$ değeri ($\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$) arasındaki fark, bala dışarıdan C4 bitki kaynaklı şekerlerin (örneğin, mısır şurubu veya şeker kamışı şurubu) ilave edilip edilmediğini belirlemek için temel bir gösterge niteliğindedir. Protein ve bal $\delta^{13}\text{C}$ değerleri arasındaki farkın 1‰'in üzerinde olması, balın saflığına gölge düşürebilecek bir durum olarak kabul edilmektedir. Bu fark kullanılarak hesaplanan C4 şeker oranı, balda C4 şeker kaynaklarından gelen katkıların miktarını belirlemede önemli bir referanstır ve bu oran, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen sınırlar çerçevesinde değerlendirilmelidir. Bu bölümde, analiz edilen bal örneklerinin $\delta^{13}\text{C}_{\text{bal}}$

ve $\delta^{13}\text{C}$ protein değerleri, bu değerler arasındaki fark ve C4 şeker oranları incelenerek, örneklerin saflık kriterlerine uygunluğu değerlendirilmiştir (Tablo 13).

Tablo 3. Bal Örneklerinin $\delta^{13}\text{C}$ bal, $\delta^{13}\text{C}$ protein Değerleri, Protein-Bal $\delta^{13}\text{C}$ Farkı ve C4 Şeker Oranı

Kod	$\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}^*$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{ham bal}}^*$	Protein ve Hambal Farkı*	C4*
768	-24.40±0.04 ^b	-24.94±0.06 ^c	0.57±0.12 ^d	-3.77±0.65 ^a
792	-21.79±0.16 ^e	-25.13±0.03 ^b	3.33±0.18 ^a	-27.14±1.83 ^d
793	-23.46±0.21 ^c	-25.42±0.10 ^a	1.96±0.27 ^c	-14.26±2.20 ^b
800	-22.44±0.06 ^d	-25.14±0.07 ^b	2.70±0.10 ^b	-21.20±0.81 ^c
829	-24.87±0.05 ^a	-24.97±0.05 ^{bc}	0.10±0.04 ^e	-0.66±0.24 ^a

*: p≤0.001

Balın $\delta^{13}\text{C}$ izotop profili, balın kaynağını ve olası şeker katkılarını belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre çiçek ballarında, balın C13 protein ($\delta^{13}\text{C}$ protein) ve C13 ham bal ($\delta^{13}\text{C}$ bal) değerleri arasındaki farkın (-1.0) veya daha pozitif olması gerektiği belirtilmiştir (Çiftçi, 2018). Bu farkın negatif değerlere sahip olması, bala C4 fotosentez döngüsüne sahip bitkilerden (örneğin, mısır şurubu veya şeker kamışı şurubu) elde edilen şekerlerin eklendiğinin göstergesidir. C4 bitkilerinde C13/C12 izotop oranı genellikle -10 ile -20 arasında değişirken, C3 döngüsüne sahip nektar üreten bitkilerde bu oran -25 civarındadır (Belli, 2019). Dolayısıyla, doğal balda $\delta^{13}\text{C}$ değeri yaklaşık -25 seviyelerinde ölçülmelidir. Ancak, balın içerisine mısır şurubu gibi C4 kaynaklı şekerler ilave edilmesi durumunda bu değer -10'a kadar yükselebilmektedir (Belli, 2019).

Araştırmamızda analiz edilen bal örneklerinde C13 protein ve C13 ham bal değerleri arasındaki farklar %0.1 ile %3.3 arasında bulunmuş olup, bu değerler Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen sınır değerler ile uyumludur (Tablo 13). Bu sonuç, analiz edilen bal örneklerinin herhangi bir C4 bitki kaynaklı şeker ilavesi ile tağşiş edilmediğini göstermektedir.

Bal örneklerinin C4 şeker oranları, ham balın $\delta^{13}\text{C}$ değeri ve protein $\delta^{13}\text{C}$ değeri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$C4 \text{ şeker (\%)} = \left(\frac{\delta^{13}C_{\text{protein}} - \delta^{13}C_{\text{ham bal}}}{\delta^{13}C_{\text{protein}} - (-9.7)} \right) \times 100$$

Burada:

- $\delta^{13}C_{\text{protein}}$: Bal proteinlerinin karbon izotop değeri
- $\delta^{13}C_{\text{ham bal}}$: Ham balın karbon izotop değeri
- -9.7 : Mısır şurubu için ortalama $\delta^{13}C$ değeri

Burada (-9.7), mısır şurubu için ortalama $\delta^{13}C$ değeri olarak kabul edilmektedir (Çiftçi, 2018). Elde edilen analiz sonuçlarına göre, tüm bal örneklerinde C4 şeker oranı %7'nin altında bulunmuştur ve bu değerler Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen yasal limitlerle uyum göstermektedir. Bu bulgular, analiz edilen bal örneklerinin C4 şeker katkısı açısından güvenilir olduğunu ve doğal bileşimlerini koruduğunu ortaya koymaktadır.

4.4. Bal Örneklerinin İletkenlik, pH, Asitlik ve Serbest Asitlik Değerleri

Balın pH değeri, asitlik ve elektriksel iletkenlik gibi fizikokimyasal özellikleri, balın kalite değerlendirmesinde önemli parametreler olup, hem balın kaynağı hem de işlenme koşulları hakkında önemli bilgiler sunar. Bu parametreler, balın lezzeti, dayanıklılığı, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri üzerinde etkili olup, balın kimyasal bileşiminde yer alan organik asitler, mineraller ve protein gibi bileşenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Tablo 14'de, bal örneklerinin elektriksel iletkenlik, pH, toplam asitlik ve serbest asitlik değerleri yanısıra renk değerleri (Tablo 15) detaylı bir şekilde verilmiş olup, bu parametreler balın kimyasal özelliklerinin kalite standartlarına uygunluğunu değerlendirmek amacıyla incelenmiştir.

Tablo 4. Bal Örneklerinin İletkenlik, pH, Asitlik ve Serbest Asitlik Değerleri

Kod	İletkenlik*	pH*	Asitlik*	Serbest Asitlik (meg/kg)*
768	0.29±0.00 ^c	3.89 ±0.07 ^b	1.94±0.05 ^a	18.93±0.81 ^{ab}
792	0.30±0.00 ^c	3.95 ±0.07 ^a	1.85±0.04 ^b	18.50±0.36 ^b
793	0.32±0.00 ^b	3.95 ±0.06 ^a	1.98±0.01 ^a	19.77±0.06 ^a
800	0.34±0.00 ^a	4.01 ±0.07 ^c	1.69±0.01 ^c	16.87±0.06 ^c
829	0.20±0.01 ^d	3.98 ±0.04 ^b	1.71±0.02 ^c	17.07±0.23 ^c

*: p≤0.001

Balın pH değeri, lezzet profili ve raf ömrü gibi kalite özellikleri üzerinde doğrudan etkili olan önemli bir parametredir. Baldaki organik asitler, mineral maddeler, karbonhidratlar, peptitler ve aminoasitler, pH değerinin belirlenmesinde rol oynayan temel bileşenlerdir (Durmaz, 2020). pH değeri, balın asidik yapısının derecesini ortaya koyarak, antioksidan ve antibakteriyel özelliklerine dair bilgi sunar. Tablo 14’de verilen bulgulara göre, çalışmamızda analiz edilen bal örneklerinin pH değerleri 3.89 ile 4.01 arasında değişim göstermiştir. Bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalarla tutarlıdır. Örneğin, Hatay yöresine ait 50 bal örneğinin incelendiği bir çalışmada pH değeri ortalama 3.88 olarak tespit edilmiştir (Şahinler vd., 2001). Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nün 1996 yılında yayımladığı 63 numaralı çiftçi raporuna göre, balın pH değer aralığı 3.5–4.8 olarak belirlenmiş olup, bu değer aralığına uyum sağladığı görülmüştür.

Balın asidik yapısı, özellikle glükonolakton/glükonik asit dönüşümü gibi biyokimyasal süreçlerle şekillenmekte olup, balın olgunlaşma sürecinde bitki nektarlarının enzimatik etkiler sonucunda dönüşmesiyle meydana gelmektedir (Durmaz, 2020). Çalışmamızda analiz edilen bal örneklerinde toplam asitlik değeri 16.87 ile 19.77 meq/kg arasında değişmiş olup, ortalama 18.23 meq/kg olarak ölçülmüştür. Kayseri yöresine ait çiçek balları üzerinde yapılan bir çalışmada ise asitlik değeri 26.8 meq/kg olarak tespit edilmiştir (Uçkun ve Selli, 2012). Balın asidik yapısı, antioksidan ve antibakteriyel özelliklerini doğrudan etkileyerek doğal koruyuculuk sağlamaktadır (Sorkun vd., 2012).

Balın elektriksel iletkenlik değeri, içerdiği mineral maddeler, asitlik seviyesi ve protein miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Çiçek ballarının, salgı ballarına kıyasla daha düşük elektriksel iletkenliğe sahip olduğu bilinmektedir ve bu fark genellikle yaklaşık 18 kat daha az elektrik iletkenliği şeklinde rapor edilmektedir (Doğan, 2014). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği’ne (Tebliğ No: 2020/7) göre, çiçek ballarında elektriksel iletkenlik değeri en fazla 0.8 mS/cm olmalıdır. Çalışmamızda analiz edilen bal örneklerinin elektriksel iletkenlik değerleri 0.20 ile 0.34 mS/cm arasında değişmiş olup, bu değerler yasal sınırların altında bulunarak tebliğe uygunluk göstermektedir.

Elektriksel iletkenlik, balın mineral içeriği, protein kompozisyonu ve asitlik seviyesine bağlı olarak değişim göstermekte olup, bu değişim balın rengini de etkileyebilmektedir (Çetinkaya

vd., 2024). Bu bulgular, analiz edilen bal örneklerinin kimyasal özellikleri açısından uygun olduğunu ve kalite kriterleri doğrultusunda değerlendirildiğinde güvenilir sonuçlar sunduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, bal örneklerinin renk özellikleri CIELAB renk uzayı sistemine göre analiz edilmiş ve renk parametrelerine ait sonuçlar Tablo 15'de sunulmuştur. Renk tayininde, L* (parlaklık), a* (kırmızılık/yeşillik) ve b* (sarılık/mavilik) değerleri ölçülmüş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Renk değerlendirmelerinde, literatürde yaygın olarak kullanılan Lovibond kolorimetresi veya Pfund skalası referans alınmaktadır (Nakicioğlu ve Ötleş, 2015). Türk Gıda Kodeksi (TGK) ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) kriterlerine göre balın rengi, “su beyazından koyu kahverengiye kadar değişen” tonlarda olabilmektedir (Anonim, 2011).

Tablo 15. Bal Örneklerinde Renk Analiz Değerleri

Kod	L* (*)	a* (**)	b* (*)
768	35.62 ±0.09 ^b	-1.04 ±0.04 ^c	14.57 ±0.11 ^c
792	39.47 ±0.09 ^a	-2.79 ±0.03 ^d	19.22 ±0.12 ^a
793	34.71 ±0.10 ^c	-1.01 ±0.04 ^c	13.21 ±0.11 ^d
800	30.89 ±0.09 ^a	1.65 ±0.03 ^a	16.89 ±0.05 ^b
829	32.29 ±0.09 ^d	0.04 ±0.01 ^b	14.49 ±0.06 ^c

*: p≤0.01, **: p≤0.05,

L* değeri, balın parlaklığını ifade etmekte olup 0 ile 100 arasında değişir; 0 tam siyah, 100 ise tam beyaz bir yansımayı göstermektedir. a* değeri, balın kırmızı-yeşil eksenindeki konumunu belirtmekte olup, pozitif değerler kırmızı, negatif değerler ise yeşil tonlarını ifade eder. b* değeri ise sarı-mavi eksenindeki konumunu göstermekte olup, pozitif değerler sarı, negatif değerler ise mavi tonlarını temsil eder. Eğer a=0* ve b=0* ise balın rengi gri (renksiz) olarak tanımlanır (McGuire, 1992; Polatçı ve Tarhan, 2009).

Tablo 15'deki sonuçlara göre, en yüksek L* değeri (39.47) 792 kodlu bal örneğinde tespit edilmiştir. En düşük L* değeri ise 800 kodlu bal örneğinde 30.89 olarak ölçülmüştür. Ortalama L* değeri 34.60 olarak hesaplanmıştır. Varyans analizi sonuçları, bal türleri arasında L* değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunu göstermiştir (p<0.01).

En yüksek a* (kırmızılık) değeri 1.70 ile 800 kodlu bal örneğinde ölçülürken, en düşük a* değeri -2.84 ile 792 kodlu bal örneğinde bulunmuştur. b* (sarılık) değerleri açısından ise en yüksek değer 19.39 ile 792 kodlu balda, en düşük değer ise 13.33 ile 793 kodlu balda ölçülmüştür.

Bu analiz, farklı bal türlerinin renk parametreleri açısından birbirinden farklı özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Balın rengi, kaynağına, nektar türüne ve üretim süreçlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. L*, a* ve b* değerleri, balın görsel özelliklerinin ve tüketici tercihleri üzerindeki etkisinin belirlenmesinde önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir.

4.5. Bal Örneklerinin Prolizidin Alkaloidleri İçeriği

Prolizidin alkaloidlerin bitkiler tarafından kök ve sürgün gibi yapılarında üretildiği bilinmektedir (Hartmann ve Witte, 1995). PA türevleri, bitki kaynaklı nektar yoluyla bala geçiş yapabilir ve özellikle PANO (prolizidin alkaloid N-oksitleri) türleri, su içinde daha yüksek çözünürlüğe sahip oldukları için balda daha yaygın tespit edilmektedir. Buna karşın, bitki tohumlarında PA seviyelerinin daha yüksek olabileceği belirtilmiştir. Bunun nedeni, tohumların lipofilik yapısı nedeniyle PA bileşiklerini depolamak için uygun bir ortam sağlamasıdır.

Balın bileşiminde yer alan prolizidin alkaloidleri (PA), özellikle yabancı ot kaynaklı bitkilerden nektar alınması durumunda balda tespit edilebilen bileşiklerdir. Prolizidin alkaloidleri ve bunların oksitlenmiş türevleri (PANO), toksikolojik önemi nedeniyle balda dikkatle analiz edilmektedir.

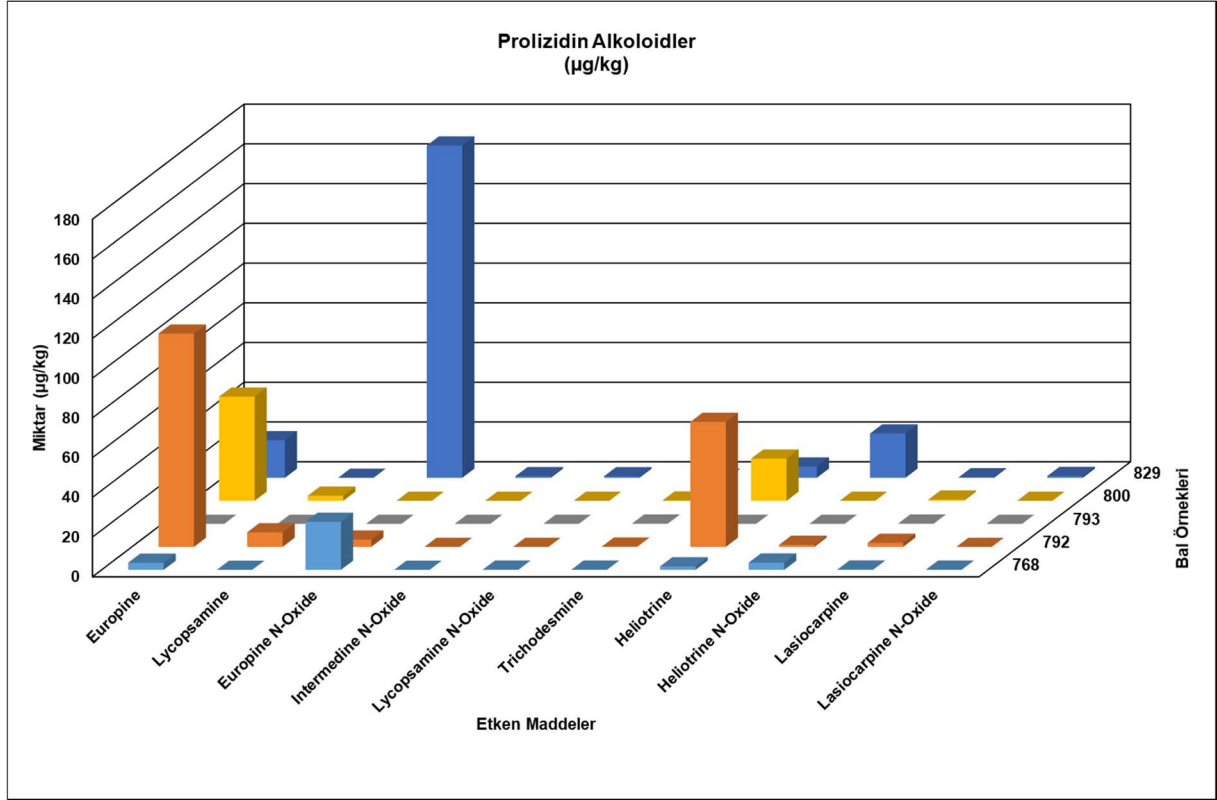
Çalışmamızda, 28 farklı prolizidin alkaloid bileşiği cihaz referans kütüphanesine tanımlanmış ve bal örneklerinde bu bileşiklerin varlığı detaylı bir şekilde incelenmiştir. Tablo 16 ve Şekil 13, analiz edilen bal örneklerinde tespit edilen temel prolizidin alkaloid (PA) bileşiklerinin konsantrasyonlarını göstermektedir. Prolizidin alkaloidleri toksikolojik açıdan önem taşıyan bileşikler olup, balın botanik kaynağı ve çevresel faktörler bu bileşiklerin çeşitliliğini ve miktarını etkileyebilmektedir. Buna göre;

Europine ve Europine N-Oxide: Tüm bal örneklerinde en yüksek konsantrasyonda bulunan alkaloid türleri arasında yer almaktadır. Özellikle 792 kodlu bal örneğinde

europine değeri 107.37 µg/kg, europine N-oxide ise 3.63 µg/kg olarak ölçülmüştür. 829 kodlu örnekte europine N-oxide seviyesi 167.28 µg/kg ile diğer örneklere göre belirgin şekilde yüksektir.

Tablo 5. Bal Örneklerinin Prolizidin Alkoloid İçerikleri

	Etken Maddeler	768	792	793	800	829	LOD	LOQ
1)	Monocrataline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
2)	Erucifoline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
3)	Monocrataline N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
4)	Europine	3.62	107.37	<LOQ	52.45	18.90	0.03	0.10
5)	Intermedine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
6)	Jacobine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
7)	Erucifoline N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
8)	Lycopsamine	<LOQ	7.32	<LOQ	2.57	<LOQ	0.03	0.10
9)	Jacobine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
10)	Europine N-Oxide	24.20	3.63	<LOQ	<LOQ	167.28	0.03	0.10
11)	Intermedine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.81	0.03	0.10
12)	Lycopsamine N-Oxide	0.10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.79	0.03	0.10
13)	Retrorsine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.46	1.39
14)	Trichodesmine	0.12	0.12	0.12	0.13	<LOQ	0.03	0.10
15)	Retrorsine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.04	0.12
16)	Heliotrine	1.76	62.91	<LOQ	21.22	5.67	0.03	0.10
17)	Seneciphylline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.48	1.45
18)	Seneciphylline N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
19)	Heliotrine N-Oxide	3.67	1.01	<LOQ	<LOQ	22.29	0.03	0.10
20)	Senecionine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.47	1.42
21)	Senecionine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.13	9.50
22)	Senecivernine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.18	0.54
23)	Senecivernine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.13	3.42
24)	Echimidine N-Oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
25)	Echimidine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.04	0.12
26)	Senkirkine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.03	0.10
27)	Lasiocarpine	0.16	2.05	0.12	0.62	0.26	0.03	0.10
28)	Lasiocarpine N-Oxide	0.13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.91	0.03	0.10
	TOPLAM	33.77	184.41	0.25	77.00	216.91		



Şekil 13. Bal Örneklerinin Prolizidin Alkoloid İçerikleri

Heliotrine ve Heliotrine N-Oxide: 792 kodlu örnekte heliotrine miktarı 62.91 µg/kg, 800 kodlu örnekte ise 21.22 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Heliotrine N-oxide değerleri de benzer şekilde farklı örneklerde yüksek seviyelerde ölçülmüştür (örneğin, 829 kodlu örnekte 22.29 µg/kg).

Lycopsamine ve Lycopsamine N-Oxide: Lycopsamine sadece 792 ve 800 kodlu örneklerde pozitif olarak tespit edilmiştir (sırasıyla 7.32 µg/kg ve 2.57 µg/kg). Lycopsamine N-oxide ise 768 ve 829 kodlu bal örneklerinde düşük seviyelerde bulunmaktadır.

Trichodesmine: Bu bileşik tüm bal örneklerinde benzer şekilde LOQ (Limit of Quantification) seviyesine yakın bulunmuştur.

Lasiocarpine ve Lasiocarpine N-Oxide: 792 kodlu örnekte lasiocarpine seviyesi 2.05 µg/kg olarak belirlenmiştir. Lasiocarpine N-oxide ise 829 kodlu örnekte 0.91 µg/kg ile kaydedilmiştir.

Tüm örneklerde farklı PA türlerinin miktarları değişiklik göstermekte olup, en yüksek toplam PA içeriği 829 kodlu örnekte 216.91 µg/kg olarak ölçülmüştür. Ancak bu değer, Avrupa Birliği'nin belirlediği maksimum kalıntı limiti olan 500 µg/kg'ın altında kalmıştır. PA seviyeleri, balın kaynağı olan bitki türlerine, çevresel faktörlere ve arıların beslendiği flora ya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca N-oxide türevlerinin, suda daha yüksek çözünürlük göstermesi nedeniyle örneklerde sıkça tespit edilmesi literatürle uyumludur.

Bu bulgular, analiz edilen bal örneklerinin prolizidin alkaloid içeriklerinin uluslararası sınır değerler içerisinde olduğunu ve güvenli tüketim sınırları dahilinde değerlendirilebileceğini göstermektedir. Ancak, bazı alkaloid türlerinin daha yüksek tespit edildiği örneklerin, bitkisel kaynağı ve çevresel faktörler açısından daha detaylı incelenmesi önerilmektedir.

Bu bulgular, bölgedeki bitki çeşitliliğinin ve ekolojik koşulların, özellikle bazı yabancı ot türlerinin PA bileşiklerinin bal örneklerine geçişinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, PA içerikleri arasındaki varyasyon, balın kaynağı, üretim yöntemi ve bitkisel flora farklılıklarına bağlı olarak değişim gösterebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezi kapsamında Çukurova bölgesinden temin edilen çiçek balı örneklerinin kalite kriterleri detaylı bir şekilde incelenmiş ve özellikle pirolizidin alkaloidlerinin (PA) içeriklerinin belirlenmesine odaklanılmıştır. Bulgular, bal örneklerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen sınır değerlere büyük oranda uyumlu olduğunu göstermiştir. Balın fizikokimyasal özellikleri (nem, pH, iletkenlik, asitlik vb.), şeker profili (fruktoz, glikoz, sakkaroz) ve enzim içerikleri (diastaz, prolin) analiz edilmiş ve sonuçlar ulusal ve uluslararası standartlar ile kıyaslanmıştır.

Bal örneklerinde diastaz aktivitesinin düşük seviyelerde olduğu bazı örnekler gözlemlenmiş ancak genel olarak kabul edilebilir aralıklarda olduğu saptanmıştır. Hidroksimetilfurfural (HMF) değerlerinin düşük olması, balların uygun koşullarda muhafaza edildiğini ve taze olduğunu göstermektedir. Ayrıca, karbon izotop analizi ile yapılan değerlendirmeler, örneklerde C4 bitki kaynaklı şeker ilavesi olmadığını ortaya koymuştur. Ancak, pirolizidin alkaloid (PA) analizinde bazı örneklerde yüksek PA türleri tespit edilmiştir.

Yapılan analizler, Çukurova bölgesinden elde edilen çiçek balı örneklerinin tamamında farklı seviyelerde pirolizidin alkaloidlerinin (PA) bulunduğunu ortaya koymuştur. Araştırmada kullanılan “BfR-PA-Honey-1.0/2013” yöntemi, bal örneklerinde pirolizidin alkaloidlerinin varlığını ve miktarını doğru ve güvenilir bir şekilde tespit etmede oldukça başarılı olmuştur. Bu yöntem, bal gibi kompleks matrislerde toksik bileşenlerin analitik olarak belirlenmesi açısından önemli bir standart niteliği taşımaktadır.

Elde edilen bulgulara göre, çiçek ballarında tespit edilen pirolizidin alkaloid konsantrasyonları örnekler arasında değişiklik göstermiştir. Özellikle 829 kodlu bal örneğinde PA düzeyleri diğer örneklerle kıyasla daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen, bu değerler Avrupa Birliği tarafından belirlenen maksimum kalıntı limiti olan 500 µg/kg seviyesinin altında kalmıştır. Bu sonuç, bölgedeki flora çeşitliliğinin ve çevresel faktörlerin arıların topladığı nektar bileşimine etkisini ortaya koymaktadır.

Buna karşın, 793 kodlu bal örneğinde pirolizidin alkaloidleri LOQ (Limit of Quantification – Miktar Tayini Alt Limiti) seviyesine yakın tespit edilmiş olup, neredeyse ölçülemeyecek kadar

düşük miktarda bulunmuştur. Diğer örneklerde ise belirgin düzeylerde alkaloid bileşikler saptanmıştır. Bu varyasyon, arıların beslendiği bitki türlerinin değişkenliği ile ilişkilendirilebilir ve farklı bölgesel kaynakların alkaloid düzeylerine etkisi olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışma, Çukurova bölgesine ait çiçek ballarındaki prolizidin alkaloid konsantrasyonlarının ilk kez kapsamlı bir şekilde incelendiği bir araştırma olması bakımından önem arz etmektedir. Prolizidin alkaloidlerinin özellikle bitkisel kaynaklı gıdalarda potansiyel toksik etkiler gösterebileceği göz önüne alındığında, bu tür çalışmaların, gıda güvenliği ve halk sağlığını koruma açısından değerli katkılar sunduğu açıktır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, bal üretiminde prolizidin alkaloid kaynaklı risklerin azaltılması ve üretim süreçlerinin iyileştirilmesi amacıyla aşağıdaki önerilerde bulunulabilir:

- Bal Üretim Alanlarında Flora Kontrolü: Bölgedeki yabani ot türlerinin yayılımının kontrol altına alınması, arıların toksik alkaloid içeren bitkilerden nektar toplamasını azaltabilir. Bu kapsamda, üretim alanlarının bitki çeşitliliği açısından düzenli olarak izlenmesi önerilmektedir.
- Prolizidin Alkaloid İzleme Programları: PA içeriği yüksek olan bitki türlerinin bal üretim süreçlerine etkisini incelemek için düzenli analiz programları oluşturulmalıdır. Bu programlar, üreticilere ve denetleyici kurumlara rehberlik edebilir.
- Analitik Yöntemlerin Yaygınlaştırılması: Bu çalışmada kullanılan “BfR-PA-Honey-1.0/2013” gibi gelişmiş analitik yöntemlerin, gıda güvenliği laboratuvarlarında rutin olarak kullanılması sağlanmalıdır. Böylece bal üretiminde standart bir kalite kontrol mekanizması oluşturulabilir.
- Üreticilere Eğitim Programları: Bal üreticilerinin, prolizidin alkaloidleri ve bunların potansiyel sağlık etkileri konusunda bilinçlendirilmesi amacıyla eğitim programları düzenlenmelidir. Bu programlar, üretim süreçlerinde daha bilinçli kararlar alınmasına olanak tanıyacaktır.

- Tüketici Farkındalığı: Tüketicilerin güvenilir ve analiz edilmiş bal ürünlerine ulaşabilmesi için farkındalık kampanyaları düzenlenmelidir. Sertifikalı ve laboratuvar analizlerinden geçmiş ürünlerin tercih edilmesi teşvik edilmelidir.
- Ulusal Standartların Geliştirilmesi: Türkiye'nin bal üretiminde dünya pazarında rekabet gücünü artırmak amacıyla prolizidin alkaloid seviyelerinin düzenli izlenmesi ve ulusal limit değerlerin belirlenmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak, bu araştırma, bal kalitesinin korunması ve halk sağlığının güvence altına alınması için prolizidin alkaloidlerinin analiz edilmesinin önemini vurgulamaktadır. Çalışmadan elde edilen bulgular, gelecekteki araştırmalara referans niteliğinde olabilecek veriler sunarak, gıda güvenliği alanında standartların geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

KAYNAKÇA

- Abdulwahid, A., Chamunorwa, J.P., & Erlwanger, K.H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism*, 9(61). Retrieved from Nutrition and Metabolism.
- Açar, Ö. Ç., Kırış, S., Diler, F., Avcı, A. 2015. “Headspace-Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (HS-GC/MS) Yöntemi ile Balda Naftalin Analizi – Metot Optimizasyonu ve Validasyonu”, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı Bölümü, Pestisit Birimi Yenimahalle/Ankara.
- Ajibola, A., et al. (2015). Novel insights into the health importance of natural honey. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 22(5), 7-22.
- Al-Subaie, S. F., Alowaifeer, A. M., & Mohamed, M. E. (2022). Pyrrolizidine alkaloid extraction and analysis: Recent updates. *Foods*, 11(3873). <https://doi.org/10.3390/foods11233873>
- Alvarado-Avila, L. Y., Moguel-Ordóñez, Y. B., García-Figueroa, C., Ramírez-Ramírez, F. J., & Arechavaleta-Velasco, M. E. (2022). Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en miel y los efectos de su consumo en humanos y abejas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 787–802. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.6004>.
- Anonim, 2011. Muğla Tarım İl Müdürlüğü Kayıtları
- Barel, S., Shimshoni, J. A., Kalev, H., Msemo, S. E., Girisgin, A. O., Aydın, L., Dübecke, A., Mulder, P. P. J. 2017. “Analysis of Israeli, Turkish, Cyprian, Tanzanian and New Zealand (Manuka) Honeys for Pyrrolizidine Alkaloids”, 45th Apimondia International Apicultural Congress, Istanbul/Turkey.
- Belli, T. (2019). Muğla ilinde üretilen balların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Beuerle, T., Kempf, M., Wittig, M., Reinhard, A., von der Ohe, K., & Schreier, P. (2010). Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Comparison of analytical methods. *Food Additives and Contaminants*. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.521772>
- Beyoğlu, D., & Omurtag, G. Z. (2007). Occurrence of naphthalene in honey consumed in Turkey as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1735-1738.
- BfR. 2011. “Chemical analysis and toxicity of pyrrolizidine alkaloids and assessment of the health risks posed by their occurrence in honey”, BfR opinion No. 038/2011.

- Bogdanov, S. (2009). "Harmonised Methods of the International Honey Commision", Bee Product Science, 5, 1-63.
- Brugnerotto, P., Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Gonzaga, L. V., Fett, R., Costa, A. C. O. 2021. "Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review", Food Chemistry, 342 (September 2020), 1-18.
- Brugnerotto, P., et al. (2021). Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review. Food Chemistry, 342, 128384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128384>.
- Bulut, S. 2021. "Pediatri hastalarında gaz sancısında kullanılan bitkisel ürünlerde pirolizidin alkaloit kontaminasyonlarının değerlendirilmesi", Gazi Üniversitesi.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Akyuz Turumtay, E., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. Food Chemistry, 180, 133–141.
- Caner C. 2010. Bazı Özel Gıdalar Ėle Fermente Gıdaların Kalite Kontrolü. AÜ, Açık. Öğretim Fak, 2069, 1103(4).
- Casado, N., Morante-Zarcero, S., Sierra, I. 2022. "The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview", Trends in Food Science and Technology, 120, 123–139.
- Casado, N., Morante-Zarcero, S., & Sierra, I. (2022). The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 123–139. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.007>.
- Codex Alimentarius. (2001). "Standard For Honey Cxs 12-1981", 11, 1–8.
- Cortés, M.E., Vigil, P., & Montenegro, G. (2011). The medicinal value of honey: A review on its benefits to human health. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(2), 303-317.
- Crittenden, A.N. (2011). The importance of honey consumption in human evolution. *Food and Foodways*, 19(4), 257-273. DOI: 10.1080/07409710.2011.630618.
- Çetin K, Alkın E, Uçurum HÖ (2011) Piyasada Satılan Çiçek Ballarının Kalite Kriterlerinin Belirlenmesi. Gıda ve Yem Bilim Teknol Derg 11:49–56
- Çetinkaya, T., Karacaoğlan, V., & Oguzkan, S. B. (2024). Kastamonu Yöresinde Üretilen Gökmar Kozalak Pekmez ve Sıvı Şuruplarının Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Karşılaştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 27(3), 685-694.
- Çiftçi, M. (2018). Konya bölgesindeki marketlerde satılan farklı ticari çiçek ballarının bazı kimyasal özelliklerinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygunluğunun araştırılması.

- De Jesus Inacio, L., Merlanti, R., Lucatello, L., Bisutti, V., Contiero, B., Serva, L., Segato, S., Capolongo, F. 2020. "Pyrrolizidine alkaloids in bee pollen identified by LC-MS/MS analysis and colour parameters using multivariate class modeling", *Heliyon*, 6(3), e03593.
- Doğan, H. (2014). Çiçek Ballarının Kimyasal Fiziksel ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi (Doctoral dissertation).
- Dranca, F., Ropciuc, S., Pauliuc, D., Oroian, M. 2022. "Honey adulteration detection based on composition and differential scanning calorimetry (DSC) parameters", *Lwt*, 113910.
- Dreger, M., et al. (2009). Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety, and perspectives of medicinal usage. *Polish Journal of Chemistry*, 55(4), 128–136.
- Dreger, M., Stanisławska, M., Krajewska-Patan, A., Mielcarek, S., Mikołajczak, P. Ł., & Buchwald, W. (2009). Pyrrolizidine alkaloids—Chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety, and perspectives of medicinal usage. *Phytochemistry*, 55(4), 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.11.004>.
- Durmaz, N. E. (2020). Çiçek Ballarının Fenolik Bileşik ve Aroma Bileşenleri Üzerine Araştırma (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi (Turkey)).
- Dübecke, A., Beckh, G., & Lüllmann, C. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. *Food Additives and Contaminants*, 28(3), 348–358.
- Edgar, J. A., Molyneux, R. J., Colegate, S. M. 2015. "Pyrrolizidine alkaloids: Potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease", *Chemical Research in Toxicology*, 28 (1), 4–20.
- Edgar, J. A., Roeder, E., Molyneux, R. J. 2002. "Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2719–2730.
- Edgar, J. A., Roeder, E., & Molyneux, R. J. (2002). Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potential threat to health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2719–2730.
- EFSA. 2011. "Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed; Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed", *EFSA Journal*, 9134 (91110), 1–134.
- EFSA. 2016. "Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population", *EFSA Journal*, 14 (8).

- EFSA. 2017. “Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements”, EFSA Journal, 15 (7).
- EFSA. 2020. “COMMISSION REGULATION (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs”, Official Journal of the European Union, 420 (1), 1–5.
- European Council ve European Parliament. 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 Communities, L164 (May), 1–5.
- Fu, P. P., Yang, Y. C., Xia, Q., Chou, M. W., Cui, Y. Y., Lin, G. 2002. “Pyrrolizidine alkaloids - Tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements”, Journal of Food and Drug Analysis, 10 (4), 198–211.
- Gürbüz, M. N. S. 2021. “Takviye edici gıdalarda ve bitkisel çaylarda pirolizidin alkaloidlerinin miktar tayini ve toksikolojik açıdan değerlendirilmesi”. Gazi Üniversitesi.
- Huang Z, Liu L, Li G, et al (2019) Nondestructive determination of diastase activity of honey based on visible and near-infrared spectroscopy. Molecules 24:. <https://doi.org/10.3390/molecules24071244>
- Jansons, M., Fedorenko, D., Pavlenko, R., Berzina, Z., Bartkevics, V. 2022. “Nanoflow liquid chromatography mass spectrometry method for quantitative analysis and target ion screening of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal tinctures, and milk”, Journal of Chromatography A, 1676, 463269.
- Joosten, L., & van Veen, J. A. (2011). Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. Phytochemistry Reviews, 10(2), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9204>.
- Kalač, P. ve Kaltner, F. 2021. “Pyrrolizidine alkaloids of European Senecio/Jacobaea species in forage and their carry-over to milk: A review”, Animal Feed Science and Technology, 280 (August).
- Kempf, M., Beuerle, T., & Schreier, P. (2008). Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Molecular Nutrition & Food Research, 52(11), 1193–1200.
- Kempf, M., Reinhard, A., & Beuerle, T. (2010). Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. Molecular Nutrition & Food Research, 54(2), 158–168.

- Kowalczyk, E. ve Kwiatek, K. 2018. "Pyrrolizidine alkaloids in honey: Determination with liquid chromatography-mass spectrometry method", *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 62 (2), 173–181.
- Kowalczyk, E., & Kwiatek, K. (2022). Simultaneous determination of pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Veterinary Research*, 66, 235-243. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0032>
- McGuire, R.G., 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27, 1254-1255.
- Nakilcioğlu E. & Ötleş S. (2015). Yüzyılları Deviren Organik Bir Gıda Bal. *Dünya Gıda Dergisi*, 25 Şubat 2015.
- Ozansoy, G. ve Küplülü, Ö. 2017. "Importance of Pyrrolizidine Alkaloids in Bee Products", *Mellifera*, 17 (1), 1–8.
- Parlak, N. 2009. "Pirolizidin alkaloidinin neden olduğu hepatotoksisitede nükleer faktör kappa B inhibitörü Pirolidin Ditiyokarbamat'ın koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesi". Abant İzzet Baysal Üniversitesi.
- Peloso, M., Minkoumba Sonfack, G., Paduano, S., De Martino, M., De Santis, B., & Caprai, E. (2023). Pyrrolizidine alkaloids in food on the Italian market. *Molecules*, 28(5346). <https://doi.org/10.3390/molecules28145346>.
- Picron, J. F., Herman, M., Van Hoeck, E., Gosciny, S. 2020. "Monitoring of pyrrolizidine alkaloids in beehive products and derivatives on the Belgian market", *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (6), 5693–5708.
- Polatcı, H., & Tarhan, S. (2009). Farklı Kurutma Yöntemlerinin Reyhan (*Ocimum Basilicum*) Bitkisinin Kuruma Süresine Ve Kalitesine Etkisi. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 2009(1), 61-70.
- Radomska-Pandya, A., Falany, J. L., Cook, I. T., Bratton, S. M., Le, V.-H., Yiew, K. H., Gallus-Zawada, A., Falany, C. N., Moran, J. H. 2010. "Comparison of biotransformation of hydroxylated warfarins (OHWars) by human sulfotransferases (SULTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)", *Drug Metabolism Reviews*, 42 (sup1), 1–323.
- Rasyiid, M. ve Susandarini, R. 2020. "Pollen diversity and secondary metabolites in honey produced by *Apis dorsata binghami* from Central Sulawesi, Indonesia", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9 (2), 2305–2309.
- Reinhard, A., Janke, M., von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P., Beuerle, T. 2009. "Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine

- alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*)”, *Journal of Chemical Ecology*, 35 (9), 1086–1095.
- Rizzo, S., Celano, R., Campone, L., Rastrelli, L., Piccinelli, A. L. 2022. “Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction for the rapid and simple simultaneous analysis of pyrrolizidine alkaloids and related N-oxides in honey and pollen”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 108 (October 2021), 104457.
- Rizzo, S., Celano, R., Piccinelli, A. L., Russo, M., & Rastrelli, L. (2023). Target screening method for the quantitative determination of 118 pyrrolizidine alkaloids in food supplements, herbal infusions, honey and teas by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 423, 136306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136306>
- Robertson, J., & Stevens, K. (2014). Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/c0xx00000x>.
- Roncada, P., Isani, G., Peloso, M., Dalmonte, T., Bonan, S., & Caprai, E. (2023). Pyrrolizidine alkaloids from monofloral and multifloral Italian honey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(7), 5410.
- Scepankova, H., Saraiva, J.A., & Estevinho, L.M. (2017). Honey health benefits and uses in medicine. In J.M. Alvarez-Suarez (Ed.), *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Springer.
- Schoental, R. 1959. “Liver Lesions In Young Rats Suckled By Mothers Treated With The Pyrrolizidine (Senecio) Alkaloids, Lasiocarpine And Eetorsine”, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 77, 485–495.
- Se, K. W., Wahab, R. A., Syed Yaacob, S. N., Ghoshal, S. K. 2019. “Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 80, 16–32.
- Seremet, O. C., Olaru, O. T., Gutu, C. M., Nitulescu, G. M., Ilie, M., Negres, S., Zbarcea, C. E., Purdel, C. N., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Coleman, M. D., Margina, D. M. 2018. “Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models”, *Molecular Medicine Reports*, 17 (6), 7757–7763.
- Smith, L. W. ve Culvenor, C. C. J. 1981. “Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids”, *Journal of Natural Products*, 44 (2), 129–152.
- Sorkun, H. ve Doğan, C. 1995. “Pollen analysis of Rize-Anzer (Turkish) honey”, *Apiacta*, 3, 1–7.

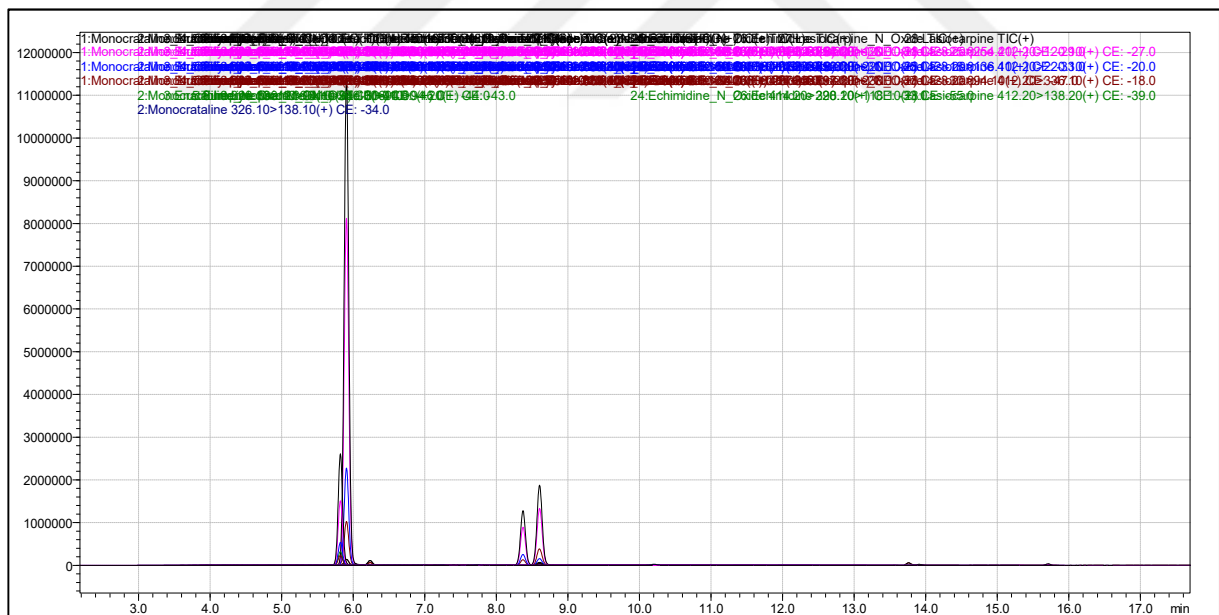
- Sorkun, K., Yılmaz, B., Özkırım, A., Özkök, A., Gençay, Ö., 2012. Yaşam İçin Arılar. Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği Yay. No:5. Önder Matbaacılık, Ankara, 135 s
- Şahinler, N., Şahinler, S. ve Gül, A. 2001. Hatay yöresi ballarının bileşimi ve biyokimyasal analizi. MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 6(1-2), 93-108
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, (1996). Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/etae/Belgeler/EgitimBrosur/63-ciftcibro.pdf>
- Tábuas, B., Cruz Barros, S., Diogo, C., Cavaleiro, C., & Sanches Silva, A. (2024). Pyrrolizidine alkaloids in foods, herbal drugs, and food supplements: Chemistry, metabolism, toxicological significance, analytical methods, occurrence, and challenges for future. *Toxins*, 16(79). <https://doi.org/10.3390/toxins16020079>.
- Tanrıöver, G. 2022. “Anne sütü arttırıcı bitki çaylarında pirolizidin alkaloitlerinin tayini”, Gazi Üniversitesi.
- Tarım ve Orman Bakanlığı. 2021. “Türkiye Arıcılık İstatistikleri (1991-2021)”, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/aricilik/Link/2/Aricilik-Istatistikleri>. Son erişim tarihi: 24.03.2022.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023. “Ürün Raporu Arıcılık (2023)”. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/2023%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/Ar%C4%B1c%C4%B1l%C4%B1k%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporu%202023-370%20TEPGE.pdf>. 30 s.
- TGK, 2020. “Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ no: 2020/7)”, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>. Son erişim tarihi: 22.04.2020.
- Tosuno H (2016) Bursa İlinde Satışa Sunulmuş Balların Naftalin Kalıntısı Yönünden İncelenmesi. Araştırma Makal 15:41–46
- TSE. 2007. “TS 13262. Balda bitki şekerleri (c4) tayini - Sürekli akış metodu”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008a. “TS 13365 Bal-Su muhtevası tayini – Refraktometrik metot”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008b. “TS 13359. Bal-Fruktoz, glukoz, sakaroz, turanoz ve maltoz muhtevası tayini - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (hplc) metodu”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.

- TSE. 2008c. “TS 13360. Bal-Serbest asit muhtevasının tayini”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008d. “TS 13366. Bal - Elektrik iletkenliği tayini”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008e. “TS 13364. Bal-Diastaz aktivitesi tayini”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008f. “TS 13356. Balda hidroksimetilfurfural muhtevasının tayini - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (hplc) metodu”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2008g. “TS 13357. Balda prolin muhtevasının tayini”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- TSE. 2010. “TS 3036. Bal”, Türk Standartları Enstitüsü Necatibey cd. No:112 Bakanlıklar Ankara/Turkey.
- Uçkun, O., & Selli, S. (2012). Kayseri ili çiçek balının aroma maddeleri bileşimi. *Gıda*, 37(3), 157-164.
- Uçurum H.Ö., Tepe Ş., Yeşil E., et al (2023) Characterization of Turkish pine honey according to their geographical origin based on physicochemical parameters and chemometrics. *Eur Food Res Technol* 249:. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04215-y>
- Wang, T., et al. (2019). Pyrrolizidine alkaloids in honey: Quantification with and without standards. *Food Control*, 98, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.033>.
- Wang, X., Chen, Y., Hu, Y., Zhou, J., Chen, L., & Lu, X. (2022). Systematic review of the characteristic markers in honey of various botanical, geographic, and entomological origins. *ACS Food Science & Technology*, 2(2). <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00422>.
- Xu, J., Wang, W., Yang, X., Xiong, A., Yang, L., & Wang, Z. (2019). Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism. *Liver Research*, 3(3-4), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.11.004>.
- Yavarik Alvarado-Avila, L., et al. (2022). Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en miel y los efectos de su consumo en humanos y abejas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 787–802. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.6004>.

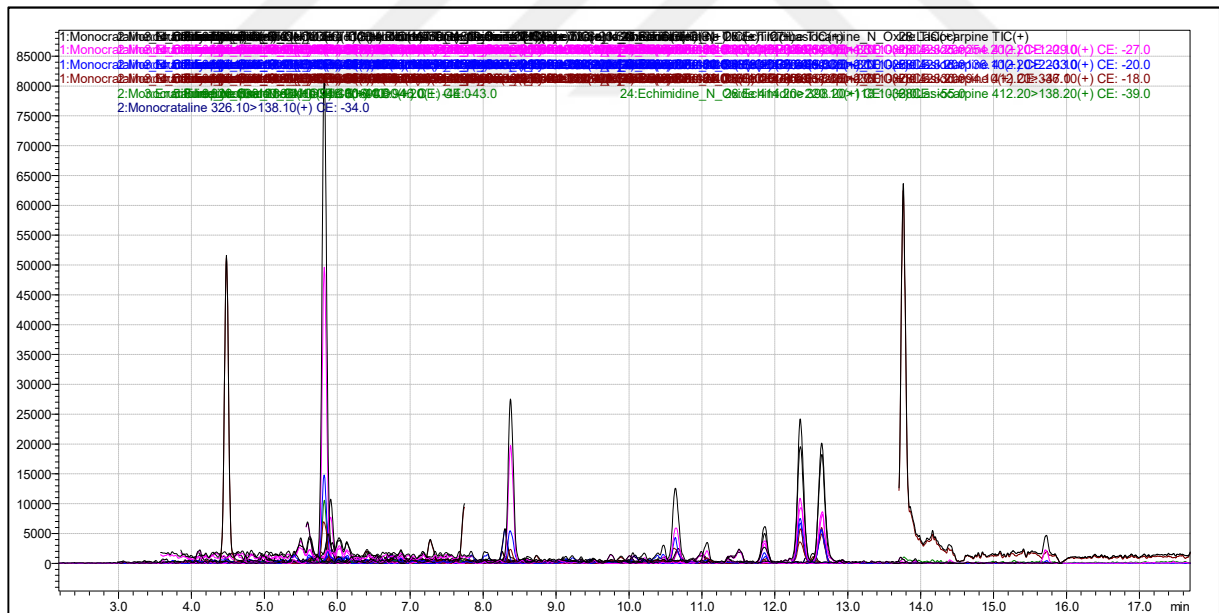
EKLER

Ek-1	*20ppb prolizidin alkolidleri mix TIC kromatogramı
Ek-2	*768 numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-3	*792 numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-4	*793 numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-5	*800 numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-6	*829 numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-7	*793+std numaralı numune TIC kromatogramı
Ek-8	* Monocrataline kalibrasyon eğrisi
Ek-9	* Erucifoline kalibrasyon eğrisi
Ek-10	* Monocrataline N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-11	*Europine kalibrasyon eğrisi
Ek-12	* Intermedine kalibrasyon eğrisi
Ek-13	*Jacobine kalibrasyon eğrisi
Ek-14	* Erucifoline N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-15	* Lycopsamine kalibrasyon eğrisi
Ek-16	* Jacobine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-17	* Europine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-18	* Intermedine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-19	* Lycopsamine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-20	* Retrorsine kalibrasyon eğrisi
Ek-21	* Trichodesmine kalibrasyon eğrisi
Ek-22	* Retrorsine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-23	* Heliotrine kalibrasyon eğrisi
Ek-24	*Seneciphylline kalibrasyon eğrisi
Ek-25	*Seneciphylline N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-26	*Heliotrine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-27	*Senecionine kalibrasyon eğrisi
Ek-28	*Senecionine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-29	*Senecivernine kalibrasyon eğrisi
Ek-30	*Senecivernine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-31	*Echimidine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-32	*Echimidine kalibrasyon eğrisi
Ek-33	*Senkirkine kalibrasyon eğrisi
Ek-34	*Lasiocarpine kalibrasyon eğrisi
Ek-35	*Lasiocarpine N-Oxide kalibrasyon eğrisi
Ek-36	*Hmf Std Kromatogramı (25ppb)
Ek-37	*768-1 Sonuc Kromatogramı
Ek-38	*792 Sonuc Kromatogramı
Ek-39	*793 Sonuc Kromatogramı
Ek-40	*800 Sonuc Kromatogramı
Ek-41	*829 Sonuc Kromatogramı
Ek-42	*Hmf Kalibrasyon Eğrisi
Ek-43	*768 Seker Kromatogramı
Ek-44	*792 Seker Kromatogramı
Ek-45	*793 Seker Kromatogramı
Ek-46	*800 Seker Kromatogramı
Ek-47	*829 Seker Kromatogramı
Ek-48	*Fruktoz Kalibrasyonu
Ek-49	*Glikoz Kalibrasyonu
Ek-50	*Sakkaroz Kalibrasyonu
Ek-51	*Maltoz Kalibrasyonu
Ek-52	*Naftalin Kalibrasyonu
Ek-53	*Naftalin std(25ppb) Kromatogramı
Ek-54	*768 naftalin kromatogramı
Ek-55	*792 naftalin kromatogramı
Ek-56	*793 naftalin kromatogramı
Ek-57	*800 naftalin kromatogramı
Ek-58	*829 naftalin kromatogramı

[illegible]**Ek-2**

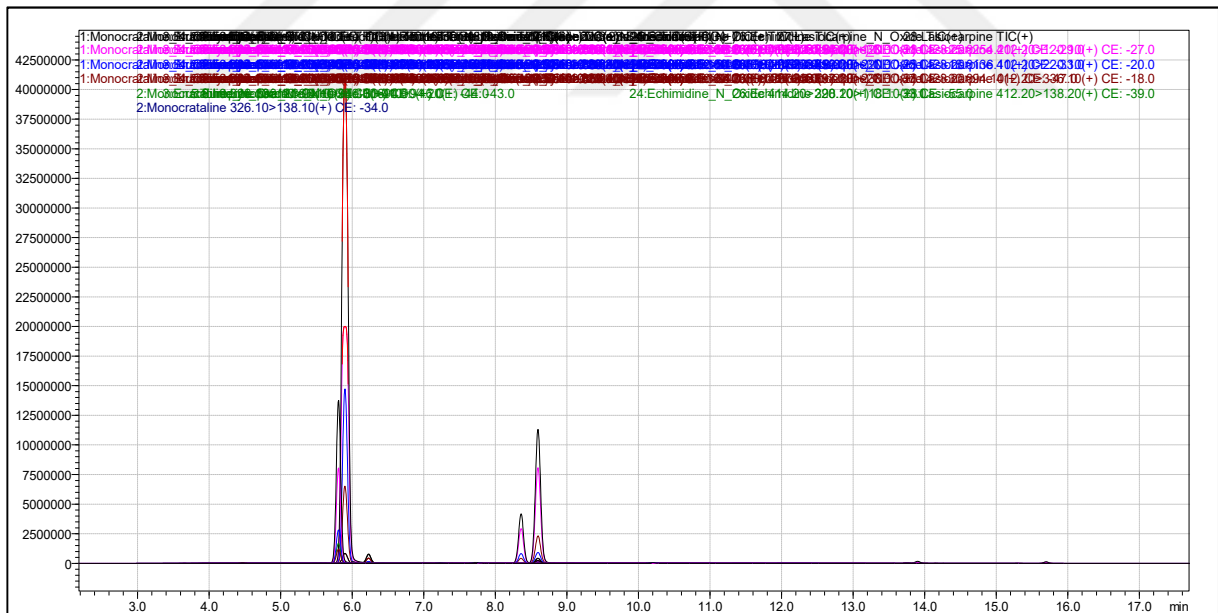
79

[illegible]**Ek-4**

80

Chromatogram showing detector response over time (min) for various compounds. The x-axis ranges from 3.0 to 17.0 minutes. The y-axis ranges from 0 to 37,500,000. Major peaks are labeled with compound names and retention times.

Compound	Retention Time (min)	CE
1: Monocrataline	326.10	-34.0
2: Monocrataline	326.10	-34.0
24: Echimidine_N	8.20	-39.0
2: Monocrataline	15.60	-39.0

Ek-6

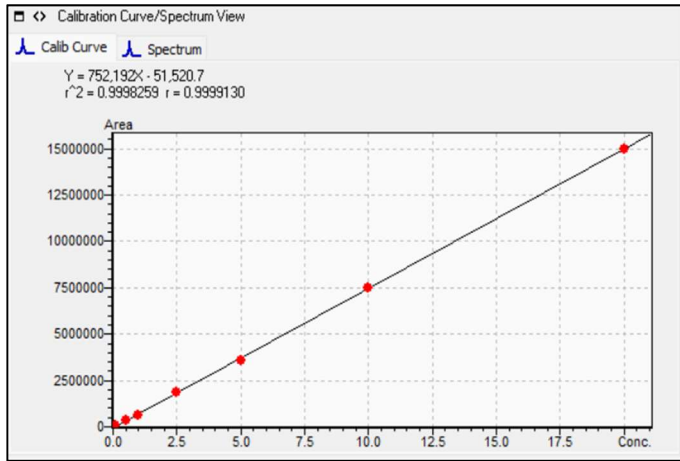
81

Chromatogram showing the separation of various compounds over time. The x-axis represents time in minutes (min) from 3.0 to 17.0. The y-axis represents intensity from 0 to 1,100,000. Multiple peaks are visible, with the most prominent ones around 8.5, 10.5, 12.5, 14.5, and 16.5 minutes. The peaks are color-coded: black, blue, green, red, and purple. A legend at the top identifies the compounds and their retention times and CE values.

Compound	Retention Time (min)	CE
1: Monocratraline	326.10	-34.0
2: Monocratraline	326.10	-34.0
3: Monocratraline	326.10	-34.0
4: Monocratraline	326.10	-34.0
5: Monocratraline	326.10	-34.0
6: Monocratraline	326.10	-34.0
7: Monocratraline	326.10	-34.0
8: Monocratraline	326.10	-34.0
9: Monocratraline	326.10	-34.0
10: Monocratraline	326.10	-34.0
11: Monocratraline	326.10	-34.0
12: Monocratraline	326.10	-34.0
13: Monocratraline	326.10	-34.0
14: Monocratraline	326.10	-34.0
15: Monocratraline	326.10	-34.0
16: Monocratraline	326.10	-34.0
17: Monocratraline	326.10	-34.0
18: Monocratraline	326.10	-34.0
19: Monocratraline	326.10	-34.0
20: Monocratraline	326.10	-34.0
21: Monocratraline	326.10	-34.0
22: Monocratraline	326.10	-34.0
23: Monocratraline	326.10	-34.0
24: Echimidine	412.20	-39.0
25: Echimidine	412.20	-39.0
26: Echimidine	412.20	-39.0
27: Echimidine	412.20	-39.0
28: Echimidine	412.20	-39.0
29: Echimidine	412.20	-39.0
30: Echimidine	412.20	-39.0
31: Echimidine	412.20	-39.0
32: Echimidine	412.20	-39.0
33: Echimidine	412.20	-39.0
34: Echimidine	412.20	-39.0
35: Echimidine	412.20	-39.0
36: Echimidine	412.20	-39.0
37: Echimidine	412.20	-39.0
38: Echimidine	412.20	-39.0
39: Echimidine	412.20	-39.0
40: Echimidine	412.20	-39.0
41: Echimidine	412.20	-39.0
42: Echimidine	412.20	-39.0
43: Echimidine	412.20	-39.0
44: Echimidine	412.20	-39.0
45: Echimidine	412.20	-39.0
46: Echimidine	412.20	-39.0
47: Echimidine	412.20	-39.0
48: Echimidine	412.20	-39.0
49: Echimidine	412.20	-39.0
50: Echimidine	412.20	-39.0

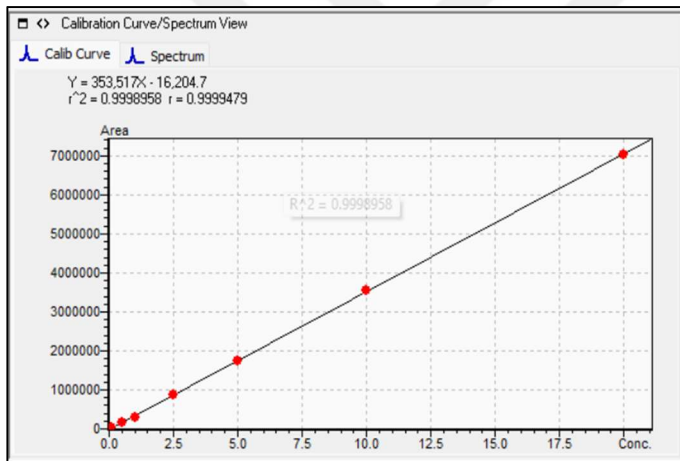
82

Ek-8



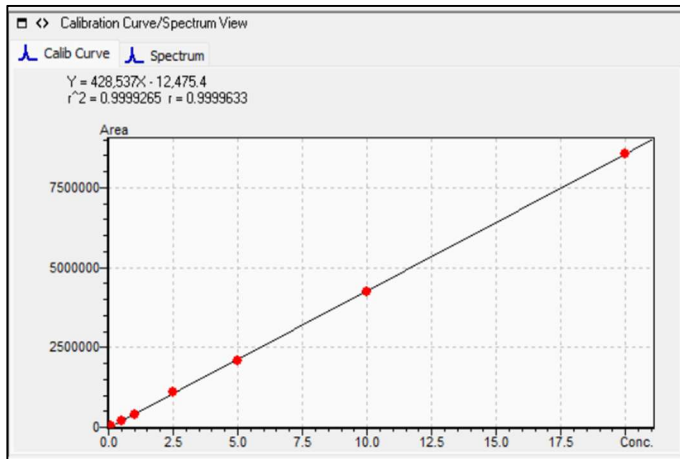
* Monocrataline kalibrasyon eğrisi

Ek-9



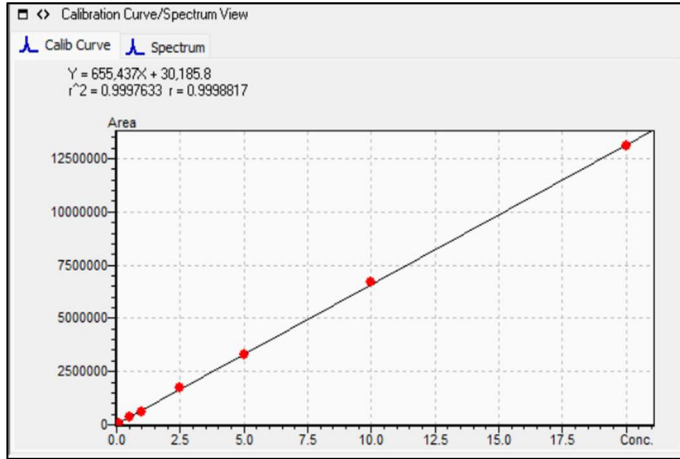
* Erucifoline kalibrasyon eğrisi

Ek-10



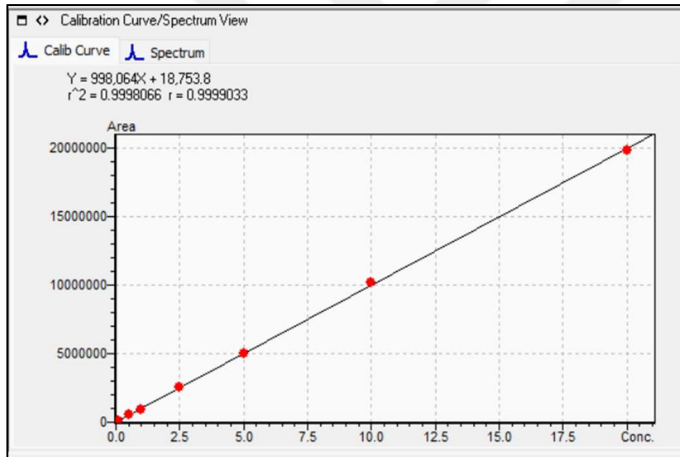
* Monocrataline N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-11



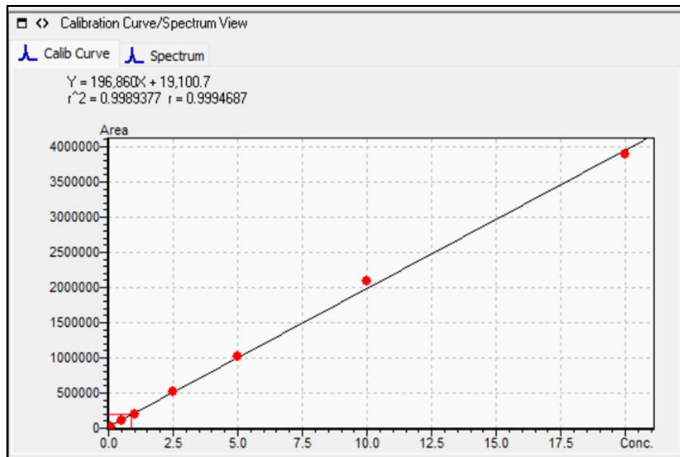
*Europine kalibrasyon eğrisi

Ek-12



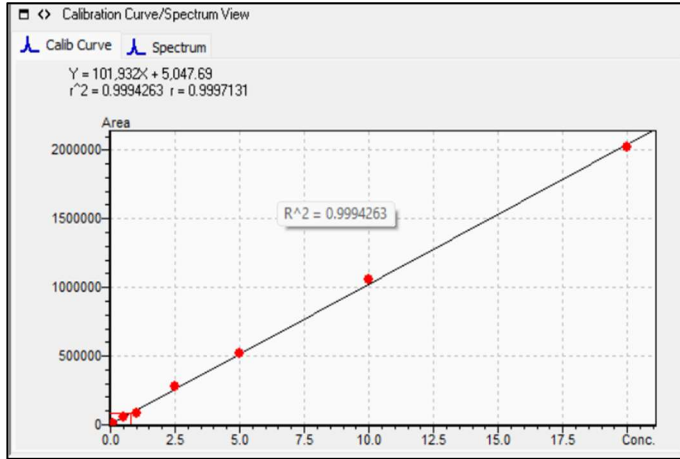
* Intermedine kalibrasyon eğrisi

Ek-13



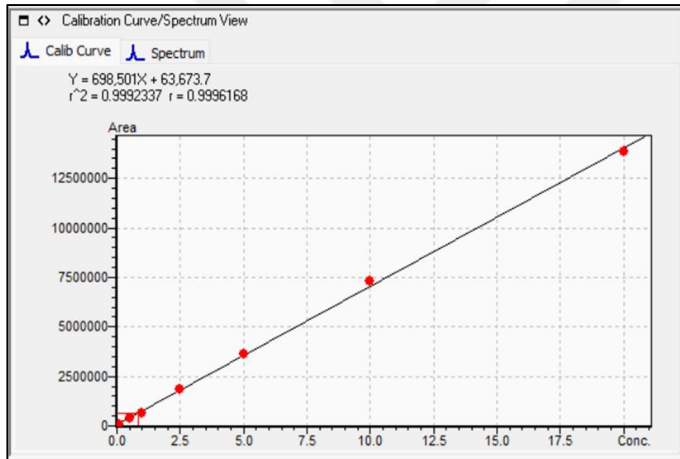
*Jacobine kalibrasyon eğrisi

Ek-14



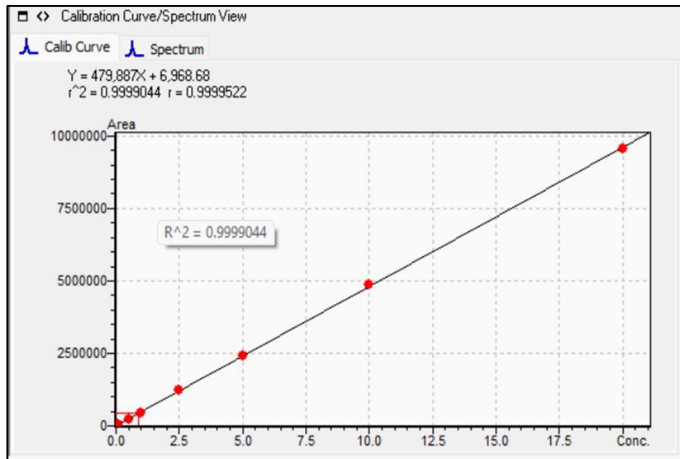
* Erucifoline N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-15



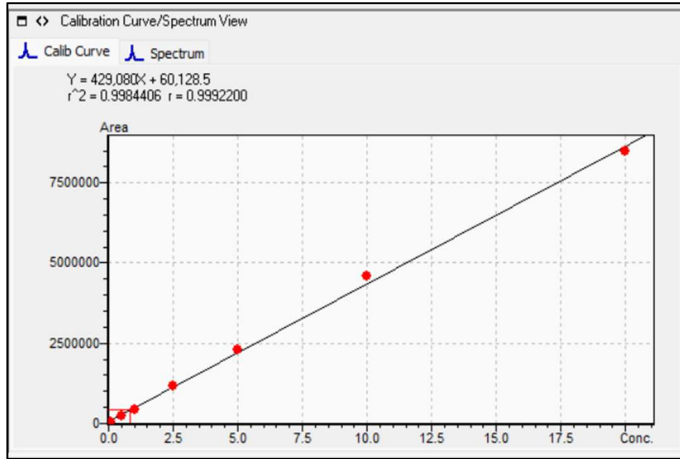
* Lycopsamine kalibrasyon eğrisi

Ek-16



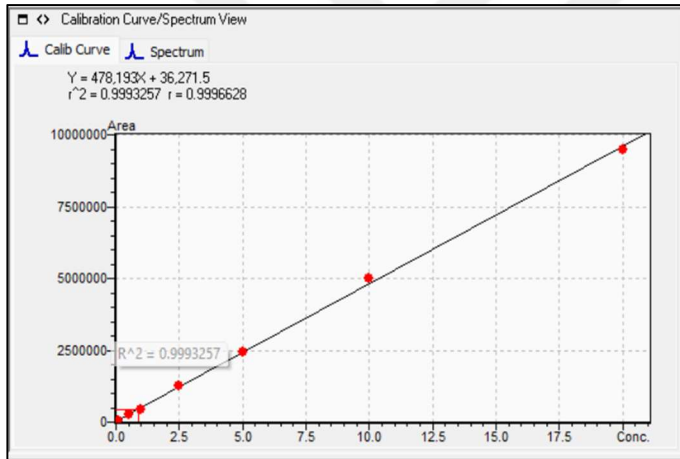
* Jacobine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-17



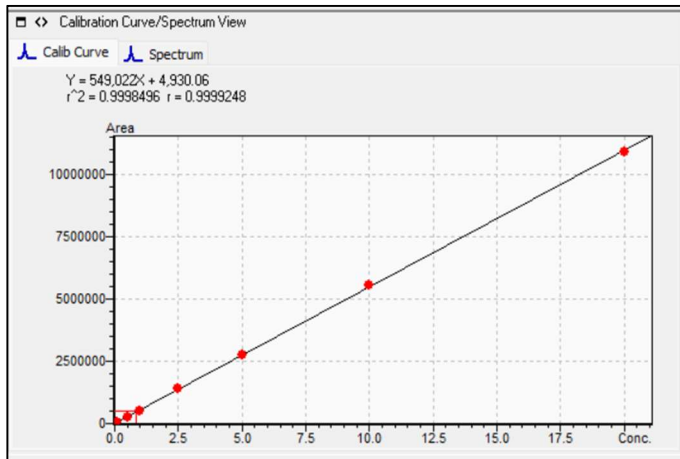
* Europine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-18



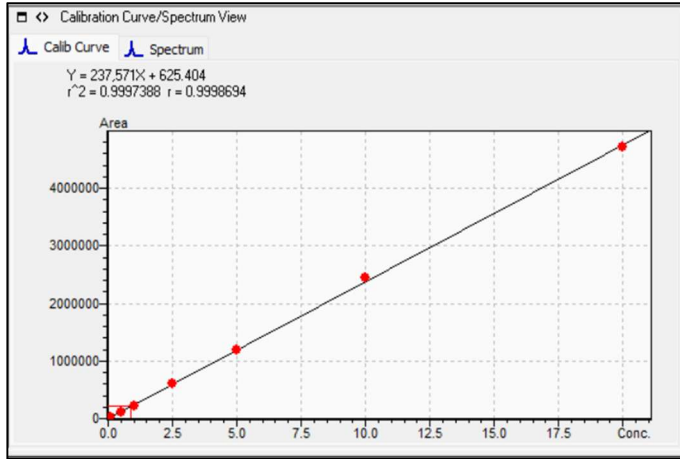
* Intermedine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-19



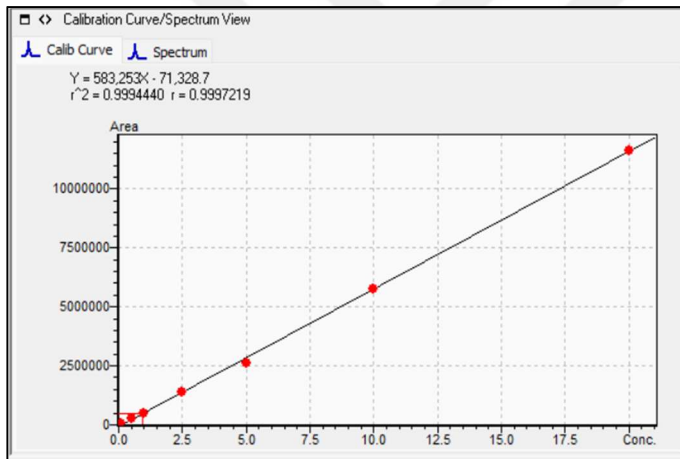
* Lycopsamine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-20



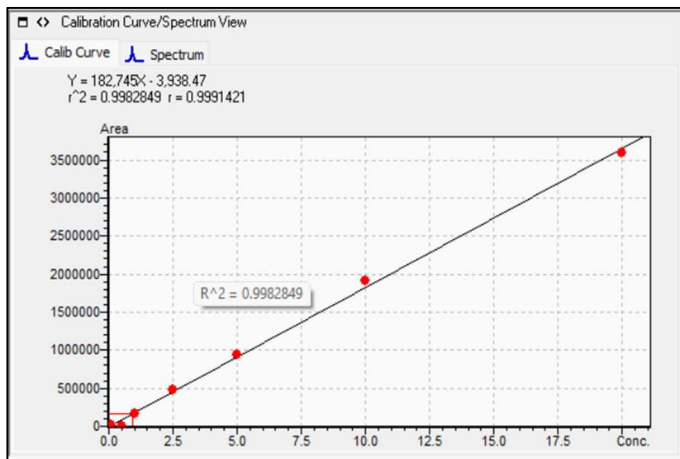
* Retrorsine kalibrasyon eğrisi

Ek-21



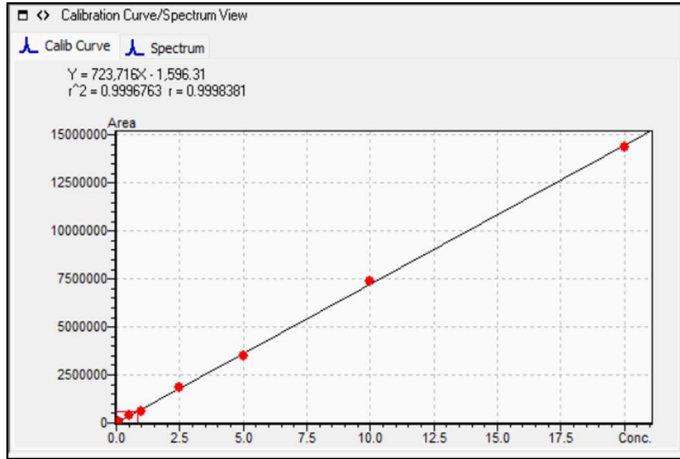
* Trichodesmine kalibrasyon eğrisi

Ek-22



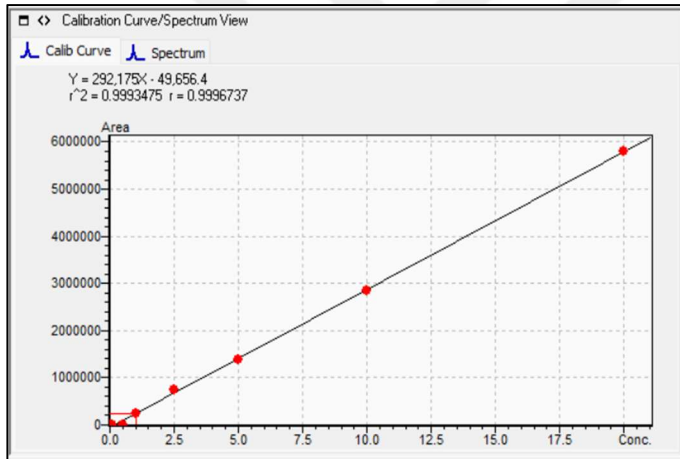
* Retrorsine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-23



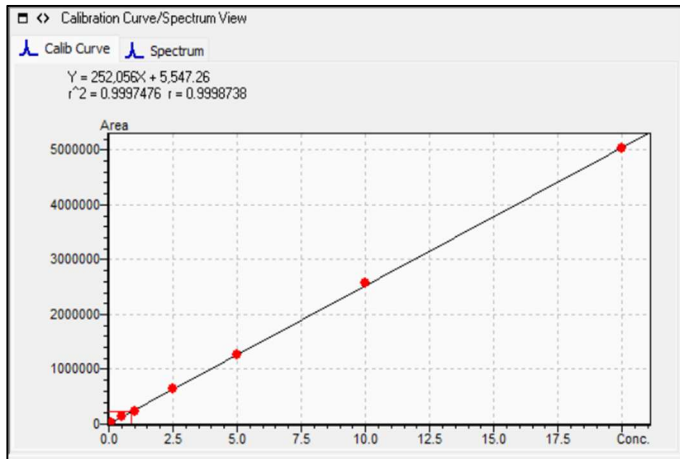
* Heliotrine kalibrasyon eğrisi

Ek-24



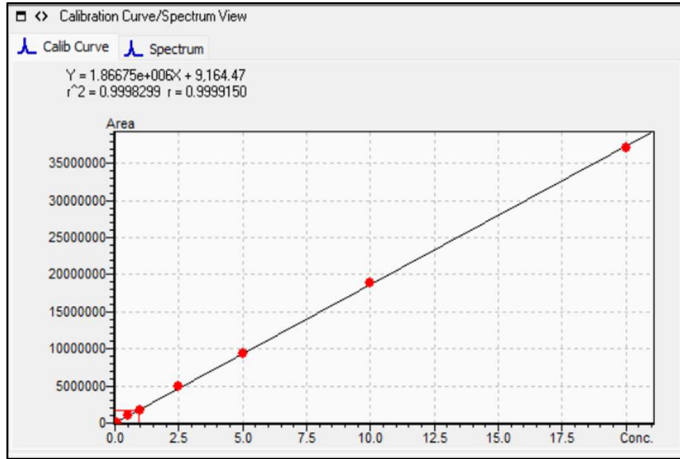
*Seneciphylline kalibrasyon eğrisi

Ek-25



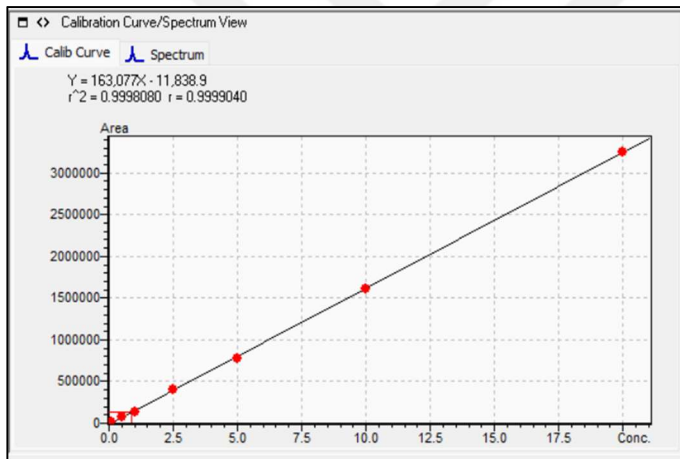
*Seneciphylline N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-26



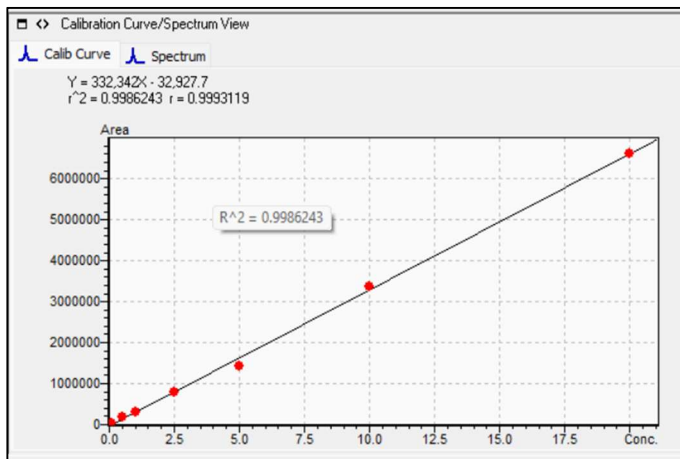
*Heliotrine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-27



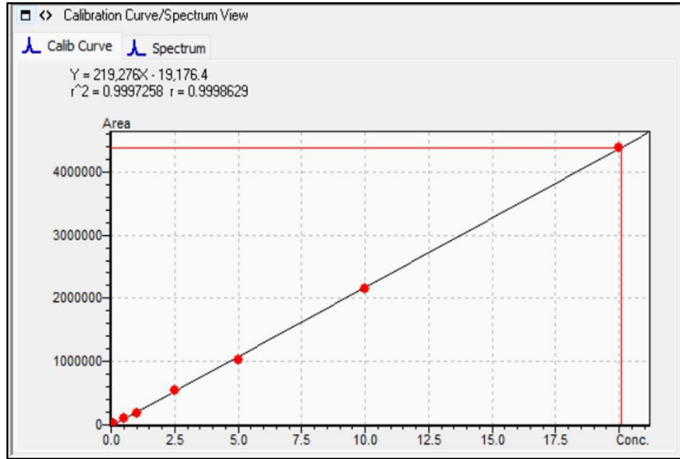
*Senecionine kalibrasyon eğrisi

Ek-28



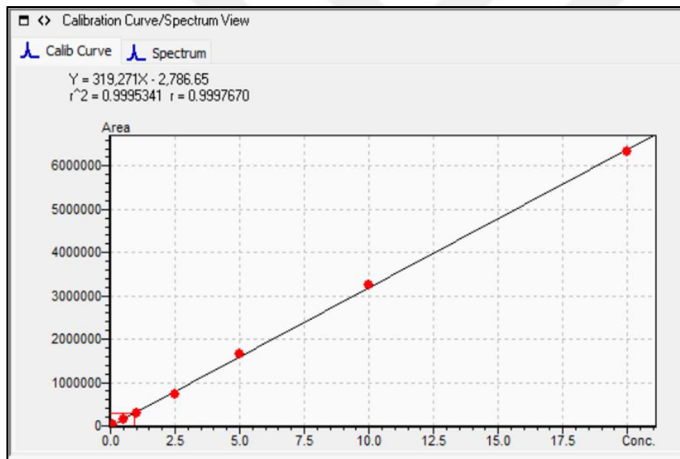
*Senecionine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-29



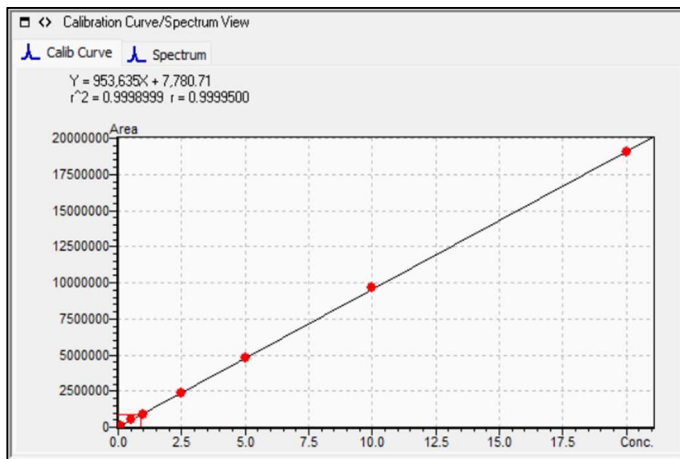
*Senecivernine kalibrasyon eğrisi

Ek-30



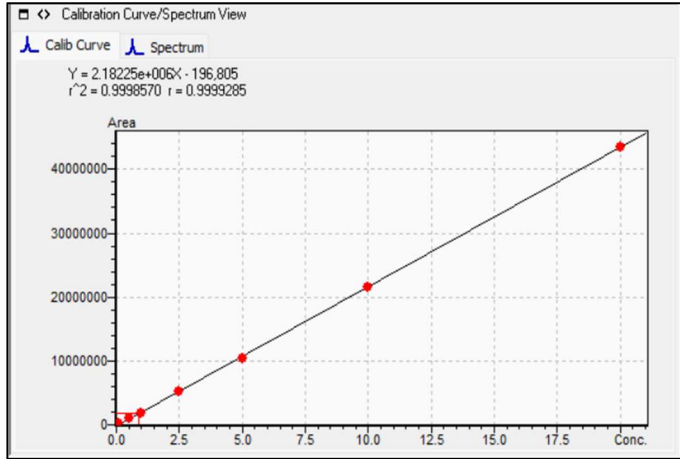
*Senecivernine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-31



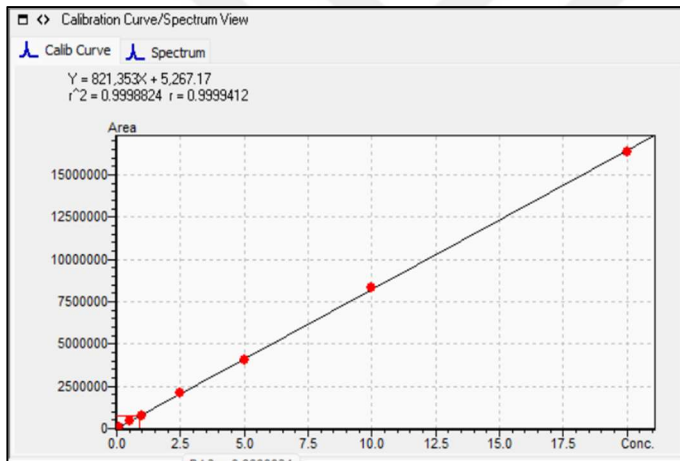
*Echimidine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-32



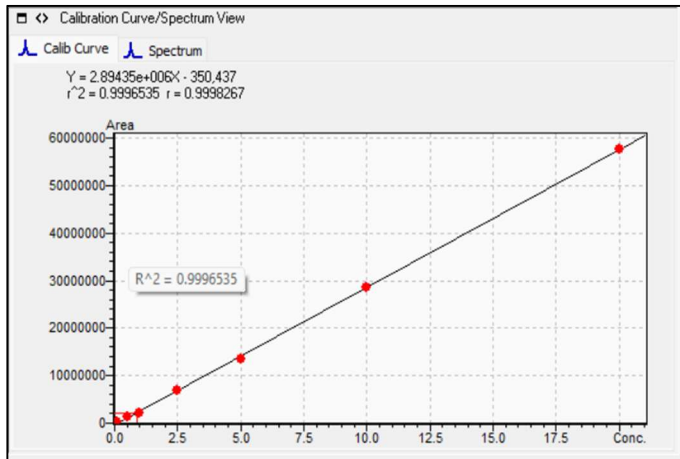
*Echimidine kalibrasyon eğrisi

Ek-33



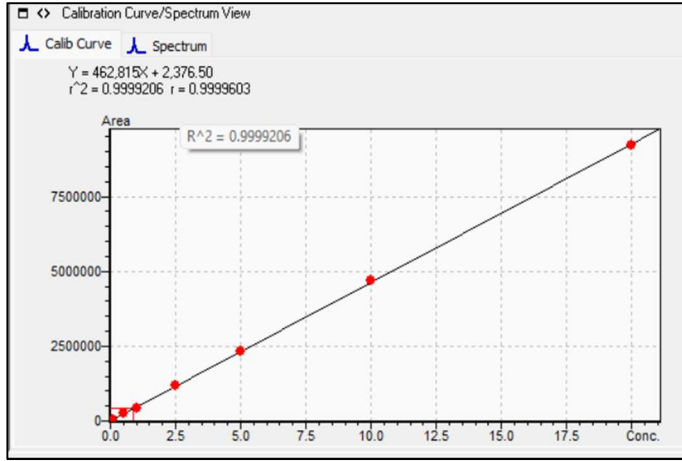
*Senkirkine kalibrasyon eğrisi

Ek-34



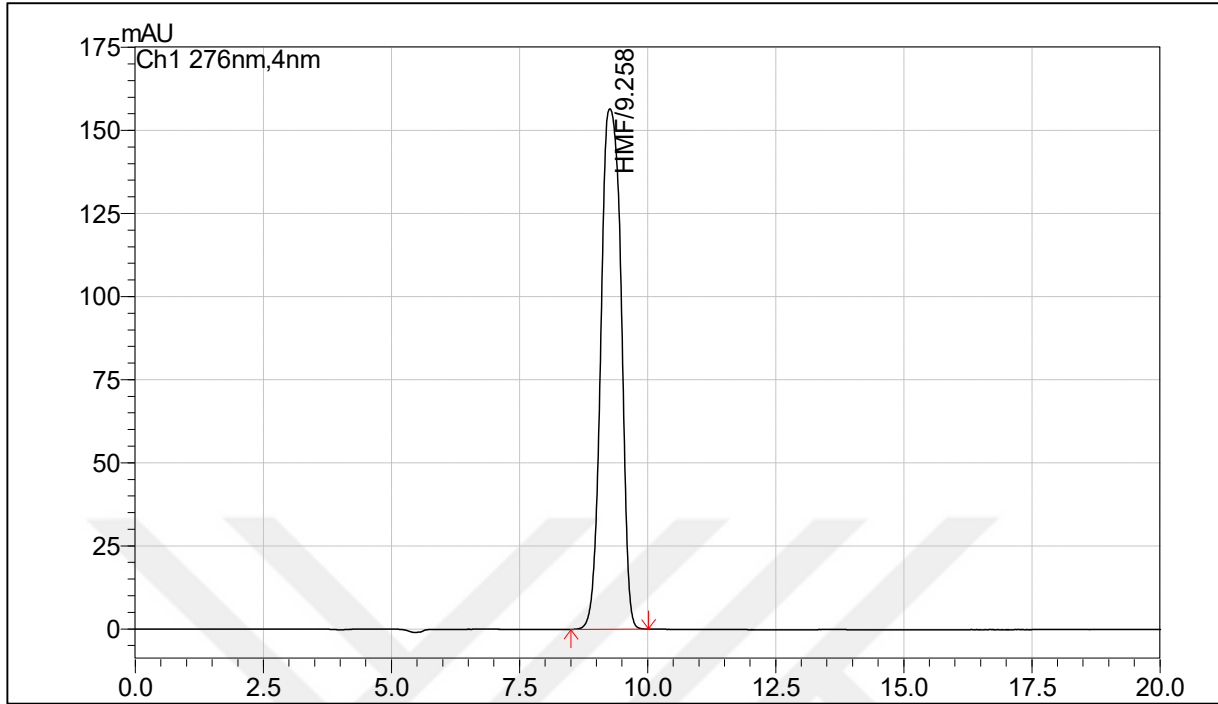
*Lasiocarpine kalibrasyon eğrisi

Ek-35



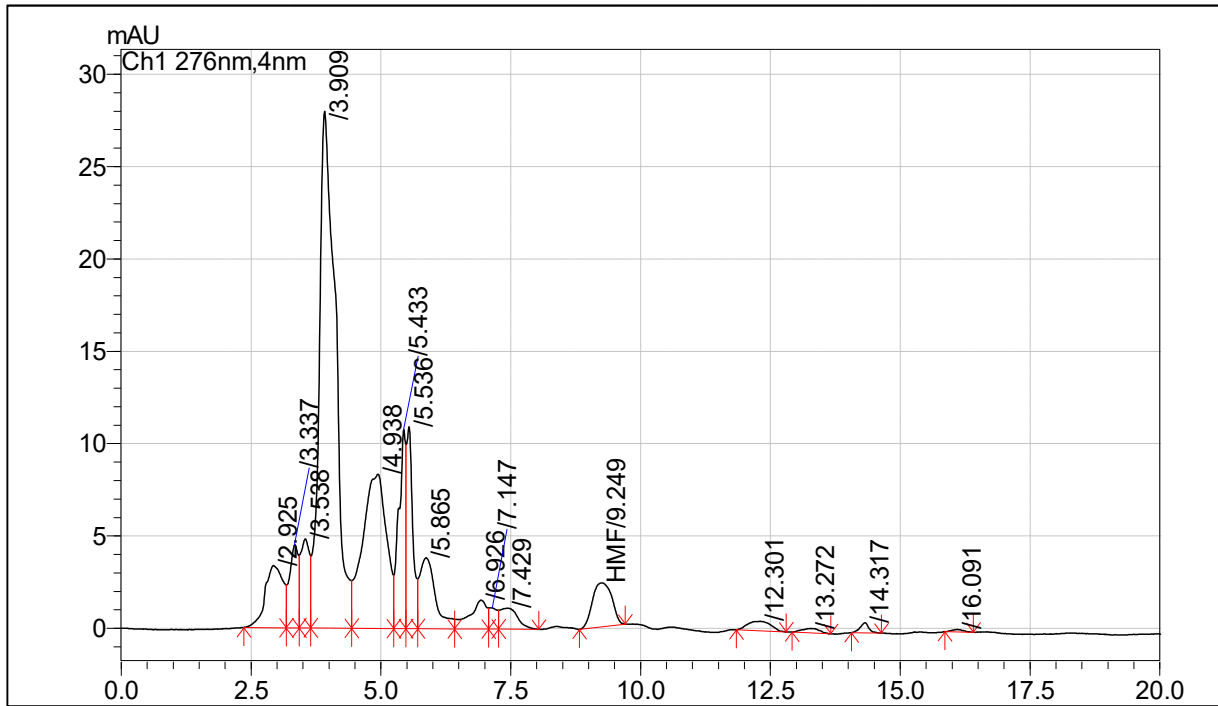
*Lasiocarpine N-Oxide kalibrasyon eğrisi

Ek-36



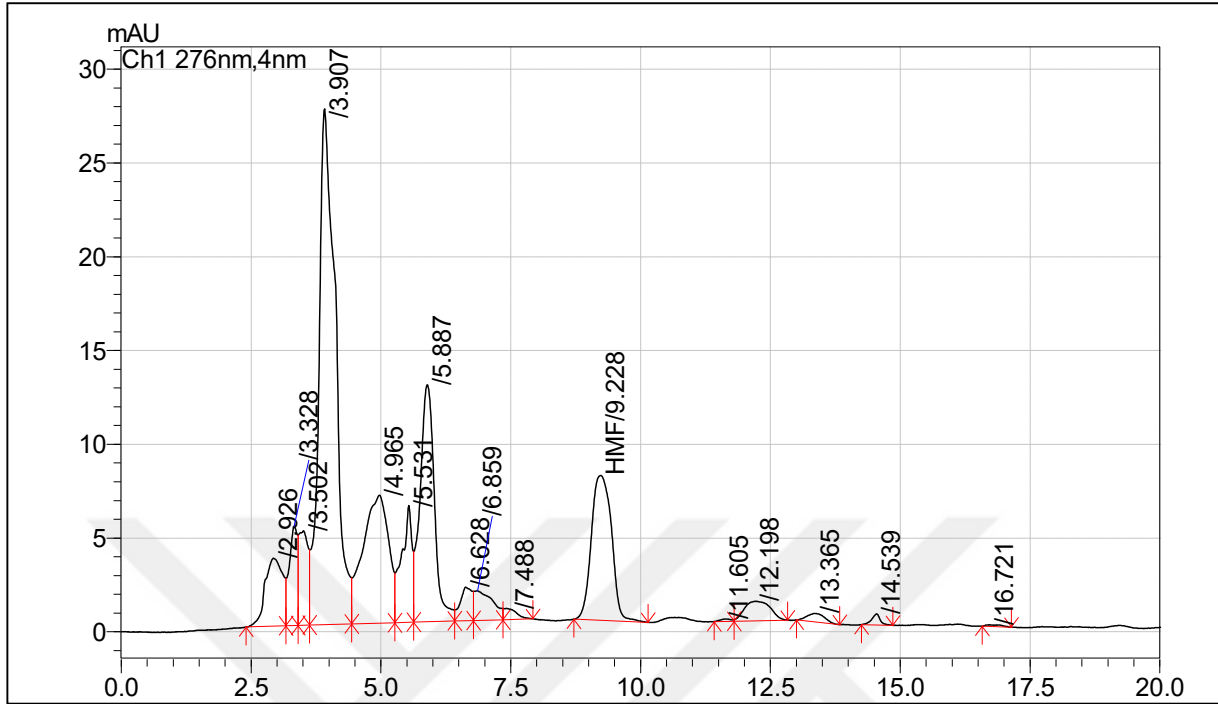
*Hmf Std Kromatogramı (25ppb)

Ek-37



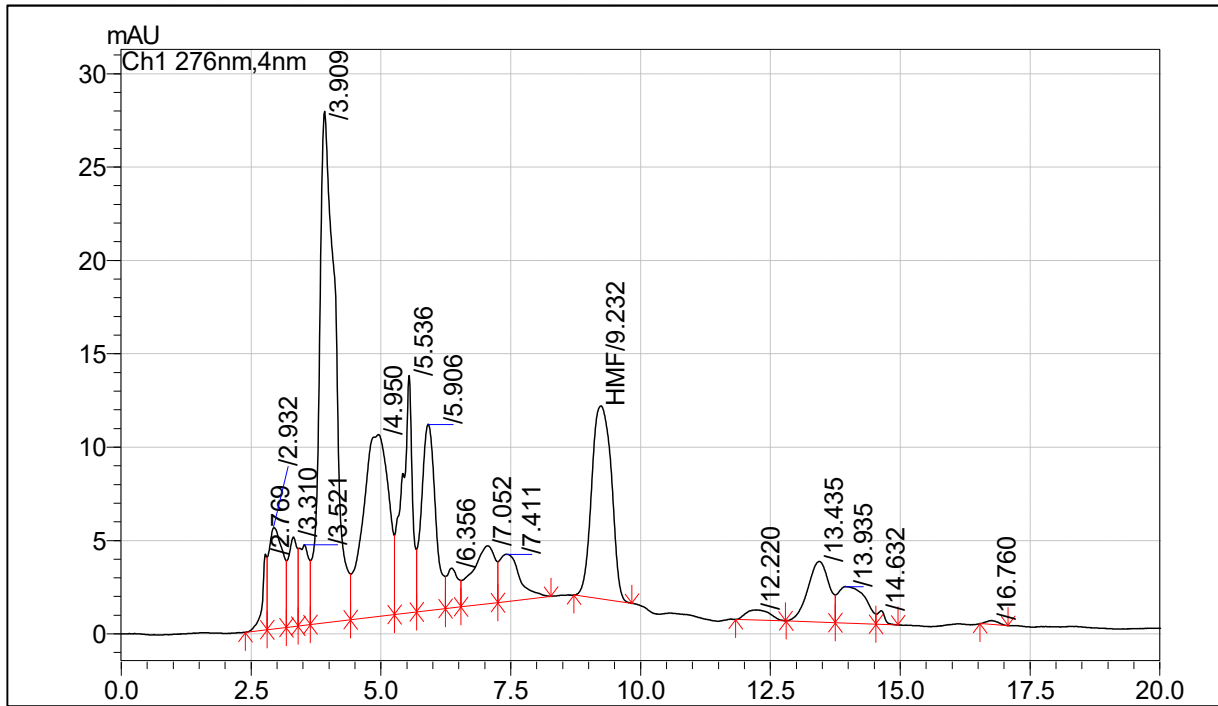
*768-1 Sonuc Kromatogramı

Ek-38



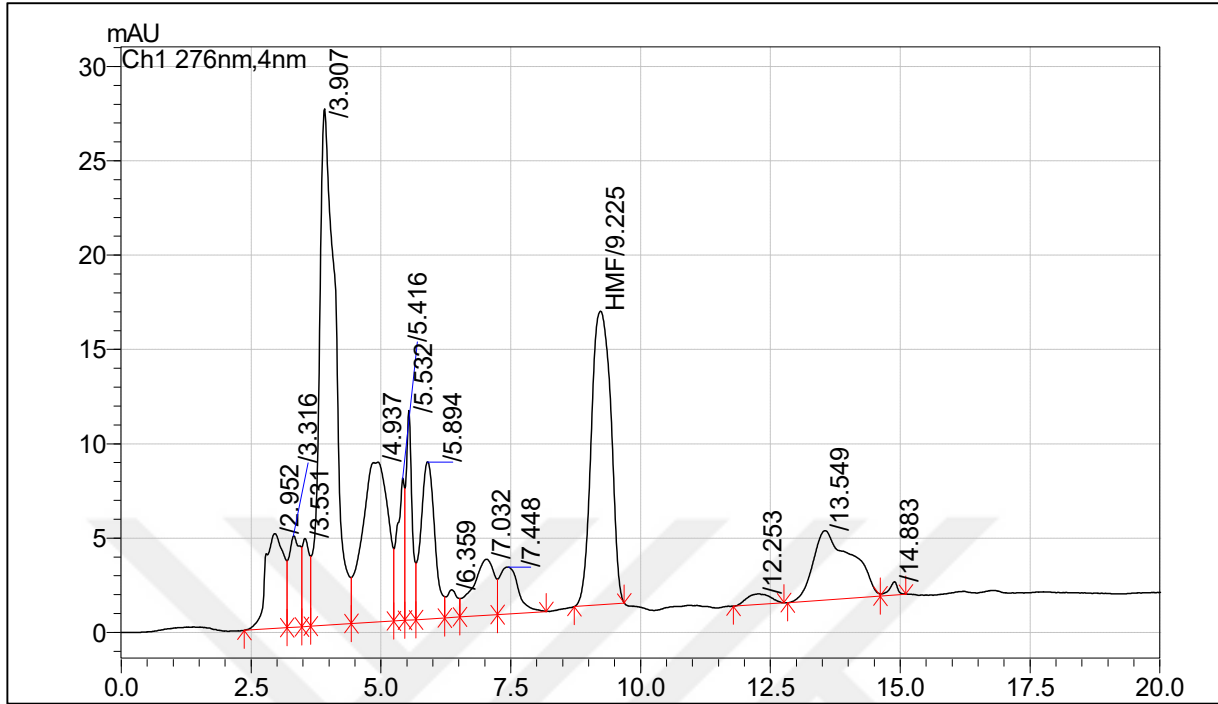
*792 Sonuc Kromatogramı

Ek-39



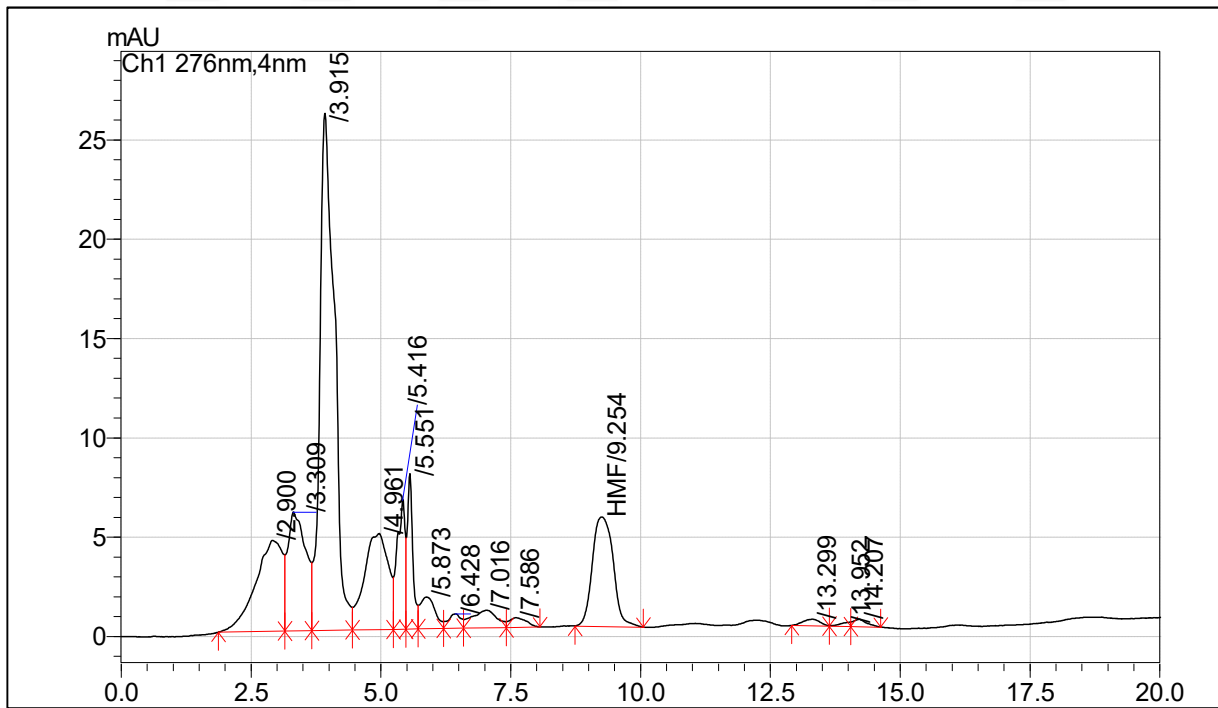
*793 Sonuc Kromatogramı

Ek-40



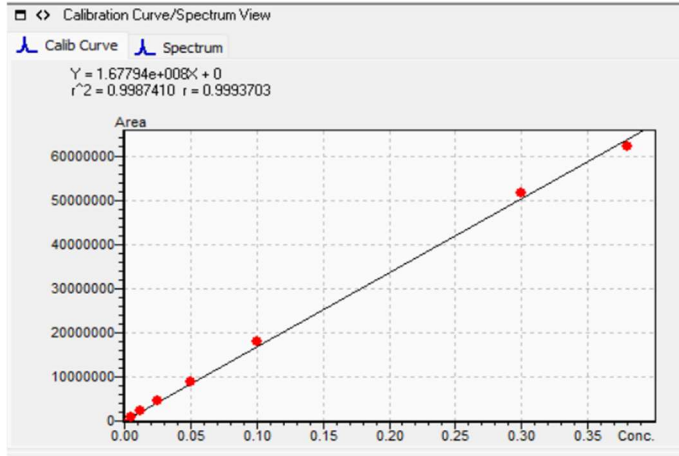
*800 Sonuc Kromatogramı

Ek-41



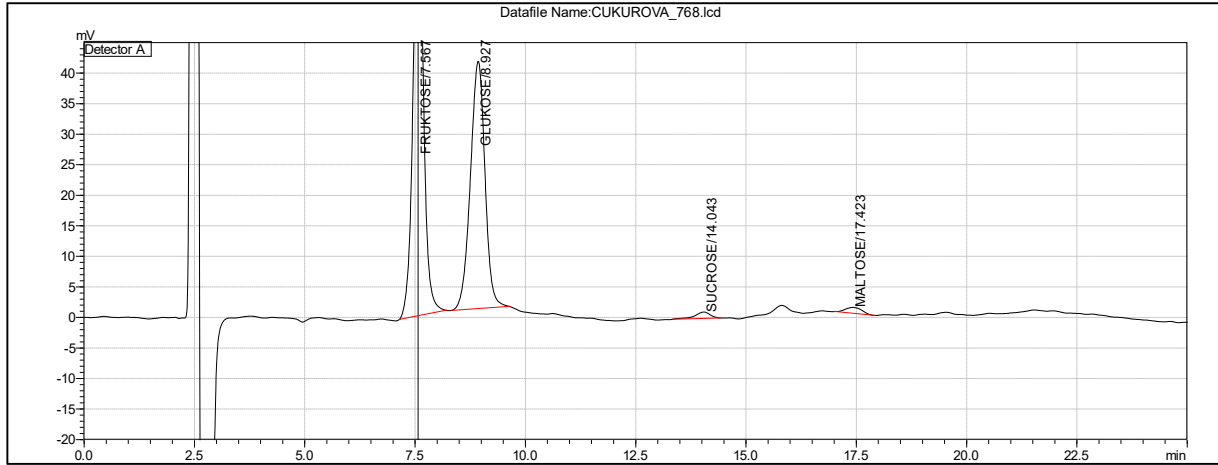
*829 Sonuc Kromatogramı

Ek-42



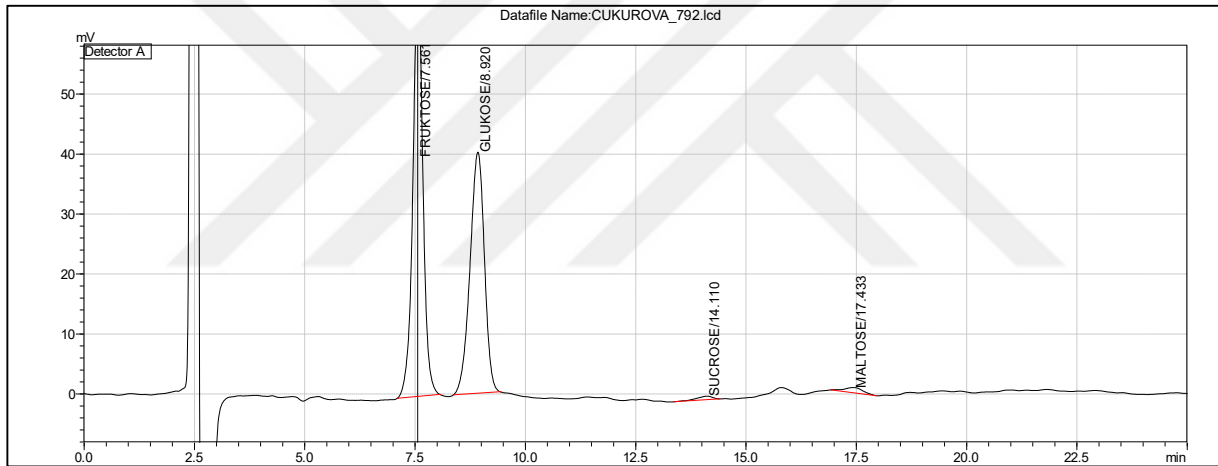
*HMF Kalibrasyon Eğrisi

Ek-43



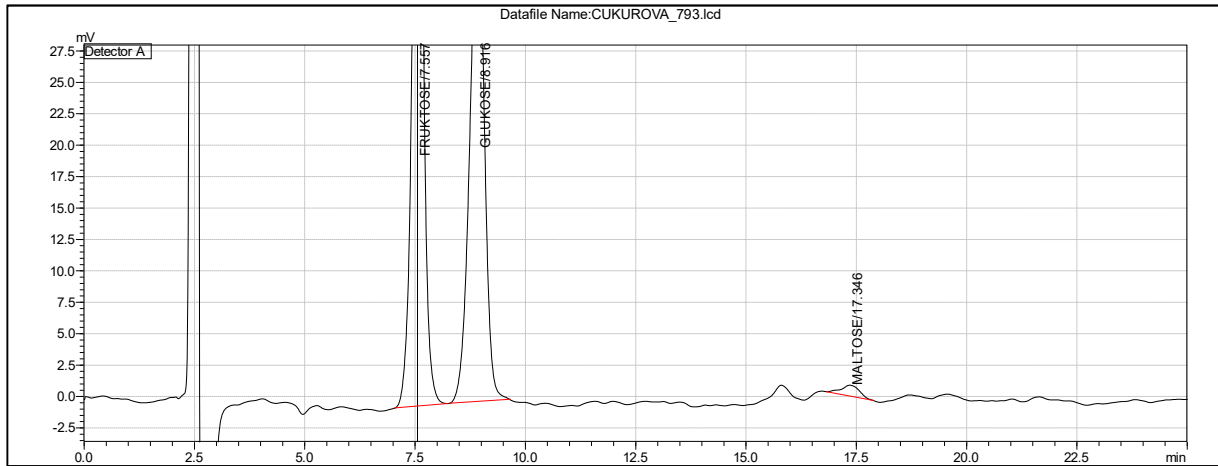
*768 Seker Kromatogramı

Ek-44



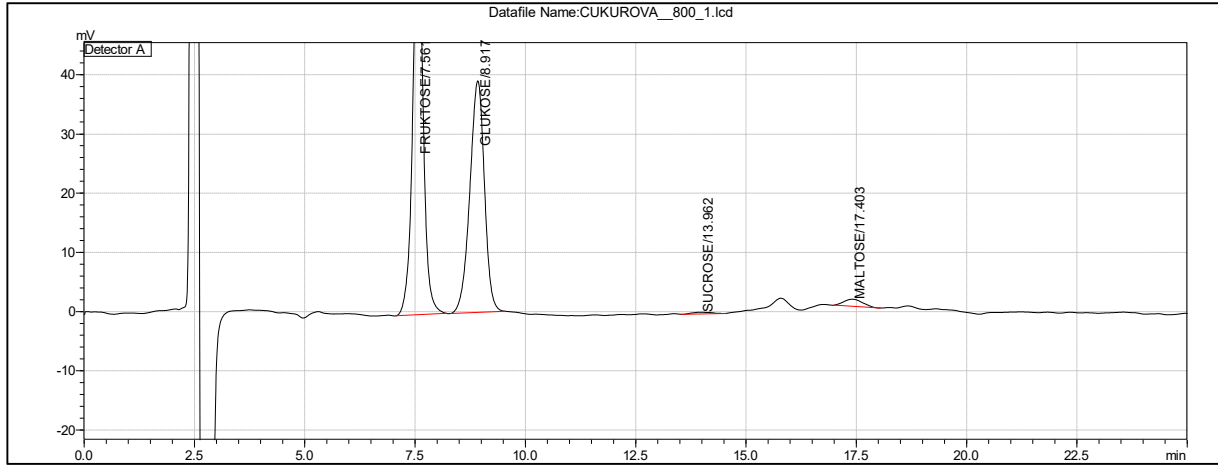
*792 Seker Kromatogramı

Ek-45



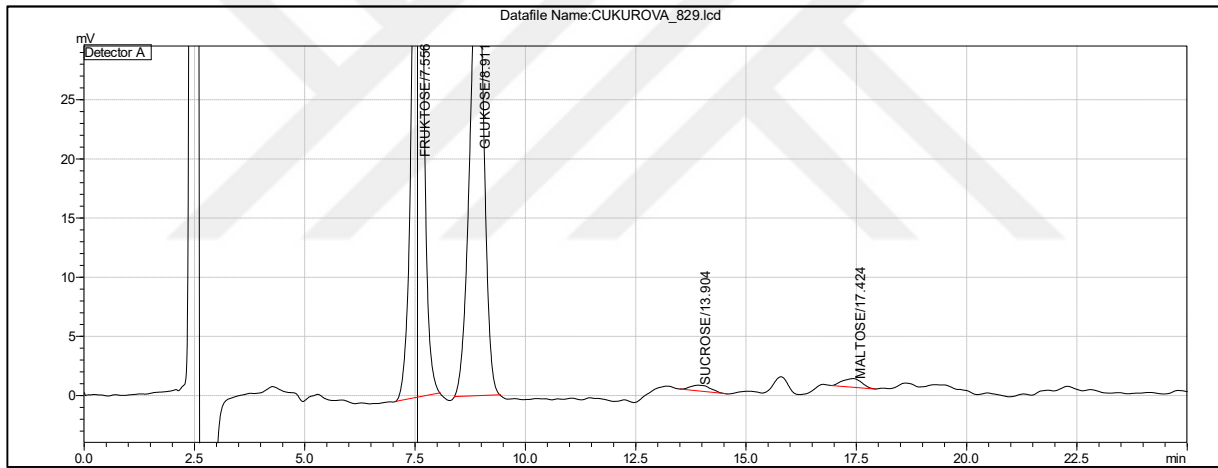
*793 Seker Kromatogramı

Ek-46



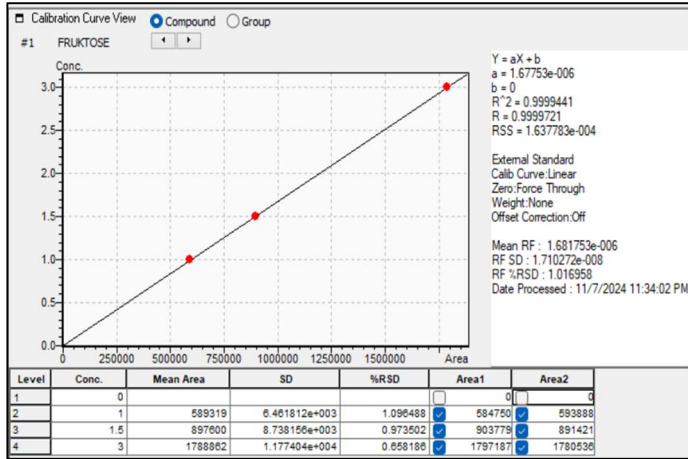
*800 Seker Kromatogramı

Ek-47



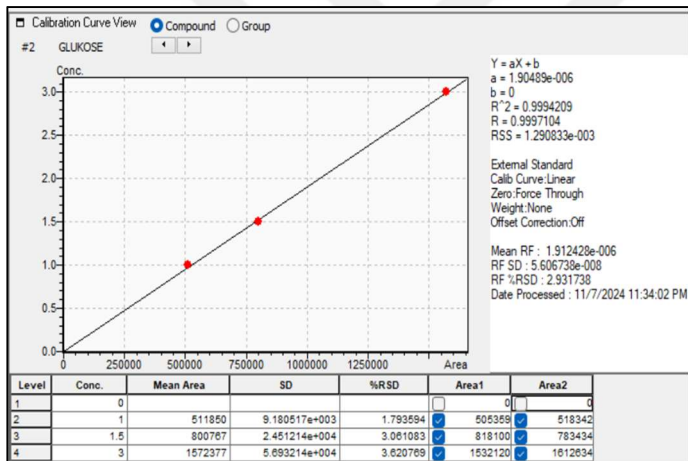
*829 Seker Kromatogramı

Ek-48



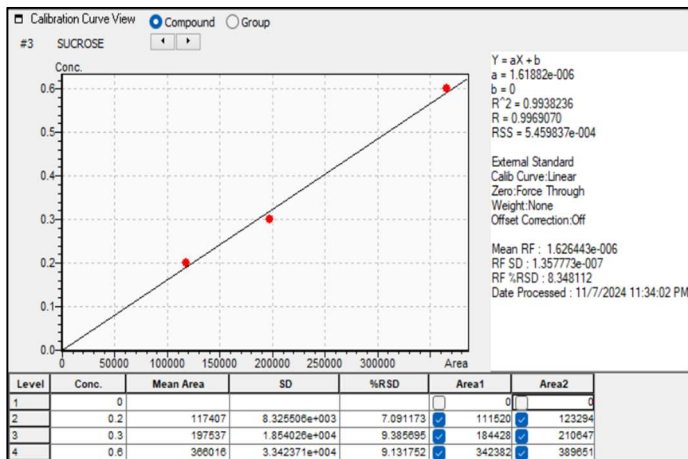
*Fruktoz Kalibrasyonu

Ek-49



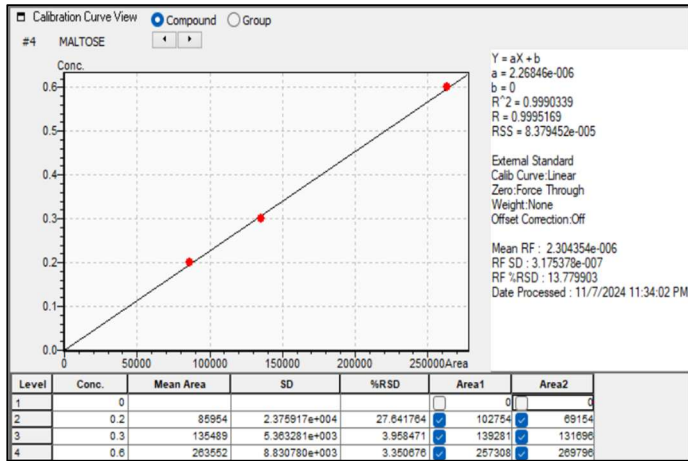
*Glikoz Kalibrasyonu

Ek-50



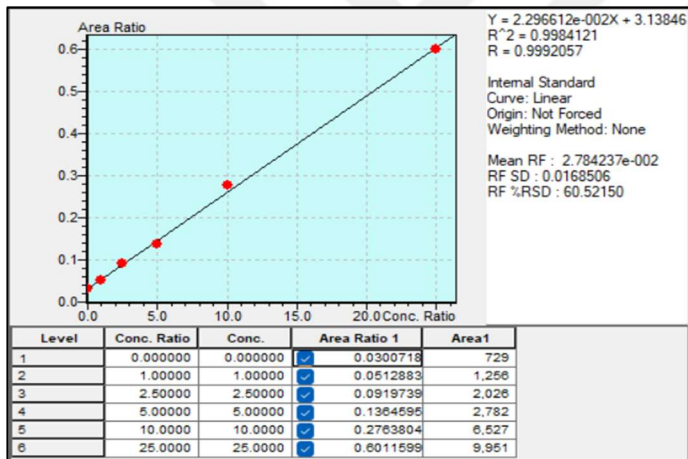
*Sakkaroz Kalibrasyonu

Ek-51



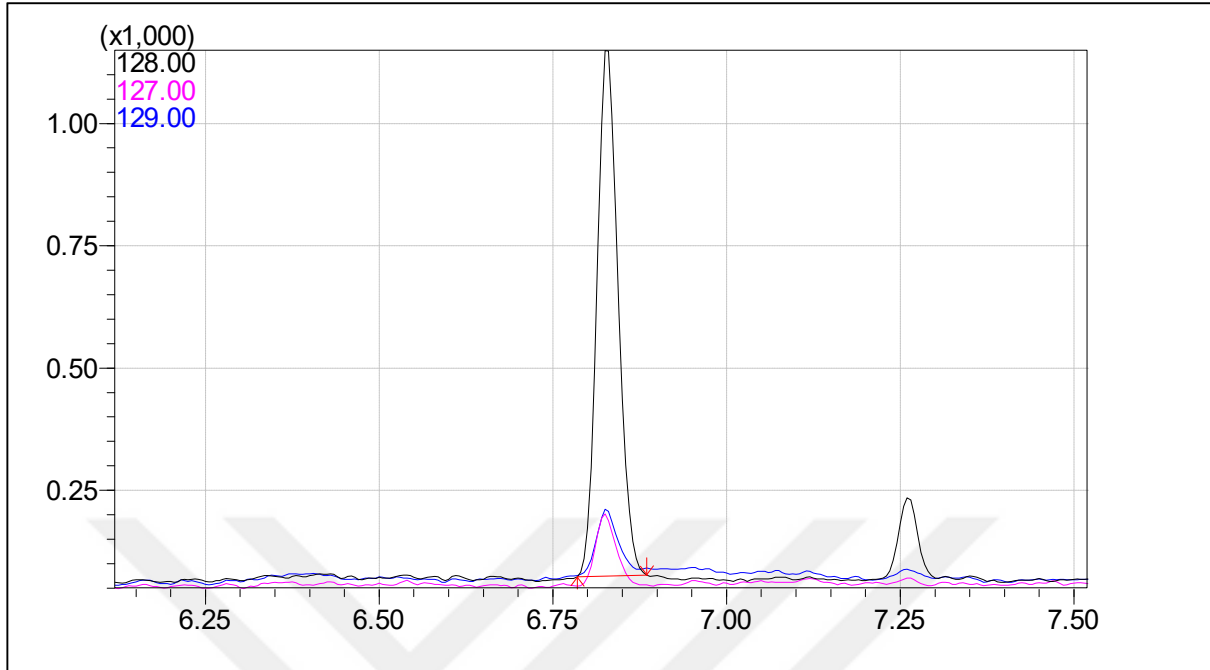
*Maltoz Kalibrasyonu

Ek-52



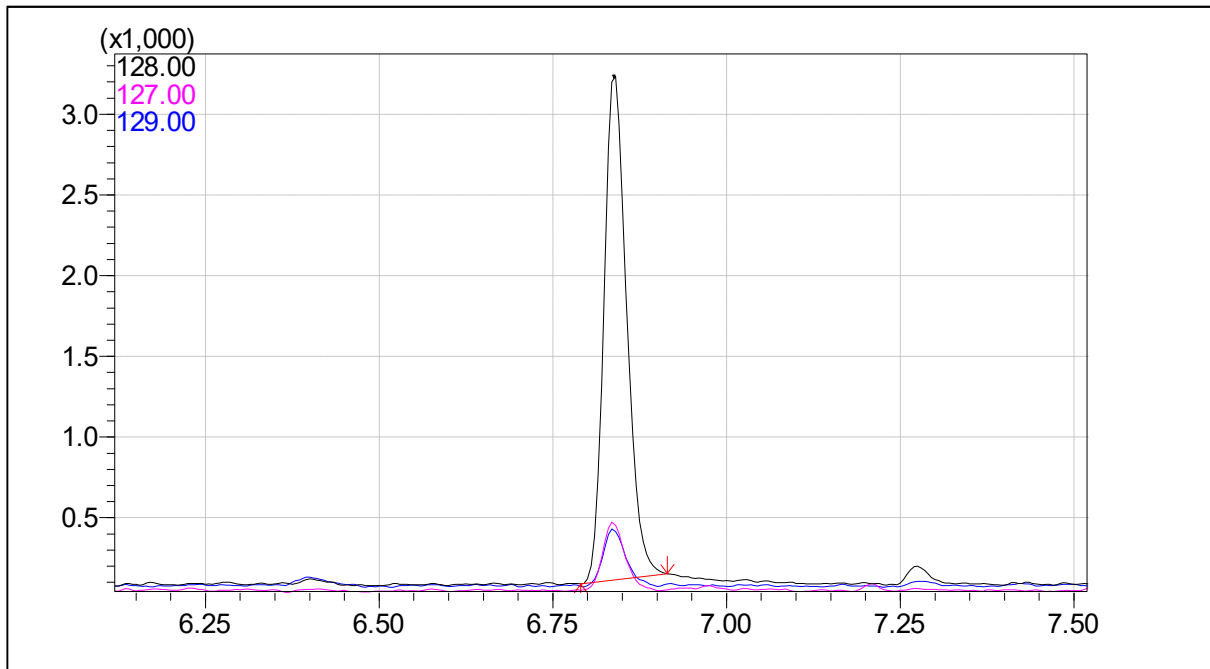
*Naftalin Kalibrasyonu

Ek-53



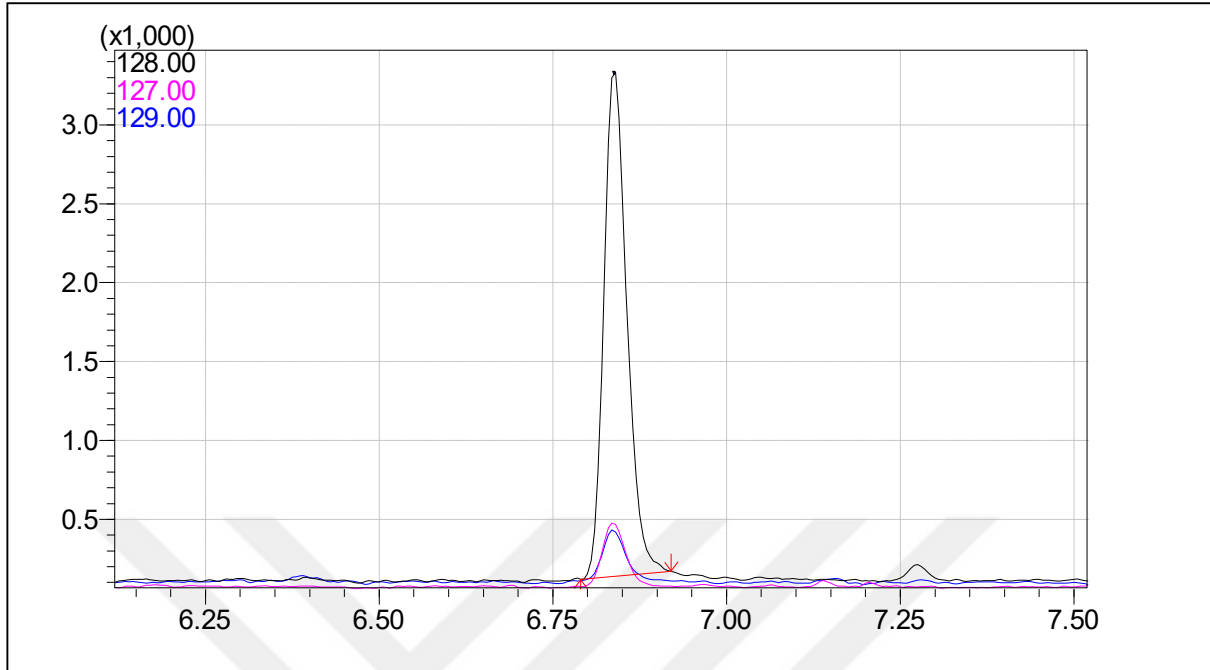
*Naftalin std(25ppb) Kromatogramı

Ek-54



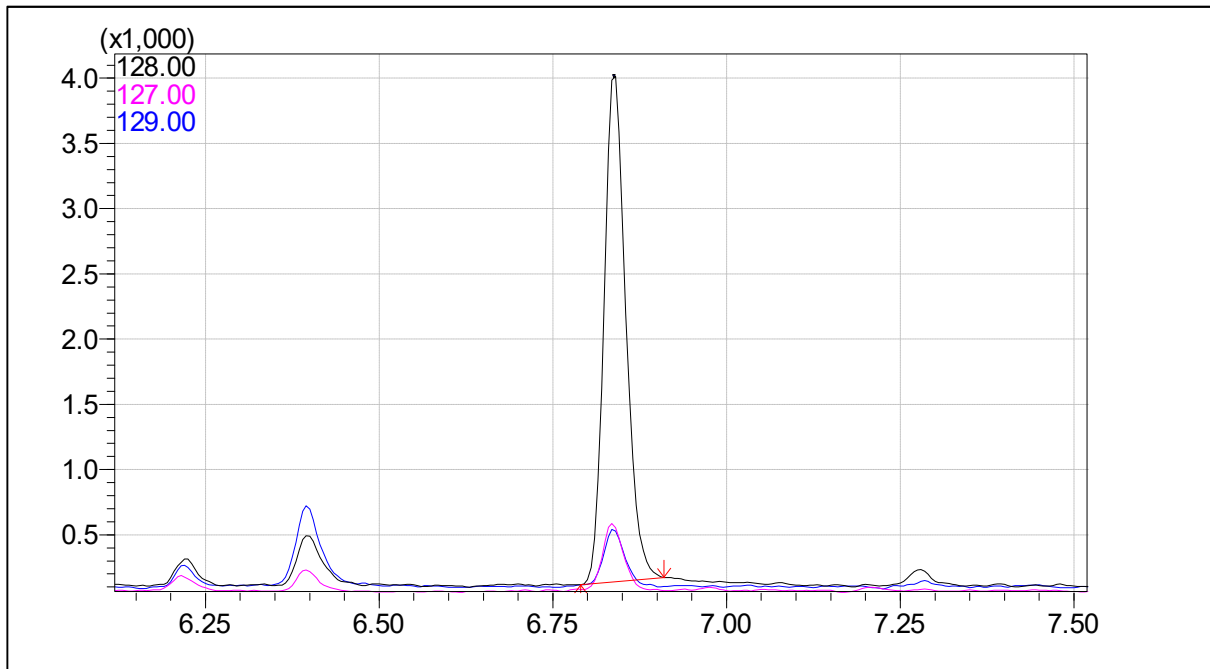
*768 naftalin kromatogramı

Ek-55



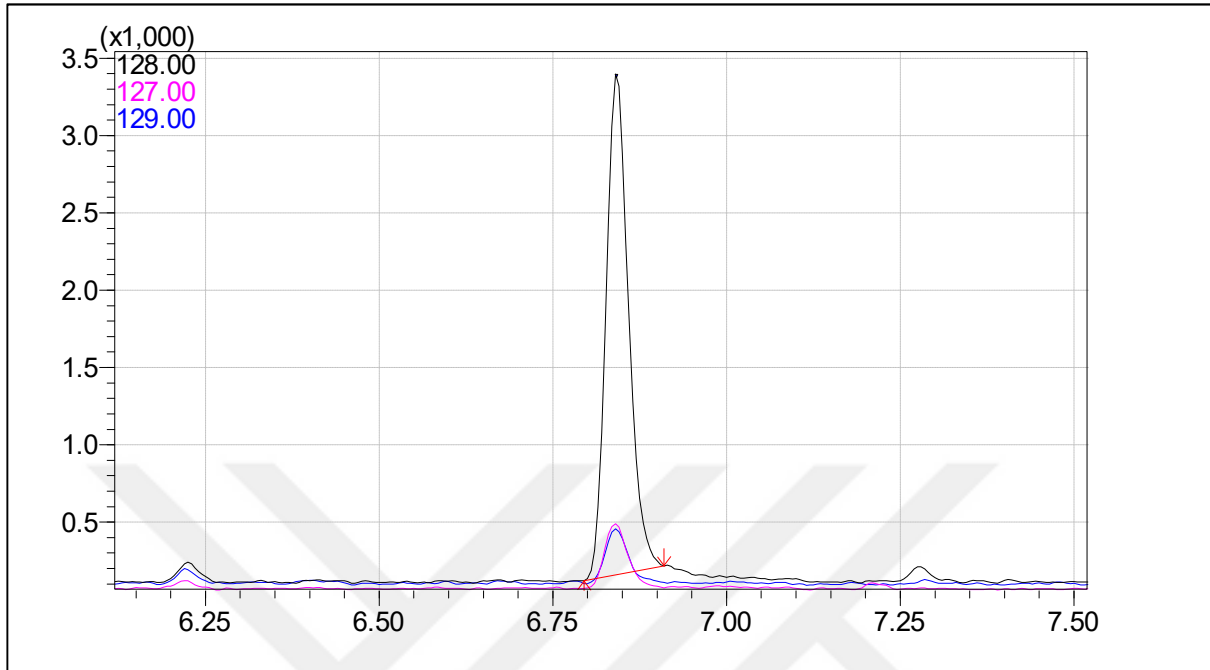
*792 naftalin kromatogramı

Ek-56



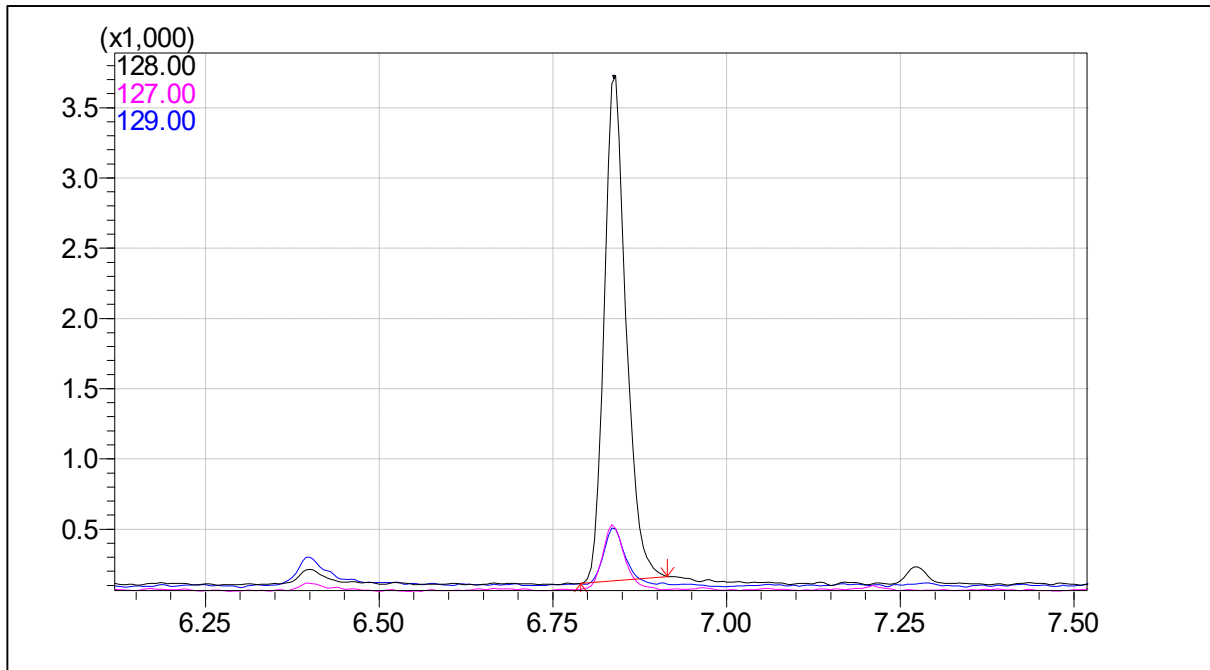
*793 naftalin kromatogramı

Ek-57



*800 naftalin kromatogramı

Ek-58



*829 naftalin kromatogramı