

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BAL NUMUNELERİNDEKİ BİSFENOL A (BPA)'NIN NANO-LC
SİSTEMİNDE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞAHRİBAN KARDAŞ

GIDA GÜVENLİĞİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi HAKİYE ASLAN

BİNGÖL-2024

**BAZI BAL NUMUNELERİNDEKİ BİSFENOL A (BPA)'NIN NANO-LC
SİSTEMİNDE BELİRLENMESİ**

Dr.Öğr.Üyesi Hakiye ASLAN danışmanlığında, Şahriban KARDAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 08/02/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Güvenliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Cemil AYDOĞAN *İmza* :
Üye : Doç.Dr. Hüseyin AKŞİT *İmza* :
Üye : Dr.Öğr.Üyesi Hakiye ASLAN *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, bakış açımı genişleten çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakiye ASLAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmam süresince kullandığım Nano-LC cihazı konusunda bilgi veren Prof. Dr. Cemil AYDOĞAN'a ve monolitik kolonun hazırlanmasında kullandığım naftalen metil metakrilatın (NMM) sentezini gerçekleştiren Doç. Dr. Sinan BAYINDIR'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda çok büyük yardımlarını gördüğüm doktora öğrencisi Halise AVCİL'e çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi güç ve destek veren çok sevgili rahmetli babam Mehmetcan KARDAŞ'a, pek kıymetli annem Güli KARDAŞ'a daima yanımda olan kardeşlerime ve değerli nişanlıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şahriban KARDAŞ
Bingöl 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bal	3
2.2. Bisphenol A (BPA).....	6
2.2.1. Bisfenol A'nın Özellikleri.....	8
2.2.2. BPA'nın Kullanım Alanları.....	8
2.2.3. BPA'nın Sağlık Üzerine Etkileri.....	9
2.2.4. BPA ile İlgili Yasal Düzenlemeler.....	9
2.2.5. BPA'nın Gıdalar ile İlişkisi.....	10
2.3. Sıvı Kromatografisi (LC).....	12
2.4. Nano-LC.....	13
2.4.1. Nano-LC Kolon Türleri.....	15
2.5. Monolitik Kolonlar.....	16
3. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
4.1. Alet ve Ekipmanlar.....	21
4.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	21
4.3. Deneysel Yöntem.....	22

4.3.1. Monomer Sentezi.....	22
4.3.2. Kolon Silazasyonu.....	22
4.3.3. Monolitik Kolon Sentezi.....	24
4.3.4. Alkil Benzen Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25
4.3.5. BPA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25
4.3.6. Bal Örneklerinin Analize Hazırlanması.....	26
4.3.7. Kromatografik Koşullar	27
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
5.1. Naftalen Metil Metakrilatın (NMM) Karakterizasyonu.....	28
5.2. Monolitik Kolonun Karakterizasyonu	29
5.3. Nano-LC Sisteminde BPA Tayini İçin Metod Geliştirilmesi.....	32
5.4. Baldan BPA Tayini.....	33
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABs	: Alkil benzen türevleri
ACN	: Asetonitril
AIBN	: 2.2'Azobisisobütürinonitril
Al	: Alüminyum
Aw	: Su aktivitesi
BPA	: Bisfenol A
BPAF	: Bisfenol AF
BPAP	: Bisfenol AP
BPF	: Bisfenol F
BPS	: Bisfenol S
Cd	: Kadmiyum
CSP	: Kril sabit faz
DVB	: Divinilbenzen
EFSA	: Avrupa gıda güvenliği otoritesi
g	: Gram
GC-IT/MS	: İyon trap gaz kromatografi-kütle spektrometre
HCl	: Hidroklorik asit
Hg	: Civa
HIC	: Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HILIC	: Hidrofilik etkileşim kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IEC	: İyon değişim kromatografisi
i.d.	: İç çap
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC-DAD	: Diyot dizisi algılamalı sıvı kromatografisi
LC-IT-MS	: Elektrosprey iyonizasyon-iyon tuzağı kütle spektrometresi
Li	: Lityum

LOD	: Gözlenebilme tayin limiti
LOQ	: Alt tayin limiti
mg	: Miligram
MeOH	: Metanol
mL	: Mililitre
Nano-LC	: Nano sıvı kromatografisi
NaOH	: Sodyum hidroksit
ng	: Nano gram
nm	: Nano metre
NNM	: Naftalen metil metakrilat
Pa	: Paskal
Pb	: Kurşun
PC	: Polikarbonat
ppm	: Milyonda bir
PVC	: Polivinil klorür
Rb	: Rubidyum
RDS	: Bağlı standart sapma
RPLC	: Ters fazlı sıvı kromatografisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Si	: Silikon
Sr	: Stronsiyum
TFA	: Trifluoroasetik asit
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TMSPM	: 3-Trimetoksilil propil metakrilat
UHPLC/MS-MS	: Ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometre
V	: Vanadyum
Zi	: Zirkonyum
µL	: Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	LC sisteminin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.2.	Tez çalışması kapsamında kullanılan Nano-LC sistemi.....	14
Şekil 2.3.	Nano-LC sisteminin avantajları	15
Şekil 2.4.	Analitik nano kolon türleri a) Open tubülar, b) Partükül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar.....	17
Şekil 4.1.	Kolon silanizasyonu işlem basamakları	24
Şekil 4.2.	100 µm iç çaplı 30 cm NMM monolitik kolon sentez aşamaları.....	25
Şekil 4.3.	Numune hazırlama işlemine ait resimler	26
Şekil 4.4.	Analiz Edilen Bal örnekleri	27
Şekil 5.1.	Naftalen metil metakrilatın sentezi	28
Şekil 5.2.	NMM içerikli monolitik kolonun akıştan önce (a) ve akıştan sonra (b) mikroskop görüntüleri.....	31
Şekil 5.3.	NMM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği.	30
Şekil 5.4.	NMM monolitik kolonun A(5000x) ve B(10000x) büyütme SEM görüntüleri	31
Şekil 5.5.	NMM monolit kolonunda alkilbenzen kromatogram ayrımı.....	32
Şekil 5.6.	BPA blank ve 100 ppm BPA kromatogramı	33
Şekil 5.7.	A2, B3, B4, K ve S bal örneklerine ait BPA kromatogramı.....	35

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Bisfenol A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	8
Tablo 2.2.	Sıvı kromatografi sistemlerine göre kolon tipi ve akış hızları.....	13
Tablo 2.3.	Nano-sıvı kromatografisinde kullanılan analitik kolon tipleri.....	16
Tablo 5.1.	Nano-LC sisteminde Bisfenol A (BPA) tayin parametreleri	34
Tablo 5.2.	Bal örneklerine ait BPA analiz sonucu.....	35



BAZI BAL NUMUNELERİNDEKİ BİSFENOL A (BPA)'NIN NANO-LC SİSTEMİNDE BELİRLENMESİ

ÖZET

Bisfenol A, insan sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle üzerinde en çok çalışılan bileşik olup, dünya çapında gıda ile temas eden malzemelerde en yaygın kullanılan ürünlerden biridir. Bu çalışma kapsamında ters faz nano-LC sistemi ile balda bisfenol A (BPA) tayini için naftalen metil metakrilat (NMM) bazlı yeni bir hidrofobikçzellikte monolitik nano-kolon hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Hazırlanan monolitik kolon kullanılarak, nano-LC yöntemi ile BPA'nın, gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 0,02µg/L ve 0,58 µg/L saptanmıştır. Yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değeri ise, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde sırasıyla 2,1 ve 1,8 belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ile on üç ticari bal örneğinde BPA analizi yapılmıştır. Beş bal örneğinde 2,5±0,27 µg/L-12,47±0,84 µg/L arasında değişen miktarlarda BPA tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ambalaj, Bal, Bisfenol A, Nano-LC, Plastik.

DETERMINATION OF BISPHENOL A (BPA) IN SOME HONEY SAMPLES IN NANO-LC SYSTEM

ABSTRACT

Bisphenol A is the most studied compound due to its adverse effects on human health and is one of the most widely used products in food contact materials worldwide. Within the scope of this study, a new hydrophobic monolithic nanocolumn based on naphthalene methyl methacrylate (NMM) was prepared and characterized for the determination of bisphenol A (BPA) in honey by reverse phase nano-LC system. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of BPA were determined to be 0.02 μ g/L and 0.58 μ g/L, respectively, by reverse phase nano-LC method using a prepared monolithic column. The percent relative standard deviation (%RSD) value was determined as 2.1 and 1.8, respectively, for intraday and interday repeatability values. The developed method was applied to the analysis of thirteen commercial honey samples. BPA was detected in five honey samples in amounts ranging from 2.5 \pm 0.27 μ g/L to 12.47 \pm 0.84 μ g/L.

Keywords: Bisphenol A, Honey, Nano-LC, Packaging, Plastic.

1. GİRİŞ

Bal, doğada üretildiği haliyle tüketilebilen, antik çağlardan beri yaygın olarak kullanılan, antiseptik, antioksidan ve antibakteriyal özelliklere sahip, şifa kaynağı olarak da bilinen besin değeri yüksek bir arı ürünüdür (Alvarez-Suarez ve ark., 2004, Badolato ve ark., 2017). Bileşiminde yaklaşık olarak %80 karbonhidrat (%35 glukoz, %40 fruktoz ve %5 sukroz) ve % 17 su bulunmaktadır. Ayrıca amino asitler, vitaminler, mineraller, enzimler, organik asitler ve fenol bileşikler gibi 180'den fazla farklı bileşen, balın içeriğinde yer almaktadır (Mutlu ve ark., 2017). Balın içeriğinde ayrıca farklı türden çiçeklere ait polenler ve bu bitkilerin yapısında bulunan çeşitli kimyasal maddeler de bulunmaktadır.

Bal, içeriğindeki kimyasal bileşenleri sayesinde çeşitli beslenme, tıbbi ve profilaktik (önleyici) özelliklere sahiptir. Ancak, balın faydalı etkilerinden yararlanılabilmesi için içeriğinde herhangi bir kirletici unsurun bulunmaması gerekmektedir. Günümüzde arı ürünleri, yanlış uygulanan arıcılık faaliyetleri sonucu kirlenebileceği gibi çevresel kaynaklı farklı kirlilik kaynaklarının kirlettiği bir ortamda üretilebilmektedir. Arıcılık uygulamalarından kaynaklanan kirlilikler arasında, akarisitler, lipofilik sentetik bileşikler ve organik asitler ve uçucu yağların bileşenleri gibi toksik olmayan maddeler ve arı yavru hastalıklarının kontrolünde kullanılan antibiyotikler, özellikle tetrasiklinler, streptomisin, sülfonamidler ve kloramfenikol yer almaktadır. Çevresel kirleticiler ise ağır metaller, kurşun, kadmiyum ve civa, radyoaktif izotoplar, organik kirleticiler, pestisitler (böcek öldürücüler, fungusitler, herbisitler ve bakterisitler), patojenik bakteriler ve genetiği değiştirilmiş organizmaları kapsamaktadır (Bogdanov, 2006). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarda, günümüzün en önemli gıda kirleticileri arasında yer alan bisfenol A (BPA)'nın baldaki varlığı tespit edilmiştir (Çesen ve ark., 2016). BPA, endokrin bozucu özellikler sergileyen tehlikeli bir kirletici madde olmasının yanı sıra prostat, akciğer ve meme kanseri gibi çeşitli kanser hastalıklarının patogeneğinde de etkili olduğu düşünülmektedir (Khan ve ark., 2020). Gıda ile temas eden malzemelerde yaygın şekilde bulunan BPA, polikarbonat (PC) plastik ürünlerin endüstriyel üretiminde kullanılan bir monomerdur. Ayrıca teneke kutularda, şişe kapaklarında ve kapaklarda astar olarak

kullanılan epoksi bazlı lakların üretiminde kullanılan epoksi reçinelerin sentezi için de hammadde olup, gıda içeriğinin metallerle doğrudan temasta bulunarak bozulmasını, yiyecek ve içeceklerde metalik tat oluşmasını önlemektedir (Notardonato ve ark., 2020b). Ancak, BPA'nın plastiklerden veya kaplamalardan gıdaya migrasyonu önemli bir sağlık sorunudur çünkü yüksek dozları böbrekleri ve karaciğeri olumsuz etkilemektedir (Usman ve Ahmad, 2016). Yapılan son güncelleme ile BPA'nın tolere edilebilir günlük alım miktarı 50'den 4 µg/kg/vücut ağırlığı/gün'e düşürülmüştür (EFSA, 2015). Ayrıca, Avrupa Birliği biberon (Muncke, 2011) üretiminde BPA kullanımını yasaklamış ve herhangi bir gıda ile temas eden malzemeden gıdaya BPA migrasyonunu 0,6 µg/g şeklinde özel bir geçiş sınırı belirlemiştir (Česen ve ark., 2016).

Bal numunelerinde BPA'nın belirlenmesi için iyon trap gaz kromatografi-kütle spektrometre (GC-IT/MS) sistemi (Notardonato ve ark., 2020a), GC/MS (Česen ve ark., 2016), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) (Tian ve ark., 2018), ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometre (UHPLC/MS-MS) sistemi (Potorti ve ark., 2023) gibi bir dizi analitik yöntem geliştirilmiştir. Son yıllarda, araştırmacıların hedefi zaman ve maliyet gibi çok önemli faktörleri dikkate alarak, hassas, basitleştirilmiş çevre dostu analiz protokolleri geliştirmektir (Notardonato ve ark., 2020a). Bu bağlamda, nano ölçekli ayırma teknikleri (örneğin, kılcal/nano sıvı kromatografisi, kılcal elektroforez/ elektro kromatografi) gıda analizlerinde birincil araçlar haline gelmiştir. Nano ölçekli ayırmalar, analitik ayırma biliminde büyük potansiyele sahip minyatürleştirilmiş tekniklerdir. Çok küçük numune boyutlarıyla çalışabilme imkanı, büyük ayırma verimliliğine ulaşma potansiyeli, mobil faz ve sabit fazın azaltılmış tüketimi (yeşil kromatografi) ve kütle spektrometresi ile daha düşük akış hızı uyumluluğu gibi avantajlarından dolayı nano ölçekli LC tekniklerinin gıda analizlerinde uygulanması oldukça önemlidir (Aydoğan, 2019). Özellikle BPA gibi düşük konsantrasyonlu kontaminantların tespitinde çok hassas ölçüm yapan cihazların kullanılması gerekmektedir.

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde balda BPA'nın tespiti için Nano-LC kullanımına ilişkin herhangi bir çalışma daha önce rapor edilmemiştir. Bu tez çalışmasında, balda BPA tespiti için ters faz nano-sıvı kromatografi (nano-LC) tekniği kullanılmış olup, hidrofobik karakterli yeni bir naftalen metil metakrilatın (NMM) monolitik nano-kolon

hazırlanmıştır. Karakterize edilen monolitik kolon kullanılarak nano-LC sisteminde baldaki BPA'nın tespiti gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bal

Eski çağlardan (yaklaşık 5500 yıl öncesinden) beri hem beslenme hem de tıbbi amaçlarla kullanılan bal, bal arıları (*Apis mellifera*; Familya: Apidae) tarafından çiçek nektarından elde edilen doğal bir üründür. Bal arılarının topladığı nektar türüne bağlı olarak günümüzde yaklaşık 300 çeşit bal olduğu bilinmektedir (Lay-Flurrie, 2008).

Balın, kuru ağırlığının %95-97'si karbonhidratlardan oluşmaktadır. Monosakkaritler (fruktoz ve glikoz) balın en önemli karbonhidratlarıdır ve balın besinsel ve fiziksel etkilerinin oluşmasında katkıda bulunur (Manyi-Loh ve ark., 2011). Balın früktoz oranı yüksek olduğundan (bal, şekerden %25 daha tatlıdır) antik çağlardan beri doğal tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Samarghandian ve ark., 2017). Monosakkaritler dışında daha küçük miktarda disakkarit (sakkaroz, galaktoz, alfa, beta-trehaloz, gentiyobiyoz ve laminaribioz), trisakkaritler (melezitoz, maltotrioz, 1-ketoz, panoz, izomaltoz glikozu, erlos, izomaltotrioz, theanderoz, sentoz, izopanoz ve maltopentaoz) ve oligosakkaritler balda bulunur (Siddiqui ve Furgala, 1967; Sato ve Miyata, 2000). Bu karbohidratların çoğu balın olgunlaşması sırasında oluşmaktadır. Ayrıca balda, proteinler, vitaminler, amino asitler, mineraller, organik asitler (Betts, 2008, El-Soud, 2012), flavonoidler, polifenoller, indirgeyici bileşikler, alkaloidler, glikozitler, kardiyak glikozitler, antrakınon ve uçucu bileşiklerde bulunmaktadır (White, 1980; Islam ve ark., 2012). Balın içeriğinde dokuz esansiyel amino asidin tamamı ve asparajin ve glutamin dışında esansiyel olmayan amino asitlerin hepsi yer almaktadır. Balda, mevcut olan ana organik asit glukonik asittir ve az miktarda asetik, formik ve sitrik asitte bulunur. Organik asitlerin varlığının bir sonucu olarak balın pH değeri 3,2 ile 4,5 arasındadır (Siddiqui ve Furgala, 1968; Mato ve ark., 2003).

Prolin balda bulunan birincil amino asittir ve bunu diğer amino asitlerin takip ettiği bildirilmiştir (French ve ark., 2005). Balın yapısında diastaz, invertazlar, glukoz oksidaz, katalaz ve asit fosfatazlar gibi çeşitli enzimlerde bulunmaktadır (Iglesias ve ark., 2004).

Balın vitamin düzeyi düşüktür ve önerilen günlük alım miktarın altındadır ancak suda çözünen vitaminlerin tümü balda bulunur; en sık görüleni ise C vitaminidir. Balda, fosfor, sodyum, kalsiyum, potasyum, kükürt, magnezyum ve klor gibi tüm ana mineralleri içeren yaklaşık 31 farklı mineral tespit edilmiştir. Balda silikon (Si), rubidyum (Rb), vanadyum (V), zirkonyum (Zr), lityum (Li) ve stronsiyum (Sr) gibi birçok temel eser bileşende saptanmıştır (Varlova ve Pridal, 2002). Yapılan çalışmalarda balın potansiyel biyomedikal etkilerine katkıda bulunan yaklaşık 600 uçucu bileşiğin olduğu belirlenmiştir (Ajibola ve ark., 2012). Balın uçucu bileşikleri arasında aldehitler, alkoller, hidrokarbonlar, ketonlar, asit esterler, benzen ve türevleri, pıran, terpen ve türevleri, norisoprenoidlerin yanı sıra kükürt, furan ve siklik bileşikleri yer almaktadır (Manyi-Loh ve ark., 2011b; Barna ve ark., 2010).

Balda antioksidan görevi gören iki ana biyoaktif molekül, flavonoidler ve polifenoller bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, balda otuza yakın farklı polifenolün varlığı tespit edilmiştir (Uthurry ve ark., 2011; Nurul ve ark., 2013). Bu polifenollerin baldaki varlığı ve miktarları nektarın alındığı çiçeğin kaynağına, iklim ve coğrafi koşullara bağlı olarak değişebilmektedir. Galangin, quercetin, kaempferol, luteolin ve isorhamnetin gibi bazı biyoaktif bileşikler tüm bal türlerinde bulunurken, naringenin ve hesperetin yalnızca belirli çeşitlerde tespit edilmiştir (Khail ve ark., 2011). Baldaki fenolik ve flavonoid bileşiklerin çoğu ise gallik asit, siringik asit, ellagik asit, benzoik asit, sinamik asit, klorojenik asit, kafeik asit, isorhamnetin, ferulik asitler, mirisetin, krisin, kumarik asit, apigenin, kuersetin, kaempferol, hesperetin, galangin, kateşin, luteolin ve naringenindir (Uthurry ve ark., 2011; Nurul ve ark., 2013). Balın bu bileşenlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuar, antiproliferatif, antikanser ve antimetastatik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Samarghandian ve ark., 2017).

Balın su aktivitesi (aw) 0,56 ile 0,62 arasındadır ve pH değeri 3,9'a yakındır dolayısıyla bozulmalara karşı dayanıklıdır, buzdolabında saklanmasına gerek yoktur, oda sıcaklığında, kuru bir yerde uzun süre muhafaza edilebilir (Babacan ve Rand, 2007).

Yapısında sağlığa yararlı pek çok biyoaktif madde bulunduran bala dışardan bir madde ilave edilmesi veya yapısından bir maddenin uzaklaştırılması kanunen yasaktır (Mutlu ve ark., 2017).

Ancak sağlık için şifa kaynağı olan balın içeriğinde ağır metaller, pestisit, antibiyotik ve mikroplastik kalıntıları gibi kirletici maddelerde tespit edilmiştir (Eissa ve ark., 2014; Mahmoudi ve Pakbin, 2015; Česen ve ark., 2016; Fakhri ve ark., 2019). Balın bileşimi ve kalitesi büyük ölçüde biyotik ve abiyotik parametrelere yani nektarın alındığı çiçeğin türüne, çiçeğin yetiştiği bölgenin coğrafi ve iklim koşullarına, balın işlenmesi ve depolanmasına bağlı olarak değişmektedir. Arılar çok geniş bir alanda (7 km²'den daha geniş) nektar toplar ve bu sırada hava, su ve toprak ile doğrudan temas halindedir (Soleyman ve ark., 2016). Arıların faaliyette bulunduğu alanda çevresel kaynaklı kirletici maddelerin varlığı onları etkilemekte hatta o kirletici maddeleri kolonilerine ve ürettikleri bala aktarmaktadırlar. Bu bağlamda balın bileşiminde tespit edilen ağır metaller ve pestisitler çevresel kirlenmenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel atıklar, trafik gibi çeşitli antropojenik kaynakların neden olduğu çevresel kirlilikten arılar etkilenmekte ürettikleri balda ağır metaller tespit edilebilmektedir. Kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), civa (Hg) ve alüminyum (Al) gibi konsantrasyonları standart limitlerin üzerine çıktığında toksik etki gösterebilen ağır metaller çevre kirliliğinden etkilenen bölgelerde üretilen bazı bal örneklerinde belirlenmiştir (Tüzen ve Soylak, 2005).

Balın kalitesini ve tüketici sağlığını tehlikeye düşürebilecek kirleticilerden biri de balda pestisitlerin varlığıdır. Pestisitler, zararlıları (böcekler, kemirgenler, mantarlar veya istenmeyen bitkiler -yabani otlar- gibi) ve/veya mahsullere zarar verebilecek maddeleri ortadan kaldırmak için kullanılan bir grup kimyasal bileşiktir. Arıların, pestisit ile işlem görmüş bitki nektarlarını toplaması sonucu pestisitler bala bulaşmaktadır. Tarımda pestisit kullanımının etkileri üzerine yapılan araştırmalarda, bazı pestisitlerin bal arısı ölümlerine ve mahsulün azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Polat ve ark., 2020; Fikadu, 2020).

Arı sağlığını korumak amacıyla antibiyotik kullanımı ise balda kalıntıya neden olan önemli faktörlerden biridir. Balda antibiyotik bulunması aşırı hassas kişilerde alerjik rahatsızlıklara sebep olabilmekte, antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının indüksiyonuna neden olabilmektedir. Ülkemizde ve Avrupa Birliği Ülkelerinde arıcılıkta antibiyotik kullanımına yasal olarak izin verilmemektedir (Mutinelli ve Rademacher, 2003; Atasever ve Yüksel, 2022). Ancak, dünyanın en büyük ikinci bal üreticisi olduğu ülkemizde, bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu baldaki antibiyotik kalıntıları ihracatta sorun

çıkarmakta ve şifa kaynağı balı insan sağlığına zararlı hale getirmektedir. Özellikle tetrasiklin, eritromisin, linkomisin, neomisin, streptomisin, enrofloksasin vb. antibiyotiklerin arıcılıkta, hastalıklarla mücadelede kullanıldığı bildirilmiştir (Atasever ve Yüksel, 2022).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, balda pestisit ve antibiyotik gibi kirleticilerin yanı sıra Bisfenol A (BPA) gibi çeşitli mikroplastik kalıntıların varlığı da tespit edilmiştir (Herrero-Hernández ve ark., 2009; Martín-Gómez ve ark., 2024a). Önemli bir gıda kontaminanı olan BPA gıda ve içeceklerin ambalajlanmasında kullanılan malzemelerin üretiminde hammadde olarak yer alan polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin monomeridir. İnsan sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle üzerinde en çok çalışılan bileşik olup, dünya çapında gıda ile temas eden malzemelerin üretiminde en yaygın kullanılan ürünlerden biridir. BPA, endokrin bozucu olarak kabul edilen, çok düşük dozlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen tehlikeli bir maddedir.

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılammış olsa da özellikle kadınlar üzerindeki etkileri ciddidir (Martín-Gómez ve ark., 2024b). BPA'nın bazı hormonlarla, özellikle de meme gelişimini kontrol edenlerle yapısal benzerliği tespit edilmiştir. Bu nedenle BPA'ya maruz kalmak meme dokusunda kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olabilmektedir (He ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2021). Ayrıca hamilelik sırasında BPA'ya maruz kalmanın, fetüsün sinirsel gelişimi üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği, diyabet ve kalp hastalığı riskini artırabileceği saptanmıştır (Aris, 2014). Başka bir çalışmada ise, BPA'ya maruz kalma, hamile bayanlarda spontan düşük riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Liang ve ark., 2020). Dolayısıyla, gıdalarda BPA varlığı, insan sağlığı üzerindeki potansiyel tehlikeleri nedeniyle endişe oluşturmaktadır. BPA, gıdalara ambalaj materyallerinden bulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bal da BPA ile kirlenme tespit edilmiştir (Inoue ve ark., 2003; Česen ve ark., 2016; Al Naggar ve ark., 2021).

2.2. Bisphenol A (BPA)

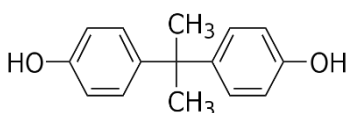
Bisfenol A (BPA), esas olarak yüksek dayanıklılık ve mukavemete sahip bir malzeme olan ve plastik malzemelerin üretiminde kullanılan polikarbonatın monomeridir. Bu

kimyasal aynı zamanda gıdayla temas eden metal yüzeylerin kaplanmasında uygulanan epoksi reçinelerin üretiminde de kullanılmaktadır. Gıdayla temas eden malzemeler, eşyalar veya cihazlar, çeşitli işlevleri nedeniyle gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle ambalaj, gıdanın korunmasından, kalite ve güvenliğin sağlanmasından, kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik bozulmadan sorumlu faktörlere karşı bariyer görevi görmesinden dolayı çok önemlidir (Vilarinho ve ark., 2019). Paketlenmiş gıdaların, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere toplumların beslenmesindeki önemi arttıkça, gıda-ambalaj etkileşimlerinden kaynaklanan toksikolojik kaygılar da artmıştır (Bernardo ve ark., 2015). Monomerler, katkı maddeleri, boyalar, mürekkepler, vernikler ve diğerlerinin yanı sıra plastik bileşenlerin gıdalara migrasyonu (Bernardo ve ark., 2015), gıdanın organoleptik özelliklerini etkileyebilir ve seviyelerinin toksikolojik değerleri veya mevzuatta belirtilen limitleri aşması durumunda sağlık üzerinde zararlı etkiler yaratabilir (Fasano ve ark., 2012). Gıdaların ambalajlanmasında BPA içerikli plastiklerin kullanılması sonucu ambalaj materyalindeki BPA ile gıda maddesi arasında kütle transferi başka bir ifade ile gıdaya BPA migrasyonu gerçekleşebilmektedir. BPA, 2017 yılında Avrupa Birliği tarafından endişe kaynağı en yüksek, maddeler listesine alınmıştır. Çünkü BPA, endokrin sistemini etkilemektedir. BPA'nın östrojenik aktivitesi ilk kez 1993'te rapor edilmiştir (Krishnan ve ark., 1993). Yapılan in vitro çalışmalarda BPA'nın genomik ve genomik olmayan östrojen yanıt mekanizmalarına aracılık ettiği yani yalancı östrojen olarak davrandığı ve çok düşük konsantrasyonlarda (0,23 ng/L) dahi hücresel fonksiyonun bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir (Wetherill ve ark., 2002; Akingbemi ve ark., 2004; Zoeller ve ark., 2005;). BPA'nın tiroid hormonunun etkisini bozma, insan prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasına neden olma ve trilyon başına çok düşük dozlarda testosteron sentezini bloke etme yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir (Vilarinho ve ark., 2019). Bu nedenle, özellikle bebekler ve küçük çocuklar gibi hassas grupları hedef alan risk yönetimi gibi yöntemlerle, insanların bu bileşiklere maruz kalmasına sınırlamalar getirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda da BPA'ya alternatif olarak kullanılan bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), bisfenol AP (BPAP) ve bisfenol AF (BPAF) gibi BPA ailesine ait diğer bifenoller de potansiyel toksisiteye sahip olup, östrojenik aktivite sergilemektedir. Ayrıca çoğunun biyolojik bozunmaya karşı BPA ile kıyaslandığında daha yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir (Feng ve ark., 2016).

2.2.1. BPA'nın Özellikleri

İlk kez 1891 yılında Rus kimyager Aleksandr Dianin tarafından sentezlenen BPA (2, 2-bis (4-hidroksifenil) 2 mol fenil ve 1 mol asetondan oluşmaktadır. Organik bir bileşik olan BPA metil köprüsünün iki fenil halkayı birleştirmesinden oluşmaktadır. BPA, oda sıcaklığında katı olup beyaz kristal şekle sahiptir. Ayrıca hafif bir fenolik kokuya sahiptir (Tan ve ark., 2022). Molekül formülü $C_{15}H_{16}O_2$ 'dir. Dimetilsülfoksit, aseton ve etanol gibi solventlerde iyi çözünür. BPA'nın fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait bilgiler Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Bisfenol A'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Tan ve ark., 2022)

Parametre	Değer
Kimyasal Formülü	$C_{15}H_{16}O_2$; $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$
Moleküler Ağırlığı	228.291 G/Mol
Erime Noktası	152-153°C
Kaynama Noktası	360.5°C (760 Mmhg)
Yanma Noktası	212°C (Açık Kaplarda)
Yoğunluk	1.195 G/Cm ³ (25°C)
Suda Çözünürlük	300 Mg/L (25°C)
Buhar Basıncı	5.3x10 ⁻⁶ Pa
Kimyasal Yapısı	

2.2.2. BPA'nın Kullanım Alanları

BPA, doymamış polyester, polisülfon ve epoksi reçineleri ile polikarbonatların üretiminde kullanılan maddelerden biridir. Dünyadan üretilen BPA'nın %25' epoksi reçine üretiminde %70'i polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılmaktadır (Er ve Sarımeahmetoğlu, 2011). BPA gıdaların muhafaza edildiği plastik kaplar, konserve kutularının iç yüzeyi, diş dolguları, kişisel bakım ürünleri, yiyecek saklama kapları, plastik su kapları vb. yer almaktadır (Otlu ve Türköz, 2016; Er ve Sarımeahmetoğlu, 2011). BPA'nın, dünyadaki üretimi yıllık 2-3 milyon tondur. Bir polikarbonat olan BPA, iş güvenlik kaskları, kurşungeçirmez camlar, ürün saklama kapları, otomotiv sektörü,

PVC pencerelerde kullanılmaktadır. Ayrıca şarap gibi sıvı depo kaplarında, süt tozu ve salamura ambalajlarının iç yüzeyinde, elektronik aletlerde, su borularında ve termal kağıtlarda da kullanılmaktadır (Kenan, 2019).

2.2.3. BPA'nın Sağlık Üzerine Etkileri

BPA, vücuttaki hormonların düzenli işleyişini bozma kabiliyeti nedeniyle endokrin bozucu olarak kabul edilmektedir. BPA, hormonlara müdahale ederek üreme bozuklukları, gelişimsel sorunlar ve metabolik bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi sağlık sorununa neden olma potansiyeline sahiptir. Ağız yoluyla ve solunum yolu yoluyla vücuda alınan bu madde, hormonal sistemdeki birçok reseptörle etkileşime girerek endokrin sistemde ciddi hasarlara neden olur. BPA'nın endokrin bozucu etkisinin yanında, östrojen aktivitesinde değişiklikler, merkezi sinir sisteminde farklılıklar, bağışıklıklık sisteminin zayıflatılması, androjen sisteminde değişimler, tiroit hormonunda bozukluklara neden olabilmektedir. BPA'ya maruziyet en fazla oral daha sonra deri ve solunum yolla gerçekleşmektedir. Vücuda geçen BPA karaciğer tarafından emilerek major ve minor metabolitlere dönüşmektedir. BPA, lipofilik bir yapıda olduğundan yağ bakımından zengin olan dokularda birikeceği düşünülmektedir. BPA, vücuttaki yağda, anne sütünde, kanda, plasentada, amniyotik sıvıda, fetuste, idrar ve tükürükte saptanmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 2010 yılında yayınlanan raporda BPA'nın özellikle anne karnındaki bebeğe ve çocuklarda zararlı etkileri olabileceği konusunda görüş bildirmişleridir (Kenan, 2019).

2.2.4. BPA ile İlgili Yasal Düzenlemeler

BPA, dünyada ilk kez 2008 yılında Kanada da çevre ve insan sağlığı için toksik madde olarak belirlenmiştir. 2011 yılında Türkiye ve Avrupa, 2012 yılında ABD de biberonlarda kullanımı yasaklanmıştır. 2015 de EFSA bisfenol A'nın etkileri üzerinde kapsamlı bir çalışma ve değerlendirme yapılmış ve yayınlamıştır. Bu değerlendirmeye göre tolere edilebilir günlük BPA limit miktarı 50 µg/kg'dan 4 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir. 2016 yılında EFSA'nın yayınladığı verilere göre hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde BPA'nın bağışıklık sistemi üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu limit geçici olarak karara bağlanmıştır (Tan ve ark., 2022). Türk Gıda

Kodeksi BPA'nın salınımı gıdayla temas eden ambalajlardan 0,6 mg/kg olarak belirlemiştir (Kenan, 2019).

2.2.5. BPA'nın Gıdalar ile İlişkisi

Gıda üretiminde, gıdaların ambalajlanmasında BPA içerikli plastikler kullanılmaktadır. Gıda ambalaj materyalinden gıdaya BPA gibi pek çok madde migrasyonla geçmektedir. Bu geçiş ambalaj ile gıdanın temas süresi, temas ettiği yüzey alanı, migrant çeşidi ve konsantrasyonu, gıda maddesinin bulunduğu form (sıvı, katı, yağlı, asitli), ambalaj materyalinin kimyasal ve fiziksel özellikleri, ortamın sıcaklığı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. BPA içeren ambalajlar yüksek sıcaklığa maruz kaldığında (mikrodalgada pişirme gibi) ambalajdan gıdaya BPA'nın migrasyonu daha yoğun ve daha hızlı gerçekleşmektedir. Ayrıca ambalajlanan gıda ürününün içeriği de migrasyonda etkilidir (Andújar ve ark., 2019). Aynı zamanda BPA'nın depolama süresinden etkilendiği ve depolama süresi boyunca gıda da biriktiği belirtilmiştir. Tarım ve Ticaret Enstitüsü gıda ve sağlık programında gıdanın plastik kaplarda ısıtılması, yağlı ve asitli gıdaların ambalaj ile teması, sıcak gıdaların plastik kaplara konulması, çizilmiş eski plastik ambalajların kullanımı ve deterjanların BPA geçişini arttırdığı belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarla BPA geçişinin büyük kısmının konserve kutularda olduğu, hasarlı kutularda muhafaza edilen gıdaların depolanması sırasında BPA geçişi düzeyinin daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Er ve Sarımeahmetoğlu, 2011). Türk Gıda Kodeksinde BPA'nın ambalajdan gıdaya geçiş sınırı 0,6 mg/kg olarak belirlenmiştir (İyigündoğdu ve ark., 2020).

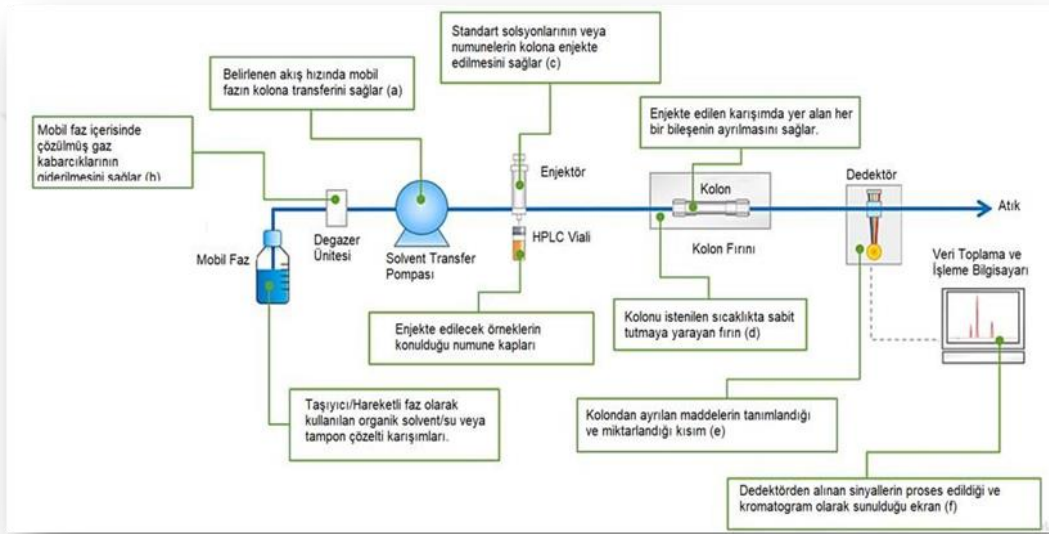
BPA'nın her yerde bulunmasından kaynaklı olarak kontrol altına alınması zorlaşmakla birlikte BPA'ya maruz kalmamış nüfus yoktur. Plastik maddelerin gıda ile temas etmesi sonucunda kimyasal maddeler gıdaya geçebilmektedir. BPA gibi kimyasal maddeler içeren malzemeler ile gıda arasındaki temas raf ömrünün bitmesinden önce sona erdirilmelidir. Ambalajlar gıdadan uzaklaştırılıp gıda tüketilmelidir. BPA rahat bir şekilde metabolize olduğu için vücutta emilimi olmakta, dokularda birikebilmektedir. Böyle bir durumda BPA'ya maruz kalma gelecek için büyük bir tehlikedir. BPA'nın insanlar üzerindeki etkilerini net olarak belirlemek zordur. Çünkü insanlar çok sayıda endokrin bozucuya maruz kalabilmektedir. Daha doğru sonuçlar için biyo izlemeler tasarlanırken

çeşitli önlemler alınmalıdır. Epidemolojik sonuçlar için kampanya ve protokollere önem verilmelidir. Bu durumda dikkat edilmesi gereken hususlar; BPA dışında kontaminasyonun önlenmesi gerekmektedir. Örnekleme, analiz ve serbest ölçüm sırasında örnekleme, örnek işlem, prosedür, saklama koşulları da biyo izlemeye dahil edilmelidir. Olası kontaminasyonu önlemek için laboratuvar ve ek alan gereklidir. BPA etkilerinin doğru şekilde ortaya konması için deneysel prosedürlere güvenmek önemlidir (Geens, 2012). Son düzenlemelerle ile gıda paketleme şirketleri BPA içeren materyalleri ortadan kaldırmak için alternatif maddeler araştırmaktadırlar. Ürünlerde BPA içermeyen etiketli ürünlerin satışı artmaktadır. Bununla birlikte BPA analoglarının kullanımı giderek artmaktadır. BPA analogları yapı olarak temel bisfenol yapısı olan kısa bir karbon ve bir kimyasal zincirle ayrılan iki benzen halkasından oluşur. BPA analoglarının hormonal etkileri üzerine sınırlı çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca yapılan sınırlı çalışmalarda bazı BPA ikamelerinin BPA'ya göre daha fazla östrojenik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Kuruluşlar tarafından düzenleyici önlemler olarak, kimyasal tehlikelerden biri yerine bir diğer kimyasal tehlike kullanılarak çözüm bulunmaya çalışılmaktadır. Bu analogların bir kısmı BPA'ya göre düşük konsantrasyonlarda etkilemekteyken bir kısmı BPA'ya göre daha yüksek konsantrasyonlarda sağlığı olumsuz etkilemektedir (Almeida ve ark., 2018).

BPA'nın yapısında bulunan ester bağlarını hidrolizini arttıran temel faktörler ısı, sıcaklık, asitlik gibi çevresel faktörlerdir. Bu faktörler BPA'yı polikarbonat ve epoksi reçinelerine parçalar. BPA salınımı düşük polikarbonatlarda pH çözeltilerinde sık görülürken, epoksi reçinelerinde yüksek sıcaklıkta artar. Konserve gıdalardan olan balık, et, sebzeler ve süt ürünleri, bebek maması BPA içerebilir. Ayrıca gıda dışında kapalı alanlarda solunan toz, termal kağıt, diş dolgularından kaynaklı olarak insanlar maruz kalabilmektedir. BPA endokrin bozucu etkisi nedeniyle obezite, meme kanseri, diyabet, böbrek hastalıkları, kronik solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, davranış bozuklukları, tiroid hormonu rahatsızlıkları, üreme bozuklukları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca BPA genotoksik ve mutajenik potansiyele sahiptir. Sağlık üzerindeki zehirleyici etkilerinden kaynaklı olarak BPA'nın alternatifleri artmıştır. BPA'nın yerine BPS, BPF, BPAF ve BPZ kullanılmaktadır. Ancak BPA analogları da bisfenol ailesinden olduğundan benzer toksik etkilere sahiptir veya canlı organizmalar için daha riskli olabilecekleri düşünülmektedir (İyigünoğdu ve ark., 2020).

2.3. Sıvı Kromatografisi (LC)

Sıvı kromatografisi (LC), katı faz ve sıvı faz arasında fiziksel bir ayırma tekniğidir. Bir numune, hareketli faz ve sabit faz arasında dağıtılarak bölme, adsorpsiyon veya diğer etkileşimler yoluyla içerdiği analitlerine ayrılır (Dong, 2019).



Şekil 2.1. LC sisteminin şematik gösterimi. (https://labakademi.com.tr/yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc-nedir)

LC sistemi (Şekil 2.1) pompa, enjektör, kolon, dedektör, veri kaydedici ve atıktan meydana gelmektedir. HPLC sisteminde sabit faz ile mobil faz arasında analiz edilen bileşenlerin göç etme hızlarının birbirinden farklı olması esasına dayanmaktadır. Kolondan ayrılan akışkanın toplamına "effluent", mobil faz kısmına "eluent" ve ayrılmış bileşen kısmına da "eluat" denilmektedir. Sıvı kromatografisi 1900'lerin başında, "klasik kolon kromatografisi" olarak meydana çıkmıştır (Snyder ve Kirkland, 1979). 1941'de Martin ve Synge tarafından zamanla sıvı kromatografisi (LC) metodu geliştirilmiş ve yapılan çalışmalarda sıvı-sıvı kromatografisine ve kromatografinin teorik modeline ek olarak, LC'nin "hareketli faz içinde çok küçük bileşenlerin kolon boyunca yüksek basınç farkı" oluşturması öngörülmüştür (Ettre, 1971). LC sisteminde yüksek basınçlı pompalar

gerektiren küçük partiküllü kolonların tercih edilmesiyle yüksek performansa dönüşmüştür. Zamanla tüm LC üniteleri dahil kolonların, pompaların ve dedektörlerin ticarileştirilmesi, kullanımı kolaylaştırıp kullanıcılar tarafından uygulamada kolaylık sağlamıştır (Neal, 1995). Gaz kromatografi (GC)'de, uçucu olmayan ve farklı özellikteki bileşenlerin analiz edilememesi sıvı kromatografisine olan ilgiyi arttırmıştır (Neal, 1995).

HPLC genellikle uçucu olmayan organik bileşiklerin analizinde kullanılmaktadır. Aminoasit, protein, nükleik asit, hidrokarbon fenol bileşikler, pestisit gibi bileşenler HPLC de hassasiyetle analiz edilmiştir (Sestak ve ark., 2015). LC için terminoloji kolon iç çapına (i.d.) veya analiz boyunca uygulanan akış hızına dayanmaktadır (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020). İç çapına göre çeşitli kolon tiplerinin isimleri ve bunlarla ilişkili karakteristikler Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Sıvı kromatografi sistemlerine göre kolon tipi ve akış hızları (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020)

Kolon İç Çapı (i.d.) (mm)	Akış Hızı (mL min ⁻¹)	İsmlendirme
4,6-3,2	2,0-0,5	HPLC
3,2-1,5	0,5-0,1	Microbore LC
1,5-0,5	0,1-0,01	Micro LC
0,5-0,15	0,01-0,001	Kapiler-LC
0,15-0,01	0,001-0,0001	Nano-LC
0,05-0,005	<0,0001	Open-Tubular LC

Tablo 2.1 de kromatografik teknikte kullanılan kolonların iç çapı ve akış hızları arasındaki farklar gösterilmiştir. Nano-LC'de kolon iç çapı 10-150 µm ve akış hızı ise 1000-50 nL/dk olup bu değer aralığında çalışma koşulları oluşturulmaktadır. Kolon iç çapı ve akış hızının düşük olması yüksek basınçlı sistemlerin kullanılmasını zorunlu kılmıştır.

2.4. Nano-LC

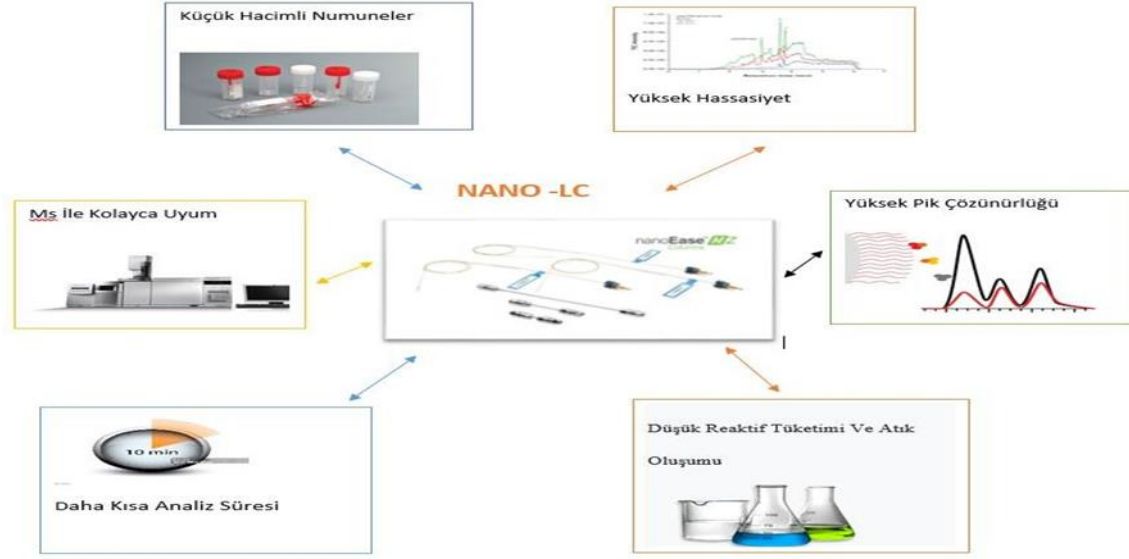
Minyatürleştirilmiş LC teknolojisine dayalı analitik metodların tarihi 20. yüzyılın ikinci yarısına kadar uzanmakta olup bu metodlar 21.yüzyılda da yapılan çalışmalarla yaygınlaşmıştır (Foley, 1996). Nano-LC genel anlamda yüksek hassasiyet gerektiren, bir karışımda çok düşük miktarda bulunan bileşenlerin analizinde kullanılan modern

kromatografi sistemi olarak tanımlanır (Sestak ve ark., 2015). Nano-LC kromatografi tekniği kolon iç çap (i.d.) ve/veya hareketli faz akış hızına göre adlandırılmaktadır. Nano terimi uygulanan nano hacimden kaynaklanmakta olup bu durum günümüzde ise daha çok ayırma için kullanılan kolonun iç çapının 10-200 μm aralığında olması ile açıklanmaktadır (Aydoğan ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan Nano-LC sistemi

Gıda, ilaç, çevre analizlerinde olmak üzere pek çok alanda uygulanmaktadır (Aydoğan, 2019; Roberg-Larsen ve ark., 2021). Nano LC, klasik HPLC sisteminin geliştirilmiş hali olarak karşımıza çıkmaktadır ve klasik HPLC sistemine göre düşük numune gereksinimi, kısa analiz süresi, az miktarda reaktif kullanımı, MS ile uyumlu olup yüksek hassasiyet sunması, partikül çapının ve kolon uzunluğunun azaltılması, hızlı analizlere olanak sağlaması gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Aydoğan, 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nano-LC sisteminin avantajları

Bu sistemde birçok karmaşık yapıda bileşen etkin olarak analiz edilmesi ve moleküler omik çalışmalarında kullanılmaktadır (Asensio-Ramos ve ark., 2017).

2.4.1. Nano-LC Kolon Türleri

Kromatografik analizlerde kolonun uzunluğu, iç çapı ve sabit faz türü analizin performansını etkilemektedir. Küçük iç çapa sahip kolon seçimi herhangi bir analitik ayırmanın performansı için önemlidir. Nano-LC sisteminde ayırım 10 ila 150 μm arasında iç çaplı nano kolonda yapılır. Kolonlarda genel anlamda sabit faz olarak silika kullanılmakta olup diğer kullanılan sabit fazlar ise organik polimer, zirkonya, titanyum oksit, alüminyum oksit ve gözenekli grafitleştirilmiş karbondur. Diğer kromatografi türlerinde olduğu gibi, kolonlarındaki fonksiyonel grup genel anlamda C18, C8 ve C4 gibi ters faz olup amino ve amid gibi HILIC fonksiyonel gruplarına sahip kolonlar da ticari olarak satılmaktadır. Enantiyomerik ayırmalarda ise kiral bileşiklerin ayırımı için polisakkarit ve onun türevi bazlı CSP (kiral sabit faz), polimer bazlı CSP ve silika bazlı CSP kolonlar kullanılmaktadır (Hernández-Borges ve ark., 2007; Sestak ve ark., 2015b, Wilson ve ark., 2019).

Kolonun iç çapının azalmasına bağlı olarak analizinde ayrıştırılan bileşiklerin kolondaki konsantrasyonu yükselir ve elektrosprey iyonizasyon (ESI-MS) kütle spektrometresi gibi düşük konsantrasyona duyarlı dedektörlerle beraber kullanıldığında yüksek hassasiyet elde edilir (Wilson ve ark., 2019). Literatürde Nano-LC sisteminde omik, gıda güvenliği ve kalitesi gibi farklı araştırma alanları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Aydoğan ve ark., 2021; Şeker ve ark., 2022). Yapılan çalışmalar nano-LC kolonların geliştirilmesine odaklanan çalışmaları teşvik etmekte olup kolon teknolojisine ilgiyi zamanla artırmıştır (Wilson ve ark. 2019; Aydoğan ve ark., 2020).

Tablo 2.3. Nano-sıvı kromatografisinde kullanılan analitik kolon tipleri (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020)

Kolon Türleri	Sabit Fazlar	Uygulamalar	Avantajlar
Partikül Dolgulu Kolonlar	Alkil bağlı (C8, C18), Fenil-heksil, Siyano Amino diol	Gıda, çevre, ve ilaç analizi	Birden fazla sabit fazın farklı seçiciliği mevcuttur.
Monolitik Kolonlar	Organik polimer monolitler Silika bazlı monolitler Hibrit monolitler	Biyoanaliz için kiral ayırmalar, afinite kromatografisi ve biyomoleküller	Yüksek geçirgenlik, hızlı kütle transferi, düşük ayırma süresi, ayarlanabilir özellikler ve kolay üretim
Açık Tubüler Kolonlar	WCOT: fiziksel olarak adsorbe edilmiş polimerik fazlar ve nanopartiküller; PLOT: kimyasal olarak bağlı polimerik fazlar.	Yetersiz numuneler için: adli tıp, tıp, biyotıp	LC-EI-MS için daha uygun olan yüksek kromatografik verimlilik, optimum geçirgenlik ve düşük karşı basınç oranları

Tablo 2.3'de özetlendiği gibi Nano-LC kolonları monolitik kolonlar (polimer monolit, silika monolit, hibrit monolit), açık tubüler (duvar kaplamalı kolon, PLOT kolon) ve dolgulu kolon olarak 3 gruba ayrılmaktadır (Aydoğan, 2019b).



Şekil 2.4. Analitik nano kolon türleri soldan sağa a) Açık tubular, b) Partikül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar

Monolitik ve partikül dolgulu kolonların içerisine dolgu yapılır ancak açık tubüler kolonlar da ise kolon iç duvarı kaplanıp orta kısımda açıklık kalacak şekilde yapılır. Monolitik kolonların görünümü dallanmış ağsı bir yapı şeklindedir (Şekil 2.4).

2.5. Monolitik Kolonlar

Monolitler, sadece bir yapıdan oluşan ve homojen yapıya sahip tek parçadan oluşan network yapılarıdır (Arrua ve ark., 2012). Svec ve Frechet tarafından 1900'lerin başlarında partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak polimer monolitik sabit faz önermişlerdir (Svec ve Frechet, 1992). Bu kolonların partikül dolgulu kolonlardan daha yüksek geçirgenliğe sahip olduğu ve analiz yapıldığı süreçte daha düşük analitin kütle transfer direncine sahiptir (Ladisich ve Zhang, 2016). Son yapılan çalışmalarda monolitik kolonlar kolay hazırlama, yüksek akış hızında hızlı ayırma, yüksek geçirgenlik, küçük moleküllerin ve makro moleküllerin ayrılması gibi birçok avantaj sağlamaktadır (Liu ve ark., 2013).

Monolitik kolonlar, yapısındaki bileşimlerine göre üç ana gruba ayrılmakta olup bunlar; organik polimer bazlı, inorganik silika bazlı ve organik-silika hibrit monolitlerdir (Aydoğan ve ark., 2020). Hidrofobik, hidrofilik, iyonize olabilen zwitteriyonik monomerlerin kullanımıyla monolitik kolonların hazırlama tekniğini çeşitlilik göstermektedir (Svec, 2004a). Monolitik kolonlar farklı numuneler için ön kolon (trap kolon) ayrıca moleküllerin ayrılması için analitik kolon olarak kullanılabilir.

Monolitik polimerlerler monomerlerin porojenik karışım ve polimerizasyon reaksiyonunu başlatan bir radikal başlatıcı içeren homojen bir polimerizasyon karışımını yalnızca bir basamakta hazırlanır (Arrua ve ark., 2012). Yapısındaki fonksiyonel monomerlerin çeşitliliği nedeniyle polimer bazlı monolit kolon; ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) gibi birçok kromatografik tekniklerde yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Talebi ve ark., 2013). Polimer monolit nano kolonlar omiks uygulamalarında, gıda güvenliği ve kalitesi biyoanalitik kimya gibi alanlarda yapılan çalışmalar mevcut olup protein analizinde (Aydoğan, 2016; Aydoğan ve ark., 2021), iyon analizinde (Aydoğan ve ark., 2015), proteomik çalışmalarında (Yi ve ark., 2017) mikro-nano ölçekli kromatografi çalışmalarında (Vasconcelos ve ark., 2020) analitik kolon olarak tercih edilmiştir. Polimerbazlı monolitler metakrilatbazlı strienbazlı akrilamidbazlı olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Monolitik kolon üretiminde farklı işlemler kimyasal maddeler ve deneysel yöntemler denenmiştir. Yöntemde bir başlatıcı reaktif ve bir çapraz bağlayıcının ilavesiyle sıvı bir çözelti hazırlanıp kolona enjekte edilir polimerizasyon reaksiyonuyla aktifleştirilme işlemi gerçekleştirilir (Lima ve ark., 2023). Polimer monolit ile nano kolonun duvarı arasında kovalent bağ olması için silanizasyon işlemi yapılmaktadır. Yüksek basınca dirençli, mekanik olarak stabil polimer monolit kolonlar hazırlamak amacıyla polimerin iç yüzeye kovalent olarak bağlanması gerekmektedir. Bu işlem polimerizasyon aşamasından önce bir ön hazırlama işlemidir. Polimer monolit kolon elde edebilmek için gözenek oluşturucu çözücüler ve termal radikal başlatıcı içeren organik polimer içeren karışım kolona enjekte edilir. Monolit yapımında polimerizasyon reaksiyonunun süresi ve sıcaklığı parojen solvent seçimi ve karışımdaki monomer/parojen solvent oranı monolit yapının elde edilmesinde önemli rol oynar (Ghanem ve ark., 2022).

Organik polimer monolitik kolonlarda mezo ve makro gözenekler olmak üzere iki farklı gözenek türü vardır. Mezo gözenekler (2 - 50 nm), hareketli mobil faz ile dolu olup analitin aktif adsorpsiyon bölgelerine erişmesini sağlar. Makro gözenekler, geri basıncı önemli düzeyde artırmadan daha fazla mobil faz akışını sağlar. Mezo gözenekler yüzey alanına, makro gözenekler ise esas olarak gözenekliliğe yarar sağlamıştır (Svec, 2004b). İyi bir monolitik kolon, geniş bir yüzey alanı sergileyen alıkonma için yüksek bir akış ve düşük bir geri basınç sağlayan kolondur.

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Tüm dünyada tüketilen sağlıklı ve doğal bir ürün olan bal, ambalajından ve diğer gıda ile temas eden materyallerden geçen BPA gibi bileşikler nedeniyle kirletici maddeler içerebilir. Balın BPA ile kontaminasyonunda ana etken ambalaj materyali iken, bal arılarının kovana yakın bitkiler, hava, toprak ve su ile etkileşime girmesi nedeniyle balı BPA ile kirletmeleri mümkündür. Bu nedenle, eğer bu matrisler BPA ile kontamine olursa, bu bileşikler bal arılarına aktarılabilir ve sonuçta bal da dahil olmak üzere diğer kovan ürünleri de BPA ile kirlenebilmektedir (Al Naggar ve ark., 2021). BPA'nın yüksek toksisitesi ve endokrin bozucu olarak insan sağlığına yönelik potansiyel tehdidi dikkate alındığında gıda örneklerinde olduğu gibi balda da BPA'nın belirlenmesi oldukça önemlidir. Baldaki BP'yı belirlemek amacıyla yaygın olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya gaz kromatografisi (GC) gibi kromatografik teknikler kullanılmaktadır (Martín-Gómez ve ark., 2024a). BPA'nın kaynaama noktasının yüksek olması (>200 °C), uçuculuğunun düşük olması nedeniyle BPA'nın GC ile analizi, kromatografik ayırma öncesinde alkilasyon, sililasyon veya asilasyonu içeren bazı türevlendirme adımlarını gerektirir. Bu ek adımlar analiz süresinin uzamasına, yöntemin tekrarlanabilirliğinin azalmasına ve kontaminasyon riskinin artmasına neden olabilmektedir (Lestido-Cardama ve ark., 2021).

Balda BPA analizi, ilk kez Inoue ve ark. (2003), tarafından sıvı kromatografi (LC) tekniği kullanılarak yapılmıştır. Florometrik detektörün kullanıldığı LC sisteminde, 107 bal örneği analiz edilmiş ve sadece birkaç örnekte 2,0-33.3 ng/g arasında değişen miktarlarda BPA tespit edilmiştir.

Herrero-Hernández ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada, baldaki BPA'yı belirlemek amacıyla diyot dizisi algılamalı sıvı kromatografisi (LC-DAD) ve elektrosprey iyonizasyon-iyon tuzağı kütle spektrometresi (LC-IT-MS) tekniklerini kullanmıştır. Tian ve ark. (2018) ise, bal örneklerinde bisfenol A'nın hızlı ekstraksiyonu ve tespiti için kolinyum propanoat ve fosfat çözeltisine dayanan sulu bifazik bir sistem geliştirmiştir. Kolinyum propanoat (iyonik sıvı) ve fosfat çözeltileri içeren sulu bifazik sistemlerin faz

diyagramları incelenmiş ve fosfat çözeltilerinin pH değerlerinin artmasıyla sulu bifazik sistemlerin bifazik bölgelerinin azaldığı görülmüştür. Sulu bifazik sistem kullanılarak baldan BPA ekstraksiyonu yapılmıştır ve HPLC ile ekstraktlar analiz edilmiştir. Yöntemin etkinliğini belirlemek amacıyla 0,01, 0,05 ve 0,10 mg/kg seviyelerinde BPA bulaşısı yapılan bal örneklerinden analitin geri kazanımı %78-112 aralığında ve bağıl standart sapmalar ise %5,5-10,2 aralığında saptanmıştır. Geliştirilen yöntemin nispeten basit ve güvenilir olduğu ve farklı bal numunelerinde 0,01 mg/kg kadar düşük seviyelerde BPA'yı belirleyebildiği belirtilmiştir. Yöntemin, gerçek numunelerde BPA'nın rutin analizi için kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Potorti ve ark. (2023), baldaki BPA'nın diğer BPA türevlerinin belirlenmesi amacıyla Micro-QuEChERS tekniğine ve tandem kütle spektrometrisine (UHPLC-MS/MS) bağlı ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisine dayalı bir yöntem geliştirmiştir. Geliştirdikleri yöntem ile 25 adet bal örneğinin altısında $4,64 \pm 0,07$ ile $16,50 \pm 0,18$ $\mu\text{g/L}$ arasında değişen miktarlarda BPA tespit etmişlerdir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Alet ve Ekipmanlar

Monolit karakterizasyonunda ve örnek analizlerinde dedektör (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series-VWD-3400 RS), otosampler (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- WPS-3400 RS), pompa (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series-NCP-3200 RS) bölümlerinden oluşan proFlow nano LC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- NCS, 3500 RS) cihazı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer ekipmanlar ise ultra saf su cihazı (Direct-QR-3) Millipore corporation (Billerica, MA, ABD), 100 µm iç çap ve 360 µm dış çapa sahip TSP050375 fused kapiler kolon (Lot: BUHT02A, BGB Analitik), yüksek saflıkta arıtılmış su için LC-pak® (No: LCPAK000), taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss, Evo-50), karıştırıcı (WN-2800), hassas terazi (HR250AZ (252 g/ 0,1 mg), su banyosu (WF-SB11), ultrasonik su banyosu (WUC-DO6H, Wisd, Daihan Scientific (South Korea), santrifüj HERMLE (Z327K), 15 ml falkon santrifüj tüp (Lot:18229) (Biomedical, China), şırınga filtre (0,20 µm) (Lot:02821008) Corning NY 14831 (Almanya), otomatik pipet, eppendorf, cam deney tüpü (14 ml), cam baget, viyal, cutter, septum kullanılmıştır.

4.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kimyasal olarak asetonytril (ACN% 99 LC-MS Grade, ISOLAB, Almanya), trifluoroasetik asit (\geq %99,9, Sigma-aldrich, USA), lauryl alcohol (\geq %98, Sigma-Aldrich, Lot:STBJ6349, Almanya), cyclohexanol (\geq %99,9, Merck, Lot:S7764528916, Almanya), divinilbenzene (\geq %80, Sigma-aldrich, Lot:STBJ7114, USA), 2,2'-Azobisisobutyronitrile (\geq %98, Sigma-Aldrich, USA), metanol (\geq %99,9 LC-MS Grade, Lot:STBK4893, Fransa), 3-Trimetoksilil propil metakrilat (\geq %98, sigma-aldrich, Lot:MKCM9505, Çin), Sodyum hidroksit pellets (\geq %98,7, Biotech Co. Ltd.), Aseton (\geq %99,8, Carlo erba, Lot: V2H049222H, Fransa), metilbenzen (\geq %99,Merck, K46934123533, Almanya), etilenbenzen (\geq %99,5 Sigma-aldrich, Lot:BCCC565, Çin),

propilbenzen (\geq %98, Sigma-aldrich, Lot:MKCM4174, Çin), bütılbenzen (\geq %99, Sigma-aldrich, Lot:09804AE, USA), pentılbenzen (%99,5, Sigma-aldrich, Lot:BCCD4697, İsviçre), urasil (\geq %99, Sigma-aldrich, Lot:WXBD6705V, Çin), bisfenol A (\geq %99, Sigma-aldrich, Lot:MKCD7508, Tayvan), 2-naftalen metil metakrilat (NMM) (%84), CH₂Cl₂ (Diklorometan), trietilamin (Et₃N), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), Sodyum sülfat (Na₂SO₄) kullanılmıştır.

4.3. Deneysel Yöntem

4.3.1. Monomer Sentezi

NMM sentezi literatüre göre yapılmıştır (Zhang ve ark. 2014). Sentez aşamaları aşağıda anlatılmıştır.

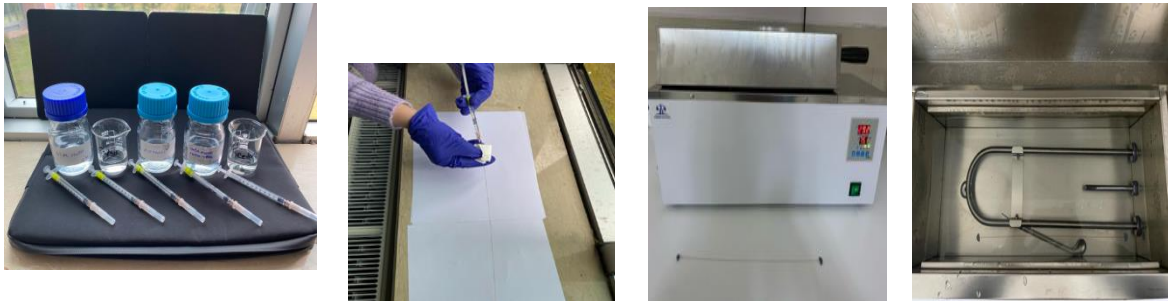
- Sentez 50 mL lik balon joje içerisinde 2-naftalen kuru CH₂Cl₂ (Diklorometan) içerisinde özdürölmüş ve 1.5 mL trietilamin (Et₃N) eklenmiştir.
- Reaksiyon 0°C'de 24 saat buz banyosunda gerçekleştirilmiştir.
- 10 ml CH₂Cl₂ içindeki metakriloil klorür 30 dakika boyunca damla damla huniye eklenmiştir.
- Reaksiyon karışımı gece boyunca karıştırılarak oda sıcaklığında yapılmıştır.
- Reaksiyon karışımı 30 mL sulu sodyum bikarbonat (NaHCO₃), su ve tuzlu su ile yıkanmıştır.
- Sodyum sülfat (Na₂SO₄) ortamında kurutulmuş, filtrelenmiş ve solvent vakumla buharlaştırılmıştır.
- CH₂Cl₂/hekzan (%25) kolon kromatografisi tekniği ile tekrar saflaştırılmış ve NMM elde edilmiştir.

4.3.2. Kolon Silanizasyonu

Silanizasyon işlemi kapiler kolonun polimerizasyon aşamasından önce bir ön hazırlama işlemi olup kolonun i duvarındaki hidrolize olmuş silanol gruplarının yoğunlaştırılması sağlayan yöntemdir. Kapiler kolonun iç yüzeyindeki siloksan grupları, polimerizasyon için bağlayıcı görevi gören silanol gruplarının yoğunluğunu artırmak için yapılan bir ön işlemdir. Silanizasyon işleminde yüksek basına dayanıklı ve stabil kolon hazırlayıp,

polimerin kolonun iç kısmına kovalent bağlanması sağlanır (Aydoğan ve ark., 2013). Silanizasyon işlemi Aydoğan, (2016)'ya göre yapılmıştır. Silanizasyon işlemi ve silanizasyon sonrası kolonun dolun için hazırlanması aşamaları aşağıda anlatılmıştır. Şekil 4.1'de kolonun silanizasyon aşamaları gösterilmektedir.

- Silanlama işleminden önce kullanılan çözeltiler hazırlanmıştır. 0,5 M NaOH ve TMSPM, MeOH ile %50-50 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Silanizasyon işlemi için 1 mL'lik şırıngalar kullanılmıştır. Her farklı yıkama aşaması için farklı şırıngalar kullanılmıştır.
- Silanlama yapılmak üzere öncelikle 50 cm uzunluğunda fused-kapiler kolon, kesici kullanılarak kesilmiştir.
- Kesilen kolon 15 dk boyunca 0,5 M NaOH ardından 15 dk süreyle deiyonize su kullanılarak yıkanmıştır.
- Sonraki adımda ise sırasıyla kolondan 15 dk MeOH ve %50-50 oranında hazırlanan TMSPM/MeOH karışımı kolondan geçirilip kolonun her iki ucu septum ile kapatılarak önceden ayarlanmış 35°C'deki su banyosunda 18-20 saat bekletilmiştir.
- Ayarlanan süre sonunda su banyosundan çıkarılan kolon 15 dk boyunca metanol ile yıkanmıştır. Bu aşamadaki amaç kapilerin iç duvarına bağlanamayan yapıların kolondan uzaklaştırılmasını sağlamaktır.
- Kolonu kurutmak için 15 dk aseton ile yıkama işlemi yapılmıştır. İşlem sonunda kolonların tamamen kuruması için kolonlar, 55 °C'deki etüvde 24 saat bekletilmiştir.

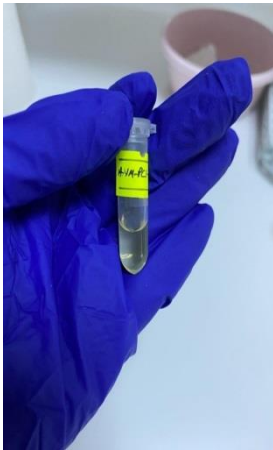


Şekil 4.1. Kolon silanizasyonu işlem basamakları

4.3.3. Monolitik Kolon Sentezi

Monolitik kolonun sentezi aşağıda anlatılmıştır.

- Monolitik kolonun hazırlanmasında, daha önce silanlama işlemi yapılmış 100 μm iç çaplı 30 cm uzunluğunda fused-silika kapiler kolon kullanılmıştır.
- Polimer solüsyonu için, %24,3 (v/v) DVB, %37,85 (v/v) siklohegzanol, %37,85 (v/v) 1-dodecanol, 45 mg NMM, 2,5 mg AIBN ependorf içerisinde hazırlanmıştır.
- Ependorf içerisindeki karışımı homojen etmek için 5 dk boyunca ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra vortekslenerek polimerizasyon karışımı kolona doluş için hazır hale getirilmiştir.
- Polimerizasyon karışımı 0,5 mL'lik şırınga yardımıyla silanlanmış iç çapı 100 μm 'lik kolona enjekte edilerek dolum işlemi yapılmıştır (Şekil 3.2).
- Dolum işlemi sonrası kolonun her iki ucuna septum kapatılarak polimerizasyon için önceden ayarlanmış 75°C'deki su banyosunda 4 saat bekletilmiştir.
- Polimerizasyondan sonra kolondaki, reaksiyona girmemiş polimerleri uzaklaştırmak amacıyla 1,2 μl akış hızında 1 saat boyunca mobil faz A (90:10, ACN:H₂O), mobil faz B (10:90, ACN:H₂O) ile yıkama işlemi yapılmıştır.



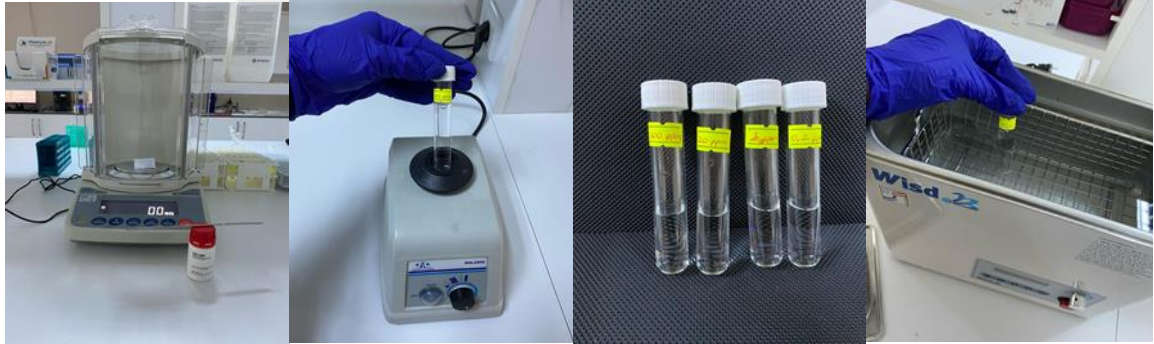
Şekil 4.2. 100 μm iç çaplı 30 cm NMM monolitik kolon sentez aşamaları

4.3.4. Alkil Bezen Çözeltilerinin Hazırlanması

Alkil benzen (ABs) çözeltisi için 8 ml ACN içerisine % 16,6 etilenbenzen, % 16,6 propilbenzen,%16,6 metilbenzen, %22,22 bütinilbenzen, % 28 pentinilbenzen eklenmiş ve vortekste karıştırılmıştır. Karışıma 1 mg urasil eklenerek vortekslendikten sonra 2 ml ultra saf su eklenerek ultrasonik su banyosunda 5 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan tüm numuneler analiz yapılana kadar + 4°C de muhafaza edilmiştir.

4.3.5. BPA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

BPA tayini için farklı %50-50 ACN/H₂O çözeltisi içerisinde farklı konsantrasyonlarda (100, 20, 2, 0,2 ve 0,002 ppm) BPA solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm numuneler analiz yapılana kadar + 4°C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.3. Numune hazırlama işlemine ait resimler

4.3.6. Bal Örneklerinin Analize Hazırlanması

Bingöl'deki yerel marketlerden temin edilen, çiçek ve salgı balından oluşan toplam 13 bal örneği analiz edilmiştir. Analizi yapılan bal örnekleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bal örneklerinden BPA ekstraksiyonunda Massous ve ark. (2023)'ların çalışmaları referans alınmış olup bazı değişiklikler yapılmıştır. Bal örneklerinden BPA ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 10 ml'lik cam deney tüpüne, cam baged kullanılarak, 5 g bal numunesi tartılmıştır.
- Üzerine 5 ml deiyonize su eklenmiş ve karışım bal tamamen çözünene kadar vortekslenmiştir.

- Hazırlanan çözeltinin üzerine 5 mL ACN eklenmiştir.
- Ultrasonik su banyosunda 2 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra hazırlanan karışım 15 mL'lik falkon santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjden alınan örneğin sıvı kısmı hemen 5 mL'lik şırınga yardımıyla 0,20 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilerek cam deney tüpüne alınmıştır. Bu işlem tüm bal örneklerinde uygulanmıştır.
- Hazırlanan tüm numuneler analize kadar + 4°C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.4. Analiz edilen bal örnekleri

4.3.7. Kromatografik Koşullar

Kromatografik analizler, Nano-LC NCS-3500 RS ProFlow-(Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series) sisteminde yapılmıştır. Kolon olarak NNM içerikli hidrofobik özellikle monolitik kolon (i.d. 100 µm, 30 cm,) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 28°C'de sabit tutulmuştur. UV/Vis dedektörde 200-214 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi 0,02 µl, mobil faz akışı 1 µl (mobil faz A/mobil faz B, 80/20) olarak ayarlanmıştır ve analiz 15 dakika sürmüştür. Analizde kullanılan mobil fazlar:

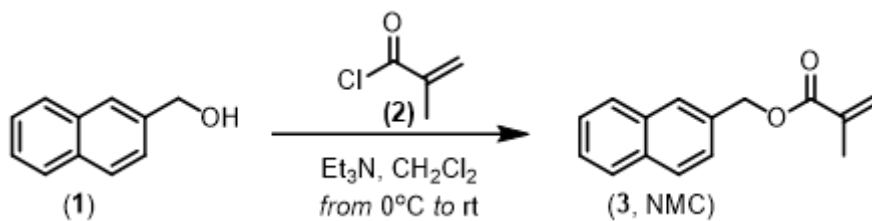
Mobil Faz A: %90 ACN, %10 H₂O, %0,1 TFA

Mobil Faz B: %10 ACN, %90 H₂O, %0,1 TFA

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Naftalen Metil Metakrilatın (NMM) Karakterizasyonu

Hedef naftalen metil metakrilatın (NMM) sentezi, Houck ve ark. (2019)'dan farklı olarak Kötteritzsch ve ark. (2018)'e göre, gerçekleştirilmiştir. Naftalen-2-ilmolanol (1, 1,00 g, 6,32 mmol), kuru CH_2Cl_2 (50 mL) içerisinde çözündürülmüştür ve ardından çözeltiliye trietilamin (Et_3N) (1,32 mL) ilave edilmiştir. Reaksiyon 0°C 'de sabit tutulurken CH_2Cl_2 (10 mL) içindeki metakriloyl klorür (2, MC, 0,78 mL) yaklaşık 30 dakika, damla damla ilave edilmiştir. Karışım, gece boyunca yavaş yavaş oda sıcaklığına ısıtılarak karıştırılmıştır. Reaksiyonun bitip bitmediği, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile kontrol edildikten sonra reaksiyon karışımı, 30 mL sulu sodyum bikarbonat (NaHCO_3), su ve son olarak tuzlu suyla yıkanmıştır. Daha sonra organik katman, sodyum sülfat (Na_2SO_4) üzerinde kurutulmuştur, süzümüştür ve solvent, vakumla buharlaştırılmıştır. Ham ürün, EtOAc /heksan (%20) ile flaş kolon kromatografisi yoluyla daha da saflaştırılmıştır ve hedef naftalen metil metakrilat (NMM, 1,12 g, %78), tam beyaz olmayan bir katı halinde elde edilmiştir. Şekil 5.1'de naftalen metil metakrilatın sentezi gösterilmiştir. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,84-7,87 (m, 4H, =CH), 7,49-7,52 (m, 3H, =CH), 6,21 (m, 1H, C=CH), 5,61 (m, 1H, C=CH), 5,37 (s, 2H, CH_2), 2,01 (m, 3H, CH_3), APT $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 18,67 (CH_3), 66,84 (CH_2), 126,07 (CH), 126,22 (=CH₂), 126,49 (=CH), 126,55 (=CH), 127,45 (=CH), 127,96 (=CH), 128,23 (=CH), 128,61 (=CH), 133,31 (C), 133,41 (C), 133,74 (C), 136,45 (C), 167,54 (C). Verilerin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Houck ve ark., 2019).

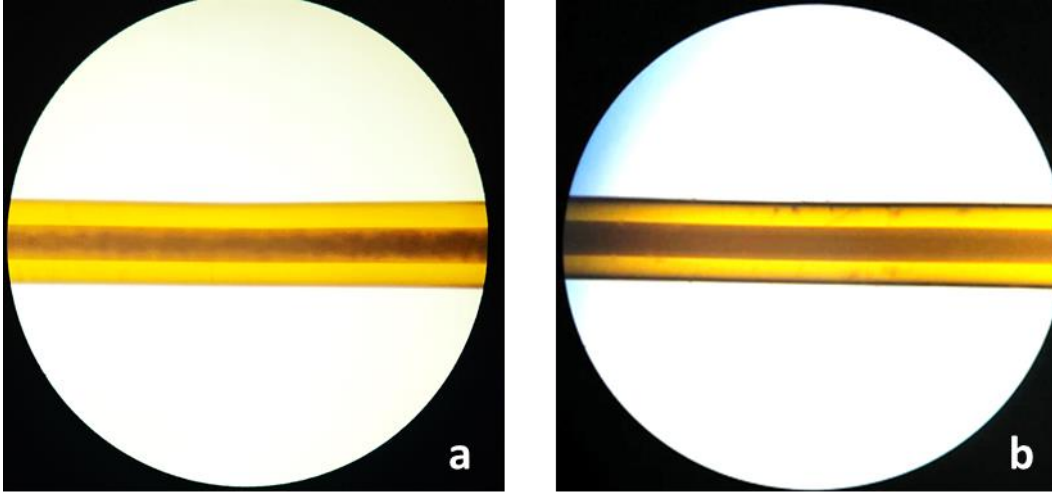


Şekil 5.1. Naftalen metil metakrilat (NMM) sentezi

5.2. Monolitik Kolonun Karakterizasyonu

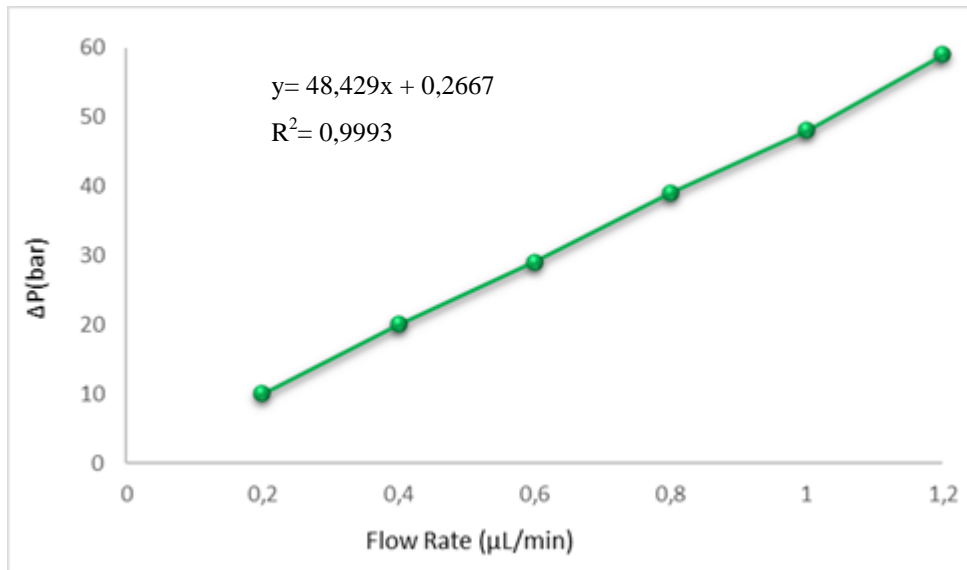
Bu çalışma kapsamında, baldaki BPA'nın Nano-LC sisteminde belirlenmesi amacıyla NMM bazlı hidrofobik özellikte monolitik nano-kolon sentezlenmiştir. Hazırlanan kolon literatürde yer alan polimer monolit kolon hazırlama esasına göre oluşturulmuş ve optimize edilmiştir.

Nano-LC sisteminde, monolitik kolonların ayırma verimliliğinin yüksek olması, analizin hassasiyeti ve güvenilirliği için çok önemlidir (Aydoğan, 2019). Yeni bir monolitin hazırlanmasında monomer kimyası, çapraz bağlanma içeriği ve porojenik içeriğin seçimi gibi temel değişkenlerin optimizasyonu gerekmektedir. Söz konusu bu parametreler monolitik kolonların fiziksel ve kimyasal bileşimi ile ilgilidir. Bu çalışmada, 100 µm iç çaplı, 30 cm uzunluğunda NMM içeren monolitik kolon hazırlamak için farklı oranlarda monomer ve porojen içeren, polimer karışımı hazırlanmıştır. Porojen sistemi olarak Cyclohexanol %37,85 (v:v), 1-Dodecanol %37,85 (v:v) kullanılmıştır. NMM bu porojen sisteminde homojen bir şekilde çözülmüş ve hazırlanan polimer solüsyonu daha önce silanlanmış boş kolonun içine doldurulmuştur. Polimerleşmenin gerçekleşmesi için dolum yapılan kolon 75°C'de 4 saat su banyosunda bekletilmiştir. Hazırlanan NMM içerikli monolitik kolonun akıştan önce ve akıştan sonra optik mikroskopta polimer yapısının görüntüleri alınmıştır ve görüntülerde polimerleşmenin iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. NMM içerikli monolitik kolonun akıştan önce (a) ve akıştan sonra (b) mikroskop görüntüleri

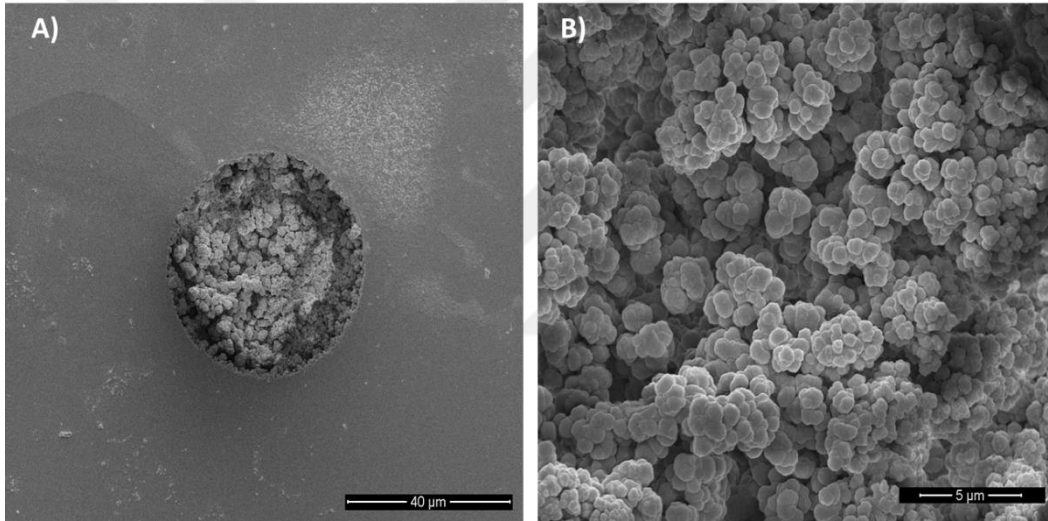
NMM monolitik kolonun mekanik stabilitesi, nano-LC sisteminde %90/10 (v/v) ACN/H₂O mobil fazı ile farklı akışlarda kolon geri basıncının (ΔP) ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.3). Kolonun akış hızının artırılması ile geri basınç artmıştır. Bu artışın doğrusal olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Akış hızı ve kolon geri basıncı arasındaki ilişkiyi gösteren R^2 değeri 0,9993 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.3. NMM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği. (Kromatografik koşullar mobil faz: % 90 ACN, %10 H₂O (v/v), injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm, kolon iç çapı 100µm, kolon uzunluğu 30 cm)

Kolonun morfolojik yapısını değerlendirmek için SEM analizi yapılmıştır. SEM analiz sonucunda kolonda iyi bir homojenizasyon gözlenmiştir. Şekil 5.4'de NMM monolitik kolonunun iki farklı büyütme seviyesindeki SEM görüntülerini gösterilmiştir. Şekil 5.4 A'da gösterildiği gibi, polimer kolon yüzeyi üzerinde sıkı bir şekilde kaplanırken, 100 nm'den küçük nano kürecikler elde edilmiştir (Şekil 5.4 B). Monolitlerin gözenek yapısı ayırma performansını etkilerken, mezo gözeneklerin eksikliği numunenin aşırı yüklenmesine neden olmaktadır.

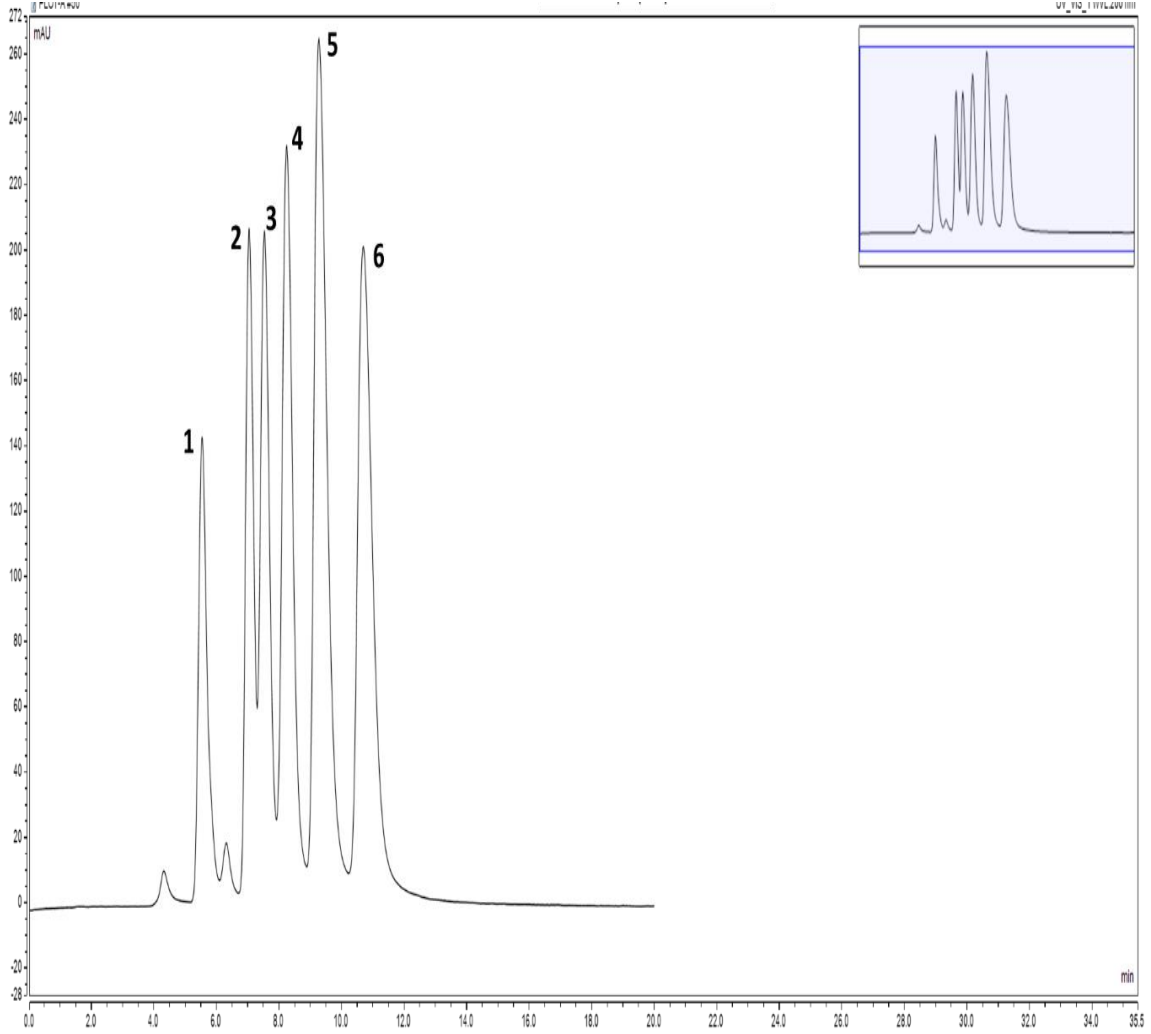
SEM görüntülerinde gösterildiği gibi birbirine bağlı makro gözenekler, proteinler gibi hem küçük hem de büyük moleküller için hızlı kütle transferine izin verebilmektedir.



Şekil 5.4. NMM monolitik kolonun A (5000x) ve B (10000x) büyütmeli SEM görüntüleri

Kolonunun, hidrofobik etkileşim davranışının değerlendirilmesinde, metilbenzen, etilbenzen, propilbenzen, butilbenzen ve pentilbenzen gibi polar olmayan alkil benzen türevleri (ABs) ile urasil kullanılmıştır. ABs analizi nano-LC sisteminde NMM monolit kolon kullanılarak yapılmıştır. Bu ayırıda kromatografik koşullar, %90/10 ACN/H₂O (v/v), akış hızı 800 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm şeklinde oluşturulmuştur (Şekil 5.5). ABs'ler yüksek ACN (%90) içerikli hareketli faz kullanıldığında iyi ayırım göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda NMM monolit kolonun hidrofobitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Kromatografik ayırıda pik

sıralaması toluen, etilbenzen, propilenzen, butilbenzen ve pentilbenzen şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 5.5).

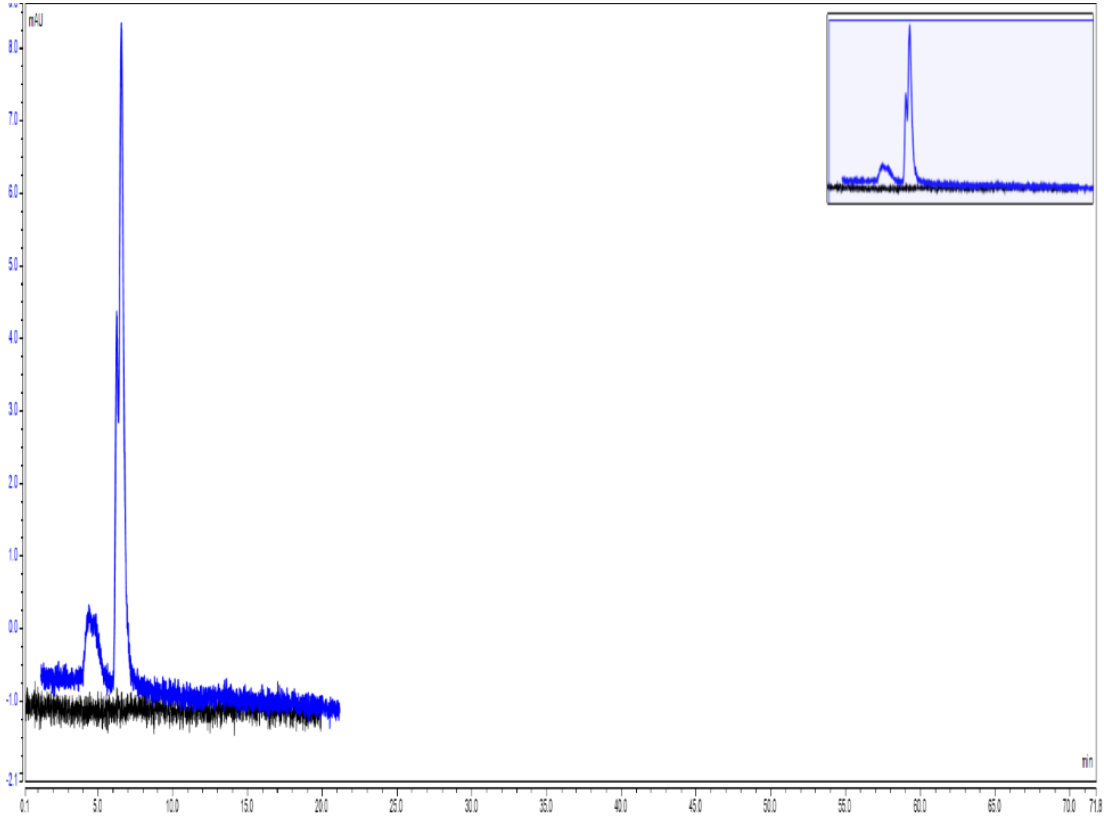


Şekil 5.5. NMM monolit kolonunda alkilbenzen kromatogramı ayrımı. Kromatografik koşullar mobil faz % 90/10 ACN/H₂O (v/v), akış hızı 800 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm, kolon iç çapı 100µm, kolon uzunluğu 30 cm. Pik sıralaması 1) urasil, 2) metilbenzen, 3) etilbenzen, 4) propilbenzen, 5) butilbenzen ve 6) pentilbenzen

5.3. Nano-LC Sisteminde BPA Tayini İçin Metod Geliştirilmesi

NMM içerikli monolitik kolon kullanılarak, BPA'nın nano-LC sisteminde analizi yapılmıştır. Öncelikle kromatografik koşulları optimize edilmiştir. Burada optimizasyon çalışmaları özellikle BPA'nın hidrofobik karakteri dikkate alınarak ters-faz kromatografik koşullarda yapılmıştır. ProFlow nano-LC sisteminde NMM monoliti kullanılarak blank solüsyon ve BPA içeren solüsyon sisteme verilmiştir ve en etkin

sonuçlar 1000 nL/dk akışta elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BPA çözeltileri hazırlanmıştır nano-LC de analiz edilmiştir (Şekil 5.6). Analiz UV-VIS dedektörde 200 nm dalga boyunda, 0,02 µL injeksiyon hacminde, 1000 nL/dk akışta 15 dakikada yapılmıştır. NMM içerikli monolitik kolonda BPA ayrımının iyi olduğu gözlemlenmiştir. Blank solüsyonda pik gözlenmezken 100 ppm konsantrasyonundaki BPA çözeltisine ait belirgin kromatogram elde edilmiştir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. BPA blank ve 100 ppm BPA kromatogramı. Kromatografik koşullar: mobil faz A %50/50 ACN/H₂O (v/v), mobil faz B %85/15 ACN/H₂O (v/v), akış hızı 1000 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,02 µL, dalga boyu 200 nm

5.4. Balda BPA Tayini

Ekstrakte edilen bal örneklerinde BPA analizi UV dedektörüne bağlı ProFlow-nano-LC-UV sisteminde yapılmıştır. NMM monolitik kolonun (100 µm i.d. × 30 cm'lik) kullanıldığı analizler, 0,02 µL injeksiyon hacminde ve 200 nm dalga boyunda, %78/22 ACN/H₂O mobil faz oranında 1000 nL/dk akış hızında 15 dakikada tamamlanmıştır.

Hazırlanan monolitik kolon kullanılarak, nano-LC yöntemi ile BPA'nın, gözlenebilirlik sınırını (LOD) ve alt tayin sınırını (LOQ) belirlemek amacıyla, blank numunelerine 0,02-5000 µg/kg konsantrasyonlarında BPA eklenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,02µg/L ve 0,58 µg/L saptanmıştır. Yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değeri ise, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde sırasıyla 2,1 ve 1,8 olarak belirlenmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Nano-LC sisteminde Bisfenol A (BPA) tayin parametreleri

Analit	LOD µg/L	LOQ µg/L	R ²	Precision (RSD %) ^a	
				Inter day	Intra day
BPA	0,02	0,58	0,9990	1,8	2,1

LOD: gözlenebilirlik sınırı, LOQ: alt tayin sınırı, a) RSD: Bağıl standart sapma (n=5).

Potorti ve ark. (2023), baldaki BPA ve türevlerini belirlemek amacıyla UHPLC-MS/MS sisteminde analiz yapmışlardır. Blank örneklerde BPA için LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0,45 ve 1,5 tespit etmişlerdir.

Ding ve ark. (2024), katı faz ekstraksiyon-HPLC-DAD sisteminde baldaki östrojenleri analiz etmişlerdir. Çalışmalarında BPA için LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0,005 µg/g ve 0,0165 µg/g bulmuştur. Yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerini ise, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde sırasıyla 4,1 ve 5,0 olarak saptamışlardır.

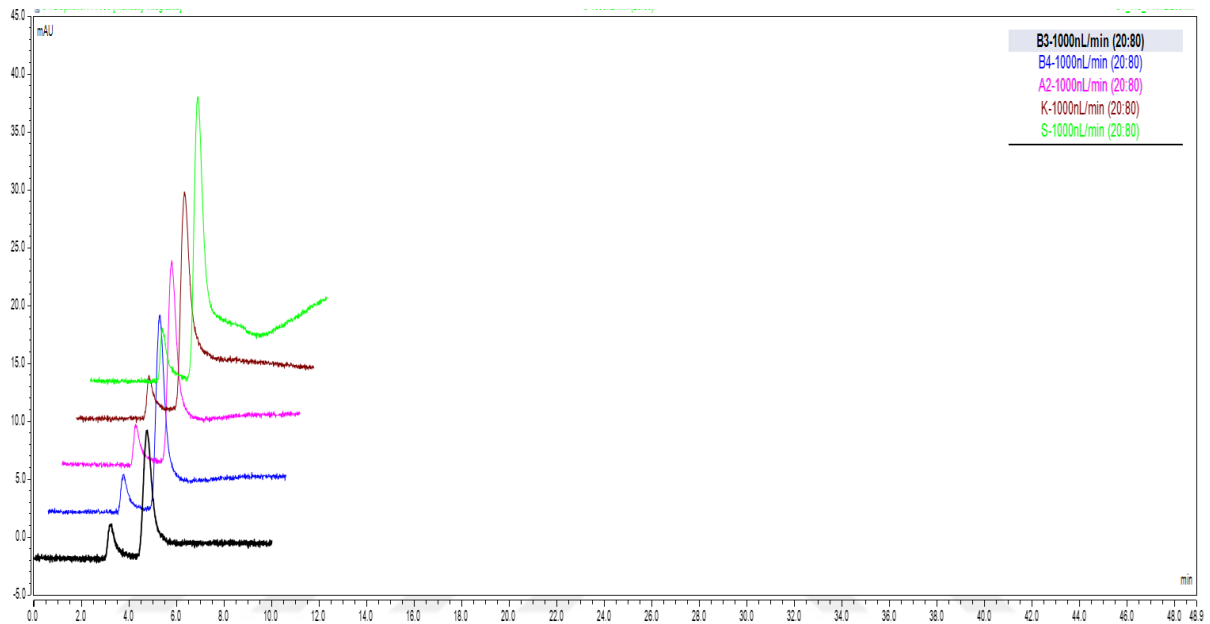
Tu ve ark. (2024), bal mumunda BPA belirlemek amacıyla HPLC-floresan deteksiyon sisteminde analiz yapmışlardır. Araştırmalarında, BPA için LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 10 µg/g ve 30 µg/g belirlemişlerdir. Yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerini ise, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinde sırasıyla 3,45 ve 5,19 belirlemişlerdir.

Çalışmamızda NMM monolitik kolon kullanılarak ekstrakte edilen 13 bal örneğinin beşinde 2,5±0,27 µg/L -12,47±0,84 µg/L arasında değişen konsantrasyonlarda BPA tespit edilmiştir (Tablo 5.2). Şekil 5.7'de BPA tespit edilen bal örneklerine ait kromatogramlar gösterilmektedir.

Tablo 5.2. Bal örneklerine ait BPA analiz sonucu

Bal	A1	A2	B1	B2	B3	B4	K	S	BO	Sİ	ÇT	MT	BT
BPA (µg/L)	-	5,7±0,41	-	-	2,5±0,27	4,24±0,81	6,3±0,65	12,47±0,84	-	-	-	-	-

(-)detekte edilmedi.



Şekil 5.7. A2,B3, B4, K ve S bal örneklerine ait BPA kromatogramı. Kromatografik koşullar: mobil faz A %50/50 ACN/H₂O (v/v), mobil faz B %85/15 ACN/H₂O (v/v), akış hızı 1000 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm

Toplam 13 bal örneğinin 2 tanesi (S ve Sİ kodlu örnekler) salgı balı diğer örnekler ise çiçek balıdır. Salgı ballarında S kodlu örnekte plastik Sİ kodlu örnek ise cam ambalajda paketlenmiştir. Plastik ambalajda muhafaza edilen S kodlu örnekte 12,47±0,84 µg/L konsantrasyonunda BPA tespit edilmiştir. Cam ambalajda satışa sunulan Sİ kodlu salgı balında ise BPA tespit edilmemiştir. Çiçek ballarından BT, MT petek balı teneke, ÇT petek balı plastik, A1, B4, BO süzme çiçek balları cam, A2, B1, B2, B3 ve K süzme çiçek balı örnekleri ise plastik ambalajda paketlenmiştir. Çiçek ballarından A2, B3, B4 ve K kodlu örneklerde sırasıyla 5,7±0,4 µg/L, 2,5±0,27 µg/L, 4,24±0,81 µg/L ve 6,3±0,65 µg/L konsantrasyonlarında BPA saptanmıştır. Çiçek ballarında en yüksek BPA cam kavanozda ambalajlanmış K kodlu süzme bal örneğinde en düşüğü ise yine cam kavanozda muhafaza edilen B3 kodlu süzme bal örneğinde saptanmıştır. Plastik

ambalajda muhafaza edilen ballardan salgı balında tespit edilen BPA miktarının çiçek balında tespit edilen miktardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. BPA ile kirlenmenin en fazla plastik ambalajda paketlenen salgı balında olduğu tespit edilmiştir. Petek ballarda BPA belirlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda balın muhafaza edildiği ambalaj türünün BPA bulaşısını etkilediği gözlemlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, doğallığı ve saflığı ile bilinen bal örneklerinde de BPA tespit edilmiştir (Inoue ve ark., 2003; Česen ve ark., 2016). Balda BPA'nın tespitine yönelik ilk çalışma Inoue ve ark., (2003) tarafından yapılmış olup plastik kap içeren bal örneklerinde BPA yüzdesini (%16,4) cam kap içeren örneklere (%14,5) göre daha fazla tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Česen ve ark., (2016), analiz ettikleri 36 bal örneğinde 0,364 ile 107 ng/g arasında BPA saptamışlardır. Balın plastik ambalajlarda muhafaza edilmesi, yine son yıllarda sıcak yaz mevsimlerinde balmumunun erimesi sonucu mahsul kaybı riskini azaltmak için plastik peteklerin kullanımının yaygınlaşması gibi çeşitli nedenlerden dolayı bal örneklerine BPA bulaşı olmaktadır. Bu nedenle, BPA'nın kaplardan yani ambalaj materyallerinden veya plastik peteklerden, bal örneklerine migrasyonu göz önüne alındığında, bal numunelerindeki BPA'nın insan sağlığına yönelik potansiyel tehdidi göz ardı edilmemelidir (Notardonato ve ark., 2020b).

HPLC-MS (Maragou ve ark., 2006), GC-MS (Dirtu ve ark., 2018), HPLC-FL(Cao ve ark., 2011) ve HPLC-UV (Cesen ve ark., 2016) sistemlerini kullanarak balda BPA analizi yapmışlardır. Tiaan ve ark. (2018), balda 0.003-0.01 mg/kg aralığında BPA tespit etmişlerdir (Tiaan ve ark., 2018). Potorti ve ark. (2023) ise UHPLC-MS/MS sistemini kullanarak bal örneklerinde 16,50-4,64 µg/L aralığında BPA saptamışlardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada BPA nano-LC sisteminde NMM monolitik kolon kullanılarak metod geliştirilmiş ve bal numunelerinde uygulaması yapılmıştır.
- NMM monolitik kolonun iç çapı 100 µm ve 30 cm uzunluğundadır.
- Monolit içerisinde polimerleşinin izlenmesi için akış öncesi ve akış sonrası optik mikroskop görüntüleri ve kolonun morfolojik yapısını değerlendirmek için SEM analizi görüntüleri incelenmiştir.
- SEM analiz sonucunda kolondaki monolit yapısının homojen dağılım gösterdiği belirlenmiştir.
- Nano-LC sisteminde NMM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyonu için mobil faz: % 80 ACN, %20 H₂O (v/v), injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm de farklı akışlarda kolon geri basıncının (ΔP) ölçülmesi ile değerlendirilmiştir. Akış hızı ve kolon geri basıncı arasındaki ilişkiyi ifade eden R² değeri 0,9993 olarak bulunmuştur.
- Hidrofobik kolonunun etkileşme davranışının değerlendirilmesinde alkil benzenlerin kromatogramına bakılmıştır. Alkil benzenler NMM monolit kolonda kromatografik ayrımı % 90 ACN, % 10 H₂O (v/v), akış hızı 1000 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,02 µl, dalga boyu 200 nm de yapılmış ve pik sıralaması 1) urasil, 2) metilbenzen, 3) etilbenzen, 4) propilbenzen, 5) butilbenzen ve 6) pentilbenzen olarak belirlenmiştir.
- NMM monolitik kolon kullanılarak, BPA'in nano-LC sisteminde analizi yapılmıştır. BPA standartından hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin nano-LC de analizi yapılmıştır. Blank solüsyonda herhangi bir pik gözlenmezken 100 ppm konsantrasyonundaki BPA çözeltisinde ait pik etkin olarak kromatogramda gözlemlenmiştir.
- İki süzme salgı bal, üçü petek bal, sekizi süzme çiçek bal olmak üzere toplamda 13 bal örneğinde BPA analizi yapılmıştır. Bal örneklerinden biri süzme salgı, biri petek ve beşi süzme çiçek balı olmak üzere 7 bal plastik ambalajda satışa sunulmuştur. Plastik ambalajda satışa sunulan bu bal örneklerinde petek olanında

BPA tespit edilmemiştir. En yüksek BPA miktarı ise salgı balında ($12,47 \pm 0,84$ $\mu\text{g/L}$) tespit edilmiştir.

- Cam ambalajda muhaza edilen 3 bal örneğinden sadece bir tanesinde BPA ($4,24 \pm 0,81$ $\mu\text{g/L}$) belirlenmiştir.
- Teneke kutularda muhafaza edilen petek ballarda ise BPA belirlenmemiştir.
- Plastik ambalajlarda muhafaza edilen bal örneklerinde BPA bulaşma riskinin diğer ambalaj materyallerine (cam ve teneke kutu) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

NMM içerikli monolitik kolon ile Nano-LC sisteminde, baldaki BPA bulaşısı hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen NMM kolon ile hidrofobik özellikteki farklı gıda bileşenlerinin, gıda kirleticilerinin vb. Nano-LC sisteminde analizi yapılabilir.

KAYNAKÇA

Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., and Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & metabolism*, 9, 1-12.

Akbulut, C., and Koç, N. D. (2013). Bisfenol A'nın Zebra Balıklarında (*Danio rerio*) Teratolojik Etkileri. *Sakarya University Journal of Science*, 17(1), 105-111.

Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R., & Hardy, M. P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 145(2), 592-603.

Akman, B. (2020). *Bisfenol-a üretim prosesinin optimum işletme ve yatırım maliyetlerinin araştırılması*. Yüksek lisans tezi, Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa.

Al Naggar, Y., Brinkmann, M., Sayes, C. M., Al-Kahtani, S. N., Dar, S. A., El-Seedi, H. R., ... & Giesy, J. P. (2021). Are honey bees at risk from microplastics?. *Toxics*, 9(5), 109.

Almeida, S., Raposo, A., Almeida-González, M., and Carrascosa, C. (2018). Bisphenol A: Food exposure and impact on human health. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(6), 1503-1517.

Altıkardeşler, Ö. K., and Baş F. (2023). Endokrin Bozucuların Ergen Sağlığı Üzerine Etkileri. *Çocuk Dergisi*, 23(2), 171-178.

Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., and Giampieri, F. (2014). The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. *Foods*, 3(3), 420-432.

Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., and Ansari, M. J. (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The scientific world Journal*, 2012.

Andújar, N., Gálvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gómez, A., Rodrigo, L., Álvarez-Cubero, M. J., Aguilera, M., and Rivas, A. (2019). Bisphenol A analogues in food and their hormonal and obesogenic effects: a review. *Nutrients*, 11(9), 2136.

Aris, A. (2014). Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reproductive Toxicology*, 45, 8-13.

Arrua, R. D., Talebi, M., Causon, T. J., and Hilder, E. F. (2012). Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules. *Analytica chimica acta*, 738, 1-12.

Asensio-Ramos, M., Fanali, C., D'Orazio, G., and Fanali, S. (2017). Nano-liquid chromatography. In *Liquid chromatography*, 6(37)-695.

Atasever, M. A., ve Yüksel, A. T. (2022). Erzurum Bölgesinde Üretilen Ballarda Bazı Antibiyotik Kalıntılarının Belirlenmesi. *Veterinary Sciences and Practices*, 17(3), 76-80.

Aydoğan, C. (2015). A new anion-exchange/hydrophobic monolith as stationary phase for nano liquid chromatography of small organic molecules and inorganic anions. *Journal of Chromatography a*, 1392, 63-68.

Aydoğan, C. (2016). Boronic acid-fumed silica nanoparticles incorporated large surface area monoliths for protein separation by nano-liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(29), 8457-8466.

Aydoğan, C. (2019). Nanoscale separations based on LC and CE for food analysis: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121, 115693.

Aydoğan, C., Aslan, H., Günyel, Z., Demir, N., Erdoğan, İ. Y., Alharthi, S., and El Rassi, Z. (2021). Graphene oxide-octadecylsilane incorporated monolithic nano-columns with 50 μm id and 100 μm id for small molecule and protein separation by nano-liquid chromatography. *Electrophoresis*, 42(24), 2637-2646.

Aydoğan, C., Gökaltun, A., Denizli, A., and El-Rassi, Z. (2019). Organic polymer-based monolithic capillary columns and their applications in food analysis. *Journal of separation science*, 42(5), 962-979.

Aydoğan, C., Rigano, F., Krcmova, L. K., Chung, D. S., Macka, M., and Mondello, L. (2020). Miniaturized LC in molecular omics. *Analytical Chemistry*, 92(17), 11485-11497.

Babacan, S., and Rand, A. G. (2007). Characterization of honey amylase. *Journal of food science*, 72(1), C050-C055.

Badolato, M., Carullo, G., Cione, E., Aiello, F., and Caroleo, M. C. 2017. From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. *European journal of medicinal chemistry*, 42, 290-299.

Barra, M. G., Ponce-Díaz, M. C., and Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(1), 75-84.

Bengü, A., ve Kutlu, M. (2020). Analysis Of Some Essential And Toxic Elements By Icp-MS In Honey Obtained From Bingöl. *Uludağ arıcılık dergisi*, 20(1), 1-12.

- Bernardo, P. E. M., Navas, S. A., Murata, L. T. F., & de ALCÂNTARA, M. R. D. S. (2015). Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade—Uma Revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(1), 1-11.
- Betts, J. (2008). The clinical application of honey in wound care. *Nursing Times*, 104(14): 43-44.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- Buket, E. R., and Sarımeahmetoğlu, B. (2011). Gıdalarda bisfenol A varlığının değerlendirilmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 82(1), 69-74.
- Burucu, V., and BAL, H. S. G. (2017). Türkiye’de arıcılığın mevcut durumu ve bal üretim öngörüsü. *Tarım ekonomisi araştırmaları dergisi*, 3(1), 28-37.
- Cao, X. L., Perez-Locas, C., Dufresne, G., Clement, G., Popovic, S., Beraldin, F., Dabeka, R., Feeley, M. (2011). Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates. *Food Addit. Contam.*, 28, 791–798.
- Česen, M., Lambropoulou, D., Laimou-Geraniou, M., Kosjek, T., Blaznik, U. k., Heath, D., Heath, E. (2016). Determination of bisphenols and related compounds in honey and their migration from selected food contact materials. *J. Agric. Food. Chem.*, 64, 8866–8875.
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Faragalla, K. M., and Reid, G. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus* larvae infection in honey bees. *The ISME journal*, 14(2), 476-491.
- Derebaşı, E., Bulut, G., Col, M., Güney, F., Yaşar, N., and Ertürk, Ö. (2014). Physicochemical and residue analysis of honey from Black Sea region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(1), 10-17.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., and Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, 8(8), e72016.
- Ding, Y., Feng, J., Sun, M., Feng, Y., Xin, X., & Sun, M. (2024). Extraction improvement of ionic liquid-functionalized silica by in situ anion-exchange for online solid-phase extraction of estrogens in honey. *Food Chemistry*, 138706.
- Dirtu, A. C., Roosens, L., Geens, T., Gheorghe, A., Neels, H., and Covaci, A. (2008). Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391, 1175-1181.
- Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons.

Durmaz, E., and Giray, B. K. (2013). Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56(4), 192-199.

Eissa, F., El-Sawi, S., and Zidan, N. E. H. (2014). Determining Pesticide Residues in Honey and their Potential Risk to Consumers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(5).

El-Soud, N. H. A. (2012). Honey between traditional uses and recent medicine. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(2), 205-214.

Ettre, L. S. (1971). Development of chromatography. *Analytical Chemistry*, 43(14), 20A-31a.

Fakhri, Y., Abtahi, M., Atamaleki, A., Raoofi, A., Atabati, H., Asadi, A., ... and Khaneghah, A. M. (2019). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in honey: A global systematic review and meta-analysis and risk assessment. *Trends in food science & technology*, 91, 498-506.

Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., & Lacorte, S. (2012). Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di (2-ethylhexyl) adipate from food packaging. *Food control*, 27(1), 132-138.

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., & Shao, B. (2016). Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 147, 9-19.

Fikadu, Z. (2020). Pesticides use, practice and its effect on honeybee in Ethiopia: A review. *International Journal of Tropical Insect Science*, 40(3), 473-481.

Foley, J. D. (1996). *Computer graphics: principles and practice* (Vol. 12110). Addison-Wesley Professional.

French, V. M., Cooper, R. A., & Molan, P. C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 228-231.

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., and Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*, 50(10), 3725-3740.

Ghanem, A., Marzouk, A. A., Sobhy, M., and Fouad, A. (2022). A polymer-based monolithic capillary column with polymyxin-B chiral selector for the enantioselective nano- high performance liquid chromatographic pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, 1662, 462714.

Gündoğdu, İ., Üstündağ, A., and Duydu, Y. (2020). Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 457.

Gürer, B., and Akyol, E. (2018). An investigation of consumers' consciousness level about food safety in honey consumption: the case of Niğde province. *Türk tarım-gıda bilim ve teknoloji dergisi*, 6(10):1303-1310.

He, H., Deng, Y., Wan, H., Shen, N., Li, J., Zeng, Q., ... & Zhong, R. (2022). Urinary bisphenol A and its interaction with CYP17A1 rs743572 are associated with breast cancer risk. *Chemosphere*, 286, 131880.

Herrero-Hernández, E., Carabias-Martínez, R., and Rodríguez-Gonzalo, E. (2009). Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection. *Analytica chimica acta*, 650(2), 195-201.

Houck, H. A., Blasco, E., Du Prez, F. E., and Barner-Kowollik, C. (2019). Light-stabilized dynamic materials. *Journal of the American Chemical Society*, 141(31), 12329-12337.

Iglesias, M. T., De Lorenzo, C., Polo, M. D. C., Martín-Álvarez, P. J., and Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 84-89.

Inoue, K., Murayama, S., Takeba, K., Yoshimura, Y., and Nakazawa, H. (2003). Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 497-506.

Islam, A., Khalil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, A., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 1-10.

İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., & Duydu, Y. (2020). Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 457.

Jovetić, M. S., Redžepović, A. S., Nedić, N. M., Vojt, D., Đurđić, S. Z., Brčeski, I. D., and Milojković-Opsenica, D. M. (2018). Urban honey-the aspects of its safety. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 69(3), 264-274.

Kekeçoğlu, M., Gürcan, M., Soysal İ. (2007). Türkiye arı yetiştiriciliğinin bal üretimi bakımından durumu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(2), 227-236.

Kenan, F. (2019). Termal kâğıtlardan insanlara geçen Bisfenol Anın belirlenmesi ve insanlara geçen miktarının teorik olarak hesaplanması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Khalil, M. I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., and Gan, S. H. (2011). Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *Journal of food science*, 76(6), C921-C928.

Khan, M. R., Alammari, A. M., Aqel, A., and Azam, M. (2020). Trace analysis of environmental endocrine disrupting contaminant bisphenol A in canned, glass and polyethylene terephthalate plastic carbonated beverages of diverse flavors and origin. *Food Science and Technology*, *41*, 210-217.

Kötteritzsch, J., Geitner, R., Ahner, J., Abend, M., Zechel, S., Vitz, J., and Hager, M. D. (2018). Remendable polymers via reversible Diels–Alder cycloaddition of anthracene-containing copolymers with fullerenes. *Journal of Applied Polymer Science*, *135*(10), 45916.

Krishnan, A. V., Stathis, P., Permeth, S. F., Tokes, L., & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, *132*(6), 2279-2286.

Ladisch, M., and Zhang, L. (2016). Fiber-based monolithic columns for liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *408*, 6871-6883.

Lay-Flurrie, K. (2008). Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit. *British Journal of Nursing*, *17*(Sup5), S30-S36.

Lazor P., Tomas J., Toth T., Toth J., Ceryova S. (2012). Monitoring Of Air Pollution And Atmospheric Deposition Of Heavy Metals By Analysis Of Honey. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.*, *1*(4), 522-533.

Lestido-Cardama, A., Loureiro, P. V., Sendón, R., Losada, P. P., & de Quirós, A. R. B. (2021). Application of chromatographic analysis for detecting components from polymeric can coatings and further determination in beverage samples. *Journal of Chromatography A*, *1638*, 461886.

Liang, F., Huo, X., Wang, W., Li, Y., Zhang, J., Feng, Y., & Wang, Y. (2020). Association of bisphenol A or bisphenol S exposure with oxidative stress and immune disturbance among unexplained recurrent spontaneous abortion women. *Chemosphere*, *257*, 127035.

Lima, I. D. P., Valle, S. P., de Oliveira, M. A. L., Marques, F. F. D. C., and Vaz, F. A. S. (2023). Monolithic stationary phases preparation for use in chromatographic and electromigration techniques: The state-of-the-art. *Microchemical Journal*, *190*, 12.

Liu, K., Aggarwal, P., Lawson, J. S., Tolley, H. D., and Lee, M. L. (2013). Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography. *Journal of separation science*, *36*(17), 2767-2781.

Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., Sobieski, E., Nazário, C. E. D., and Lancas, F. M. (2020). Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Analytica chimica acta*, *1103*, 11-31.

Maciel, E. V. S., Mejía-Carmona, K., Jordan-Sinisterra, M., Da Silva, L. F., Vargas Medina, D. A., and Lanças, F. M. (2020). The current role of graphene-based nanomaterials in the sample preparation arena. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 664.

- Mahmoudi, R., and Pakbin, B. (2015). An overview of the hazards and management strategies for antibiotic residue in honey. *Int J Food Nutr Saf*, 6(3), 1-9.
- Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., and Ndip, R. N. (2011a). Identification of volatile compounds in solvent extracts of honeys produced in South Africa. *Afr J Agric Res*, 6, 4327-34.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., and Clarke, A. M. (2011b). Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9514-9532.
- Maragou, N. C., Lampi, E. N., Thomaidis, N. S., Koupparis, M.nA. (2006). Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1129, 165–173.
- Martín-Gómez, B., Elmore, J. S., Valverde, S., Ares, A. M., and Bernal, J. (2024b). Recent applications of chromatography for determining microplastics and related compounds (bisphenols and phthalate esters) in food. *Microchemical Journal*, 109903.
- Martín-Gómez, B., Valverde, S., Bernal, J., and Ares, A. M. (2024a). Development and validation of an analytical methodology based on solvent microextraction and UHPLC-MS/MS for determining bisphenols in honeys from different botanical origins. *Food Chemistry*, 139358.
- Massous, A., Ouchbani, T., Lo Turco, V., Litrenta, F., Nava, V., Albergamo, A., ... & Di Bella, G. (2023). Monitoring Moroccan honeys: Physicochemical properties and contamination pattern. *Foods*, 12(5), 969.
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2003). Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of food protection*, 66(12), 2371-2376.
- Muncke, J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: an updated review of exposure, effect and risk assessment. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 118-127.
- Murashova E. A. A., Tunikov G. M., Byshova N. G., Serebryakova O. V. (2019). Major Factors Determining Accumulation Of Toxic Elements By Bees And Honey Products. *Int Trans J Eng Manag Appl Sci Technol*, 11(3),1-14.
- Mutinelli, F., and Rademacher, E. (2003). The use of drugs to control varroosis in honey bee colonies and European legislation: the current situation. *Bee World*, 84(2), 55-59.
- Mutlu, C., Erbaş, M., and Tontul, S. A. (2017). Bal ve diğer arı ürünlerinin bazı özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 15(1), 75-83.
- Neal, A. C. (1995). HPLC and column liquid chromatography. In *Journal of Chromatography Library* (Vol. 56, 347-374).

Notardonato, I., Passarella, S., Ianiri, G., Di Fiore, C., Russo, M. V., and Avino, P. (2020a). Analytical method development and chemometric approach for evidencing presence of plasticizer residues in nectar honey samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1692.

Notardonato, I., Passarella, S., Ianiri, G., Di Fiore, C., Russo, M. V., and Avino, P. (2020b). Analytical scheme for simultaneous determination of phthalates and bisphenol A in honey samples based on dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC-IT/MS. Effect of the thermal stress on PAE/BP-A levels. *Methods and Protocols*, 3(1), 23.

Nurul, S. M. S., Gan, S. H., Halim, A. S., Shah, N. S. M., and Sukari, H. A. (2013). Analysis of volatile compounds of Malaysian Tualang (*Koompassia excelsa*) honey using gas chromatography mass spectrometry. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2), 180-188.

Otlu, H. G., and Türköz, Y. (2016). Bisphenol A Exposure Routes Metabolism and Toxicity. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1).

Passos, H., Sousa, A. C., Pastorinho, M. R., Nogueira, A. J., Rebelo, L. P. N., Coutinho, J. A., and Freire, M. G. (2012). Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluids. *Analytical methods*, 4(9), 2664-2667.

Polat, B., ve Çetin, H. (2020). Pestisit kullanımının bal arısı sağlığına ve ürünlerine etkisi. *Journal of Research in Veterinary Medicine* 220: 39(2), 128-134.

Potorti, A. G., Litrenta, F., Sgrò, B., Di Bella, G., Albergamo, A., Mansour, H. B., and Turco, V. L. (2023). A green sample preparation method for the determination of bisphenols in honeys. *Green Analytical Chemistry*, 5, 100059.

Potorti, A. G., Litrenta, F., Sgrò, B., Di Bella, G., Albergamo, A., Mansour, H. B., ... & Turco, V. L. (2023). A green sample preparation method for the determination of bisphenols in honeys. *Green Analytical Chemistry*, 5, 100059.

Roberg-Larsen, H., Wilson, S. R., and Lundanes, E. (2021). Recent advances in on-line upfront devices for sensitive bioanalytical nano LC methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, 116190.

Samarghandian, S., Farkhondeh, T., and Samini, F. (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121.

Saral, Ö., and Yavuz, A. (2020). Rize ili üniversite öğrencilerinin arı ürünlerini tanıma durumu ve kullanım alışkanlıklarının belirlenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(2), 172-180.

Saric, G., Vahcic, N., Bursac Kovacevic, D., and Putnik, P. (2020). The Changes of Flavonoids in Honey during Storage. *Processes*, 8(8).

Sato, T., and Miyata, G. (2000). The nutraceutical benefit, part iii: honey. *Nutrition*, 16(6), 468-469.

Šesták, J., Moravcová, D., and Kahle, V. (2015). Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography a*, 1421, 2-17.

Siddiqui, I. R., and Furgala, B. (1967). Isolation and characterization of oligosaccharides from honey. Part I. Disaccharides. *Journal of Apicultural Research*, 6(3), 139-145.

Siddiqui, I. R., and Furgala, B. (1968). Isolation and characterization of oligosaccharides (Trisaccharides) from honey. *J Apic Res*, 7, 51-9.

Snyder, L. R., Dolan, J. W., and Gant, J. R. (1979). Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 165(1), 3-30.

Socas-Hernández, C., Miralles, P., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., and Coscollà, C. (2024). Assessment of anthropogenic particles content in commercial beverages. *Food Chemistry*, 447, 139002.

Solayman, M., Islam, M. A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M. I., Alam, N., and (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 219–233.

Sungur Ş., and Kanan F. (2019). Termal kâğıtlardan insanlara geçen Bisfenol Anın belirlenmesi ve insanlara geçen miktarının teorik olarak hesaplanması. *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi*, 21(1), 397-403.

Svec, F. (2004a). Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *Journal of separation science*, 27(10-11), 747-766.

Svec, F. (2004b). Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *Journal of separation science*, 27(10-11), 747-766.

Svec, F., and Fréchet, J. M. (1992). Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry*, 64(7), 820-822.

Şeker, S., Alharthi, S., and Aydoğan, C. (2022). Open tubular nano-liquid chromatography with a new polylysine grafted on graphene oxide stationary phase for the separation and determination of casein protein variants in milk. *Journal of Chromatography A*, 1667, 462885.

Talebi, M., Arrua, R. D., Gaspar, A., Lacher, N. A., Wang, Q., Haddad, P. R., and Hilder, E. F. (2013). Epoxy-based monoliths for capillary liquid chromatography of small and large molecules. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405, 2233-2244.

Tan, S., Demir, P., and Arslan, A. (2022). Bisfenol A (BFA) ve halk sağlığı açısından önemi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 34(1), 11-17.

Tian, H., Bai, X., & Xu, J. (2018). Extraction of bisphenol A in honey samples using aqueous biphasic systems coupled with high-performance liquid chromatography. *Separation Science Plus*, 1(5), 374-381.

Tian, H., Bai, X., and Xu, J. (2018). Extraction of bisphenol A in honey samples using aqueous biphasic systems coupled with high-performance liquid chromatography. *Separation Science Plus*, 1(5), 374-381

Tu, X., Du, C., He, Y., Yang, J., Chen, J., Jin, Q., ... & Chen, W. (2024). Determination of bisphenols in beeswax based on sugaring out-assisted liquid-liquid extraction: Method development and application in survey, recycling and degradation studies. *Chemosphere*, 351, 141274.

Tuzen, M., ve Soylak, M. (2005). Trace heavy metal levels in microwave digested honey samples from Middle Anatolia, Turkey. *AiritilibRARY*, 13, 343-347.

Usman, A., and Ahmad, M. (2016). From BPA to its analogues: is it a safe journey?. *Chemosphere*, 158, 131-142.

Uthurry, C. A., Hevia, D., and Gomez-Cordoves, C. (2011). Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 3(4), 141-159.

Vilarinho, F., Sendón, R., Van der Kellen, A., Vaz, M. F., & Silva, A. S. (2019). Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. *Trends in food science & technology*, 91, 33-65.

Vorlova, L., and Pridal, A. (2002). Invertase and diastase activity in honeys of Czech provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Sbornik Mendelovy Zemedelske a Lesnicke Mendelianae Brunensis*, 5(8), 57-66.

Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A., & Knudsen, K. E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 1(7), 515-524.

White Jr, J. W. (1980). Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63(1), 11-18.

Wilson, S. R., Olsen, C., and Lundanes, E. (2019). Nano liquid chromatography columns. *Analyst*, 144(24), 7090-7104.

Yi, L., Piehowski, P. D., Shi, T., Smith, R. D., and Qian, W. J. (2017). Advances in microscale separations towards nanoproteomics applications. *Journal of Chromatography A*, 1523, 40-48.

Zajickova, Z. (2017). Advances in the development and applications of organic–silica hybrid monoliths. *Journal of separation science*, 40(1), 25-48.

Zhao, C., Yong, T., Zhang, Y., Xiao, Y., Jin, Y., Zheng, C., ... & Cai, Z. (2021). Breast cancer proliferation and deterioration-associated metabolic heterogeneity changes induced by exposure of bisphenol S, a widespread replacement of bisphenol A. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125391.

Zoeller, R. T., Bansal, R., & Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, 146(2), 607-612.

