

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKRİLAMİD VE BİYOJENİK AMİNLER İÇİN
GIDA ÖRNEKLERİNE YÖNELİK KAPİLER ELEKTROFORETİK
ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Selda BAŞKAN KAHRAMAN

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

EYLÜL 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKRİLAMİD VE BİYOJENİK AMİNLER İÇİN
GIDA ÖRNEKLERİNE YÖNELİK KAPİLER ELEKTROFORETİK
ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Selda BAŞKAN KAHRAMAN
(509052208)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia Erim BERKER

EYLÜL 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509052208 numaralı Doktora Öğrencisi **Selda BAŞKAN KAHRAMAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**AKRİLAMİD VE BİYOJENİK AMİNLER İÇİN GIDA ÖRNEKLERİNE YÖNELİK KAPİLER ELEKTROFORETİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. F. Bedia Erim BERKER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Güleren DÖNER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **18 Mayıs 2012**
Savunma Tarihi : **28 Eylül 2012**

Aileme,

ÖNSÖZ

Doktora öğrenim hayatım süresince bana değerli görüşleriyle yol gösteren ve akademik çalışma disiplini kazandıran, meslek hayatımdaki en büyük şansım sevgili hocam Prof. Dr. Bedia Erim BERKER'e her zaman destek olduğu için ne kadar teşekkür etsem azdır. Benim için Prof. Dr. Bedia Erim BERKER gerek bir bilim insanı olarak, gerek bir hoca olarak örnek alınacak ender insanlardandır ve O'nun öğrencisi olmaksa bir ayrıcalıktır. 2003 yazından beri bana bu ayrıcalığı yaşattığı için Hocama minnettarım. Sonsuz teşekkürler...

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta Araş. Gör. Filiz Tezcan TEKELİ olmak üzere Analitik Kimya Anabilim dalındaki tüm arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma,

Her zaman yanımda olan, bana manevi destek ve moral veren, annem Sema BAŞKAN başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışmasının bir kısmı, TÜBİTAK 108T873 nolu proje kapsamından ve İTÜ-BAP lisansüstü tezlerini destekleme programından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve İTÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Mayıs 2012

Selda BAŞKAN KAHRAMAN
(Yüksek Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. AKRİLAMİD.....	5
2.1 Akrilamid Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.2 Sağlık Üzerine Etkileri.....	5
2.3 Akrilamid Oluşum Mekanizması.....	7
2.4 Gıdalarda Akrilamid.....	9
3. BİYOJENİK AMİNLER.....	11
3.1 Biyogenik Aminlerin Genel Özellikleri.....	11
3.2 Sağlık Üzerine Etkileri.....	12
3.3 Gıdalarda Biyogenik Aminler.....	13
4. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....	15
4.1 Kapiler Elektroforezin Prensipleri.....	15
4.2 Elektroforetik Göç.....	16
4.3 Elektroosmotik Akış.....	17
4.3.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler.....	18
4.4 Band Genişlemesi.....	18
4.5 Kapiler Elektroforez Cihazının Bölümleri.....	20
4.5.1 Voltaj kaynağı.....	20
4.5.2 Kapiler.....	20
4.5.3 Enjeksiyon.....	21
4.5.3.1 Hidrodinamik enjeksiyon.....	21
4.5.3.2 Elektrokinetik enjeksiyon.....	21
4.5.4 Dedektör.....	21
5. AKRİLAMİD ANALİZİ DENEYSEL KISIM.....	23
5.1 Malzeme ve Yöntemler.....	23
5.1.1 Malzemeler.....	23
5.1.2 Cihazlar ve çalışma koşulları.....	23
5.1.3 Standard çözeltilerin hazırlanması.....	24
5.1.4 Gıda ekstraktlarının hazırlanması.....	24
5.2 Metod Optimizasyonu.....	25
5.2.1 Tampon konsantrasyonun seçilmesi.....	27
5.3 Metod Validasyonu.....	29
5.3.1 Kalibrasyon doğrusu.....	29
5.3.2 Tekrarlanırlık.....	30

5.3.3 LOD ve LOQ değerleri	30
6. ANALİZ YÖNTEMİNİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI.....	31
6.1 Gıda Örneklerinin Analizi	31
6.1.1 Gıda örneklerine CE yönteminin uygulanması	31
6.1.2 Kızartma süresinin akrilamid miktarına etkisinin gözlenmesi	33
6.2 Gerçek Örneklerdeki Rezolüsyon ve Pik Simetrileri.....	33
6.3 Metodun Doğruluğu.....	34
6.4 Sonuçlar.....	34
7. BİYOJENİK AMİN DENEYSEL KISIM	37
7.1 Malzemeler ve Yöntemler	37
7.1.1 Malzemeler	37
7.1.2 Salamura balık örneklerinin hazırlanması.....	37
7.1.3 Balık örneklerinin ekstraksiyonu	38
7.1.4 Standartların türevlendirilmesi	38
7.1.5 Örneklerin türevlendirilmesi	38
7.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları	39
8. BİYOJENİK AMİN ANALİZİ SONUÇLARI	41
8.1 Metod Optimizasyonu	41
8.2 Metod Validasyonu	43
8.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması.....	44
8.1.1 Metodun doğruluğu.....	46
8.4 Sonuçlar.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	57

KISALTMALAR

AA	: Akrilamid
GC	: Gaz Kromatografisi
MS	: Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
CE	: Kapiler Elektroforezi
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografisi
MEEKC	: Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografisi
LOD	: Belirleme Sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
EOF	: Elektroosmotik Akış
CZE	: Kapiler Zon Elektroforezi
NACE	: Susuz Ortam Kapiler Elektroforezi
CMC	: Kritik Misel Konsantrasyonu
CTAB	: Setiltriemonyumbromür
LIF	: Lazer İndüklenmiş Floresans
FITC	: Floresein Isotiyosiyanat
ACN	: Asetonitril
SDS	: Dodesilsülfat sodyum tuzu

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Farklı gıdalardaki akrilamid değerleri.	10
Çizelge 3.1 : Biyogenik aminler ve kimyasal özellikleri.	12
Çizelge 4.1 : EOF'e etki eden faktörler.....	18
Çizelge 4.2 : Band genişlemesine neden olan diğer etkenler	19
Çizelge 4.3 : CE'de kullanılan dedeksiyon yöntemleri	22
Çizelge 5.1 : HClO ₄ konsantrasyonlarına karşı pik ve akım değerleri	28
Çizelge 5.2 : Tekrarlanırlık sonuçları.....	30
Çizelge 6.1 : Akrilamidin geri kazanım değerleri.....	34
Çizelge 8.1 : Yöntem validasyon toplu sonuçları	44
Çizelge 8.2 : Balık örneklerindeki biyogenik amin miktarları	45
Çizelge 8.3 : Geri kazanım sonuçları	46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Akrilamidin Molekül Yapısı	5
Şekil 2.2 : Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşum Mekanizması	7
Şekil 2.3 : Akrilamid için Alternatif Oluşum Yolları	8
Şekil 4.1 : EOF'in şematik gösterimi	17
Şekil 4.2 : CE'in şematik gösterimi	20
Şekil 5.1 : Protonlanmış benзамидin pH'a karşı teorik iyonlaşma yüzdesi	26
Şekil 5.2 : Akrilamidin üç farklı HClO ₄ konsantrasyonunda, ACN'de DMF ve benзамид ile birlikte elektroferogramları	27
Şekil 5.3 : Perklorik asit konsantrasyonunun elektroforetik ve elektroosmotik mobilitateye etkisi	29
Şekil 6.1 : Patates cipsi elektroferogramları	31
Şekil 6.2 : Patates kızartması elektroferogramları	33
Şekil 7.1 : FITC ile aminlerin reaksiyonu	38
Şekil 8.1 : Biyojenik aminlerin elektroferogramları	41
Şekil 8.2 : Tampondaki Brij 35 konsantrasyonuna karşı biyojenik aminlerin göç zamanı grafiği	43
Şekil 8.3 : Lakerda ekstrakt elektroferogramları	44
Şekil 8.4 : Sardalya ekstrakt elektroferogramları	45

AKRİLAMİD VE BİYOJENİK AMİNLER İÇİN GIDA ÖRNEKLERİNE YÖNELİK KAPİLER ELEKTROFORETİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Gıda ürünlerinin hazırlanış basamaklarında gıda ürünleri içinde doğal olarak bulunan bazı bileşenler yeni kimyasallara dönüşebilmektedir. Gıda son ürününün hazırlanması sırasında oluşan bu yeni bileşiklerin bir kısmı toksik, alerjen ve/veya kanserojen özellikler gösterebilmektedir. Son yıllarda insan sağlığını olumsuz yönde etkileyecek gıda bileşenlerinin analizleri için yeni ve etkin analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmada gıdanın kendi içinde doğal olarak bulunan bileşenlerin gıda işleme esnasında kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşturdukları toksik gıda bileşenlerinin analizleri için yeni kapiler elektroforetik analiz yöntemleri geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Akrilamid uzun yıllardan beri çoğunlukla poliakrilamid polimeri eldesi için ticari olarak üretilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler sonucunda akrilamidin memeliler için genetik toksik ve mutajenik olduğu kanıtlanmıştır. Akrilamid Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) tarafından “İnsanlar için olası kanserojen madde” olarak sınıflandırmıştır.

Akrilamid’in ilk kez 2002 yılında ısıtıl işlem gören gıda ürünlerinde olduğu keşfedilmiştir. Bu tarihten bu yana uluslararası gıda kuruluşları her yıl marketteki gıda ürünlerinin akrilamid içeriklerini web sitelerinde yayınlamaktadır. Özellikle patates kızartması ve bisküvi, kek ve ekmek gibi çocukların çok tükettiği ürünlerde akrilamid oluşumu konuyu güncel ve önemli kılmaktadır.

Biyojenik aminler özellikle proteince zengin gıdalarda ilgili aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu oluşan bileşiklerdir. İnsan ve hayvanların biyolojik fonksiyonlarında önemli rollere sahip olmalarına rağmen, yüksek dozlarda alımı insanlar üzerinde alerjen ve toksik özellikler göstermektedir. Bu gruptan histamin alerjik etkisi en çok araştırılan biyojenik amindir. Putresin ve kadaverin gibi biyojenik aminler ortamda bulunan nitrat iyonları ile reaksiyon vererek kanserojen nitrosaminlere dönüşebilmektedir.

Kapiler elektroforez (CE) analiz yöntemleri ile en küçük anorganik iyonlardan, DNA gibi en büyük büyük moleküllere kadar geniş spektrumdaki bileşiklerin yüksek elektrik alan altında ayrılması ve tayini mümkündür. CE yüksek ayırma gücü nedeniyle özellikle karmaşık yapıdaki matriksler için uygun bir yöntemdir. Son yıllarda gıda analizlerinde kapiler elektroforetik yöntemlere olan ilgi giderek artmaktadır. Bu amaçla hızlı, uygulanması kolay ve düşük tayin sınırlarında yeni kapiler elektroforez yöntemleri geliştirilmektedir.

Bu tez çalışmasının ilk adımında akrilamidin, bir gıda matriksi içinden yüksek elektrik alan altında ayrılarak aynı anda nicel ve nitel tayini için yeni bir susuz ortam kapiler elektroforez (NACE) yöntemi geliştirilmiştir. Analiz yöntemi, sulu ortamda

yüksüz olan akrilamid molekülünün, organik çözücü içerisinde asit-baz karakterinin değişmesine ve pozitif yükle yüklenmesine dayanmaktadır. Yüklü akrilamid molekülü, yüksek elektrik alan altında yürütülerek gıda matriksinin diğer bileşenlerinden ayrılarak UV detektör ile 200 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Akrilamid piki 3,5 dakika gibi kısa bir sürede görülmüştür. Yöntemin akrilamid için belirleme sınırı 0,041 µg/mL ve tayin sınır 0,137 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem kızarmış patates ve patates cipsi örneklerinde akrilamid tayinine başarı ile uygulanmıştır.

Çalışmanın ikinci basamağında, biyojenik aminlerin nicel ve nitel tayini için lazer indüklenmiş floresans dedektörle birleştirilmiş, yeni bir yüksüz misel elektrokinetik kromatografik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Floresan bir boya ile türevlendirilen altı biyojenik aminin aynı anda ayrılması ve tayini 10 dakikadan kısa sürede gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yüzey aktif madde (Brij 35), türevlendirilmiş biyojenik amin moleküllerinin floresans duyarlılığını arttırmış ve bu şekilde literatürde rapor edilen tayin sınırlarının altına inilmiştir. Yöntemin belirleme sınırı 0,067- 0,11 ng/mL arasında, tayin sınırı 0,22-0,37 ng/mL arasında tespit edilmiştir. Yöntem salamura ve tuzlu balık örneklerinde biyojenik aminlerin tayinine başarı ile uygulanmıştır.

DEVELOPMENT OF CAPILLARY ELECTROPHORETIC ANALYSIS METHODS FOR ACRYLAMIDE AND BIOGENIC AMINES IN FOOD SAMPLES

SUMMARY

During food production steps, some components which naturally exist in food products may form new chemicals. These new chemicals formed during food preparation may be toxic, allergen and/or carcinogenic. In recent years, development of new and effective analysis methods have become crucial for analysis of food components which affect human health negatively. In this study, it is aimed to develop new capillary electrophoretic methods for the analysis of toxic food ingredients which are formed during food processes as a result of chemical reactions of naturally existing food components.

Acrylamide has been produced commercially for many years mainly for the production of polyacrylamide polymer. Experiments on animals have proven that acrylamide is possibly a genetic toxic, mutagenic and carcinogenic for mammals. Acrylamide has been classified as “probable carcinogen compound for humans” by the International Agency for Research on Cancer (IARC).

Acrylamide was first detected in heat-treated foods in 2002. It is supposed that acrylamide in food is largely derived from heat-induced reactions between the amino group of the free amino acid asparagine and the carbonyl group of reducing sugars such as glucose during baking and frying, by the so-called Maillard reaction, though the production mechanism of acrylamide in food has not been exactly explained. Since that date, international food organizations have been publishing annual acrylamide contents of food products sold in markets on their web sites. Intensive activity began examining the many different types of food and thousands of analyses have been undertaken worldwide. Formation of acrylamide in products like fried potato and biscuit, cake and bread which are consumed by children, makes the issue important and actual.

Biogenic amines are compounds formed especially in protein-rich foods, such as fish and meat, by the decarboxylation of the related amino acids. Although they have important roles in biological functions of humans and animals, high doses cause allergenic and toxic effects on humans. Histamine, belonging to this group, is the biogenic amine of which allergenic effect has been researched mostly. Moreover, putrescine and cadaverine have been suggested to potentiate histamine toxicity. Biogenic amines like putrescine and cadaverine may transform to carcinogen nitrosamines by reacting with nitrate ions in the medium. High amounts of biogenic amines in foods are considered indicators of spoilage. For this reason, it has great importance of quantify the individual biogenic amines in food samples by reliable separation and detection methods.

Separation and determination of a wide spectrum of components from smallest inorganic ions to biggest molecules like DNA is possible under high electrical field with capillary electrophoresis (CE) methods. CE is a suitable method, especially for complex matrices; due to its high separation power. Capillary electrophoresis method has been increasingly popular for food analysis in recent years.

In the first step of this thesis study, a new nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) method was developed for simultaneous qualitative and quantitative determination of acrylamide. The analysis method is based on the fact that, acrylamide molecule which is a non-ionic molecule in aqueous medium, changes its acid-base character in an organic solvent and can be positively charged by low concentrations of a strong acid. Ionic acrylamide molecule was separated from other constituents of food matrix under high electrical field and determined at 200 nm wavelength with UV detector. The electrophoretic behavior of acrylamide together with N, N-dimethylformamide and benzamide was tested in three different HClO_4 concentrations, i.e., 10, 20, and 30 mmol/l, respectively. The running electrolyte was chosen as 30 mmol/l HClO_4 and 218 mmol/L CH_3COOH in acetonitrile for nonaqueous separation. The separation was performed at 25 kV. The temperature was set at 25° C. Injections were made at 40 mbar for 6 s. The total length of the capillary was 52.5 cm and the length to the detector was 44 cm. The detection limit of the method for acrylamide was found as 0.041 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantification was found as 0.137 $\mu\text{g/mL}$. The run-to-run and day-to-day precisions with respect to the corrected peak areas were found as 1.65% and 3.90% respectively. The method was successfully applied to acrylamide determination in fried potato and potato chips samples. Potato chips and French fries were ground in a blender and 2 g portions from fried samples and 4 g portions from the chips were weighed into a 50 mL centrifuge tube and 10 mL of ACN was added. These samples were shaken for 1 hour, and then 5 mL hexane was added, defatting was done three times. After the suspension was centrifuged at 4000 rpm for 2 min, it was filtered from 0.2 mm micro filter and directly injected. The acrylamide content in the tested french fried sample was determined as 0.187 ± 0.019 mg/kg for three independent extractions of the same sample. The acrylamide amount of tested chip sample was found as 2.95 ± 0.11 mg/kg for three separate extractions. The recovery values of the spiked samples at different concentrations are found between 90 and 102%. Acrylamide contents in food samples investigated in this study are in agreement with the reported values. Published values for potato chips vary between 0.17– 3.7 mg/kg and for French fries vary between 0.2–12 mg/kg. The presence of acrylamide in foods is by now certain. However, it is seen that its quantity is very different in even similar food samples. It is suggested from our present study that the CE method presented here is a method that can be easily used by many laboratories especially for the rapid and economical comparison of different food processing.

In the second step of the study, a new nonionic micellar electrokinetic chromatographic method combined with laser-induced fluorescence detector was developed for the analysis of biogenic amines. Because of the fact that biogenic amines show poor sensitivity of UV absorption detection, the combination of LIF detector with capillary electrophoretic separations provided a remarkable improvement in detection limits. The separation and determination of six biogenic amines derivatized with a fluorescent dye was achieved in less than 10 minutes. We used FITC as derivative agent which is a common dye used in the CE-LIF analysis of biogenic amines. The running electrolyte was chosen 10 mM Brij 35 in 75mM borate buffer at

pH 9.7. As a result of preliminary optimization studies, fivefold molar excess of total biogenic amine concentration was found sufficient for FITC I isomer concentration. In order to derivatization step the mixture vial was capped and stand in the dark at 40 °C for 4 h.

This temperature and time were selected optimal by monitoring the conditions at which the peak areas reached the maximum. This solution was diluted 1000-fold in two steps with distilled water and injected into the capillary column. Brij 35, as a nonionic surfactant, was the first time tested for the separation of biogenic amines. Complete resolution of six biogenic amines – FITC derivatives – was achieved in less than 10 min, employing 10mM Brij 35 in 75mM borate buffer and at pH 9.7 as the running electrolyte. Relative fluorescence intensities of biogenic amines enhanced considerably and separation time decreased considerably when Brij 35 was substituted for SDS in the same buffer. The used non-ionic surfactant, Brij 35, increased fluorescence intensity of derivatized biogenic amine molecules and by this way it has been achieved to low detection limits for biogenic amines compared to those reported in literature.. The separation was performed at 25 kV. The temperature was set at 25°C. Injections were made at 50 mbar for 6 s. The total length of the capillary was 63 cm and the length to the detector was 47 cm.

For the precision of the method, the biogenic amine mixture was injected five times in 1 day. For the day-to-day reproducibility, the same solution was injected five times in three different non-consecutive days. In the same day, precisions of the corrected peak areas (%RSD) were between 1.98 and 3.24. Between days, precision values were lower than 5.6. Detection limits of the method for six biogenic amines were determined between 0.067 and 0.11 ng/mL.; the limits of quantification were determined between 0.22 and 0.37 ng/mL. The method has been applied successfully to the determination of biogenic amines in brined and dry-salted fish samples. Two traditionally processed fish products, brined Atlantic bonito (*Sarda sarda*) and dry-salted sardine (*Sardina pilchardus*), were obtained from a local fish processing company in Trabzon, Turkey. Fish samples were homogenized in a hand blender. Five gram of the blended fish samples was extracted twice with 10 mL portions of 6% TCA using a vortex mixer for 2 min. The supernatants were combined after centrifugation (3500 rpm) for 10 min and filtered through a Whatman 41 filter paper and then through a 0.45-mm membrane filter. The pH of solution was arranged to pH 7 with NaOH solution and diluted to 25 mL with deionized water. Since amino acids in the fish content also react with FITC, the optimal concentration of FITC in the initial derivatization mixture was selected by gradually increasing FITC concentration, monitoring the increases in peak heights of biogenic amines in the samples, and observing the excess FITC peak in electropherograms to ensure complete derivatization. The derivatized sample solutions were kept in the dark at 40°C for 4 h, this solution was diluted with distilled water between 20- and 1000-fold for experiments and injected into the capillary column. The Lakerda sample includes a considerable amount of tyramine, histamine, and putrescine. In the sardine sample, cadaverine and histamine are the main amines and small amount of tyramine was also detected.

The biogenic amine type and amount are depended on the type of fish as well as processing conditions. It is suggested from our present study that the MEKC-LIF method presented here is a method that can be easily used by many laboratories especially for the rapid and economical comparison of different food processing. The

high sensitivity of the method leads to the analysis of biogenic amines in low concentrations.

1. GİRİŞ

2002 yılında, İsveç Ulusal Gıda Yönetimi ve Stockholm Üniversitesi yaptıkları çalışmalarla, yüksek derecelerde ısıtıl işlem görmüş gıdalarda akrilamid (AA) tespit ettiklerini bildirmişlerdir [1-3]. AA'nın fırınlama ve kızartma işlemleri süresince gıda içeriğinde bulunan bir amino asit olan asparajinin amino grubu ile yine gıda içeriğindeki indirgen şekerlerin karbonil grubunun arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu ile türediği varsayılmaktadır [4,5]. AA'e uzun süre maruz kalındığında hayvan ve insanların sinir sistemlerine zarar verdiği, bunun yanı sıra memeliler için olası genetik toksik, mutajenik ve kanserojenik olduğu saptanmıştır [6]. Tüm bu çalışmaların sonucunda Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) AA'i olası kanserojen madde olarak sınıflandırmıştır [7].

2002 senesinden bu yana gıdalarda akrilamid analizi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalar derleme makalelerde toplanmıştır [6,8]. AA analizlerinin büyük bir kısmı MS (kütle spektrometresi) ile kombine GC (gaz kromatografisi) veya HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) gibi kromatografik yöntemlere dayanmaktadır. Gıda denetim laboratuvarlarında AA analizi genellikle brom türevlendirmesiyle GC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. GC-MS çok hassas bir yöntem olmasına karşın türevlendirme aşaması zahmetli ve zaman alıcı olmaktadır [9]. Az sayıda, türevlendirme yapılmaksızın doğrudan GC-MS tayini de rapor edilmiştir [10,11]. Son yıllarda AA'nın doğrudan tayini için, ön türevlendirme gerekmeyen LC-MS/MS yöntemine ilgi artmıştır. Fakat bu yöntemde, düşük molekül ağırlıklı AA'nın MS öncesi etkili ve dikkatli bir saflaştırma aşaması gereklidir.

Kapiler elektroforez (CE) analitlerin yüksek elektrik alan altında yük/ büyüklük oranlarına göre göç etmesine dayanan hızlı ve yüksek ayırma gücüne sahip güçlü bir ayırma ve analiz yöntemidir. Yüksüz bir bileşik olan AA, sulu bir elektrolit ortamında elektroforetik mobilite kazanamadığı için, yüklü türlerin ayırımında kullanılan kapiler zon elektroforez (CZE) yöntemi AA tayinine uygun değildir. Molekül küçük ve polar bir molekül olduğundan yüksüz türlerin ayrılmasında

kullanılan misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) yönteminde misel agregatları ile bir ilgi kuramayacağı için yeterli elektroforetik mobilite kazanamaz. Bu sebepten AA analizi için farklı CE yöntemleri çalışılmıştır. Gıdalarda AA tayini için mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi (MEEKC) yöntemi, 2004 yılında yayınlanmıştır [12]. AA'nın sulu tampon ile hidrofobik damlalar arasındaki dağılımını temel alan bu yöntemde belirleme sınırı UV dedeksiyon ile 0,7 mg/L olarak saptanmıştır. Bu sınır yüksek olduğundan, gıda örneklerinin ekstraktlarının enjeksiyon öncesi konsantre edilmesi gerekmiştir. Aynı çalışma grubu 2006 yılında, 2-merkaptobenzoik asit ile kolon öncesi türevlendirme ile AA'e yük kazandırarak CZE'de ayırımını sağlamış ve belirleme sınırını (LOD), 0,07 mg/L'e düşürmüşlerdir [13]. Daha sonra, aynı yöntemde ön derişiklendirme basamağı ekleyerek, AA belirleme sınırını 0,007 ve 0,001 mg/L a düşürmüşlerdir[14]. Bu çalışmada LOD değeri düşük olmakla beraber, türevlendirme aşaması 3 saat karanlıkta ve nitrojen gazı altında gerçekleştirildiği için zahmetlidir. 2007 yılında yapılan farklı bir çalışmada AA'nın doğrudan tayini için gıda analizlerine yönelik yeni bir MEKC yöntemi geliştirilmiştir [15]. Bu yöntemde elektroosmotik akış (EOF) piki ile AA piki rezolüsyonu AA'nın polar bir bileşik olmasından dolayı oldukça düşük olmuştur.

AA' e yük kazandırmak için bu çalışmada önerilen başka bir seçenek susuz bir çözücü kullanarak bu analitin asit-baz karakterini değiştirmektir. Susuz çözücü ortamında analitlerin ve elektrolitlerin asit-baz karakteri değişmektedir [16]. Susuz ortam kapiler elektroforez çalışmalarına olan ilgi son 10 yılda giderek artmıştır [17]. CE'de organik çözücü kullanımının avantajları ve dezavantajları temel esaslarıyla beraber derleme makalelerde tartışılmıştır [18,19]. 2006 yılında yapılan bir çalışmada asetronitril (ACN) ortamında aşırı zayıf bazık yapıdaki bileşiklerin CZE ile ayırımı gerçekleştirilmiştir [20].

Bu tez çalışmasının ilk adımında akrilamid için ilk kez yeni bir susuz ortam kapiler elektroforez (NACE-nonaqueous capillary electrophoresis), yöntemi geliştirilmiştir. Susuz ortam kullanılarak akrilamidin sudaki asit baz özellikleri değiştirilmiş ve suda yüksüz olan bu moleküle susuz ortamda yük kazandırılmıştır. Analiz yönteminin validasyonu yapılmış ve yöntem ev yapımı patates kızartması ve patates cipsi içindeki akrilamidin miktar tayinine başarı ile uygulanmıştır.

Biyojenik aminler, ilgili amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşan alifatik, aromatik ve heterosiklik yapıdaki düşük moleköl ağırlıklı bazık bileşiklerdir.

Biyojenik aminler özellikle proteince zengin gıdalarda, şarap ve bira gibi içeceklerde, fermente ürünlerde, çikolata ve fındık gibi bir çok yiyecekte oluşmaktadır [21]. Biyojenik aminlerin gıdalarda oluşumu organizmaya özgü enzimlerle olabildiği gibi mikrobiyal olarak da gerçekleşmektedir. Protein ve hormon sentezinin ilk basamağını oluşturmak gibi önemli biyolojik görevleri olmasına rağmen, biyojenik aminler özellikle proteince zengin et, balık gibi gıdalarda yüksek miktarlarda bulunduklarında bozulma göstergesi olarak kabul görmektedir [22,23]. Gıdalarla fazla miktarlarda alındıklarında ciddi baş ağrıları, çok düşük ya da yüksek tansiyon ve alerjik reaksiyon gibi toksik etkiler gösterebilirler [24].

Çeşitli gıdalardaki biyojenik aminlerin kapiler elektroforez yöntemiyle analizi üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar bazı derleme makalelerde toplanmıştır [25-27]. Biyojenik aminlerin tayininde, sahip oldukları düşük hidrofilitik özellikler, benzer asitlik sabitleri ve ayrıca kapiler duvarına adsorbe olma eğilimlerinden dolayı kapiler zon elektroforez yöntemi yerine genellikle MEKC yöntemi tercih edilmektedir. MEKC analitlerin, kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üstünde tampona katılan SDS (sodyumdodesilsülfat), CTAB (setiltriemonyumbromür) gibi yüzey aktif maddelerin oluşturduğu yalancı sabit faz ile elektrolit çözeltisi arasında paylaşımına dayanan ve genelde nötral veya suda güç çözünen bileşiklerin ayırımında kullanılan bir kapiler elektroforetik yöntemdir [25].

Son yıllarda yapılan çalışmalarla düşük UV absorplama kapasitesine sahip biyojenik aminlerin, laser indüklenmiş floresans (LIF) dedektörü ile tayin sınırları iyileştirilmiştir [25]. Biyojenik aminlerin CE-LIF ile tayinlerinde bir çok türevlendirici floresan boyar madde denenmiştir [28-31].

Literatürde, bugüne kadar MEKC yöntemi ile biyojenik amin tayinlerinde yüklü yüzey aktif maddeler kullanılmıştır. Öte yandan, bazı amino asitlerin MEKC-LIF yöntemi ile ayrılmasında, yüksüz yüzey aktif madde kullanımının pikler arasındaki rezolüsyonda iyileşme ve floresans şiddetinde artışa sebep olduğu literatürde gösterilmiştir [32-37].

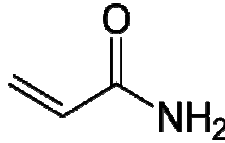
Bu tez çalışmasının ikinci adımında, biyojenik aminlerin ayırımı ve miktar tayini için ilk kez ayırma ortamı olarak Brij 35 yüksüz yüzey aktif maddesi kullanılarak yeni bir MEKC-LIF yöntemi geliştirilmiş ve floresein isotiyosiyanat (FITC) floresan boyası ile türevlendirilen altı adet biyojenik aminin aynı anda ayırımı ve tayini

gerçekleştirilmiştir. Yöntem kuru tuzlanmış ve salamura balık örnekleri içinde biyojenik amin tayinlerine başarı ile uygulanmıştır.

2. AKRİLAMİD

2.1 Akrilamid Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Akrilamid (2-propenamid) renksiz, erime noktası 84,5°C ve kaynama noktası 125°C (760 mmHg) olan beyaz renkli, kokusuz bir kristaldir. Buhar basıncı 25°C’de 0,007 mmHg’dır. Molekül ağırlığı 71,08 g/mol olan bu bileşik suda, asetonda, kloroform ve etanolde çözünebilmektedir; sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir (2155 g/L’dir). Akrilamid, başta poliakrilamid sentezi olmak üzere ticari amaçla üretilen ve kullanılan monomer yapıda bir bileşiktir. Poliakrilamid içme sularının temizlenmesinde, endüstriyel atık suların arıtılmasında, plastik üretiminde, jel elektroforezinde, kâğıt üretiminde, boya sanayinde, kozmetik ve madencilik gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Akrilamidin kimyası, biyokimyası, analiz metodları, farmakolojisi ve toksikolojisi bir derleme makalede toplanmıştır [38].



Şekil 2.1: Akrilamidin Molekül Yapısı.

2.2 Sağlık Üzerine Etkileri

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, AA buharının gözlerde, deride tahriş yarattığı ve serebrospinal sistemde felce sebep olduğu ayrıca hayvanlar için kansorejenik özellikler taşıdığı kanıtlanmıştır [39]. AA, hayvan ve insanlarda sindirimden sonra kolayca adsorbe olarak tüm vücuda dağılır ve özellikle karaciğer, kalp, beyin ve böbreklerde rastlanır. Ayrıca insan plasentasına, anne sütüne ve fetüse de geçtiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [40]. Deney hayvanlarının gıda yolu ile belirli dozlarda akrilamide maruz kalmaları sonucu akciğer, meme bezi, ağız boşluğu, üreme oranları ve bağırsaklarda kanser oluşma riskinin arttığı desteklenmiştir [41].

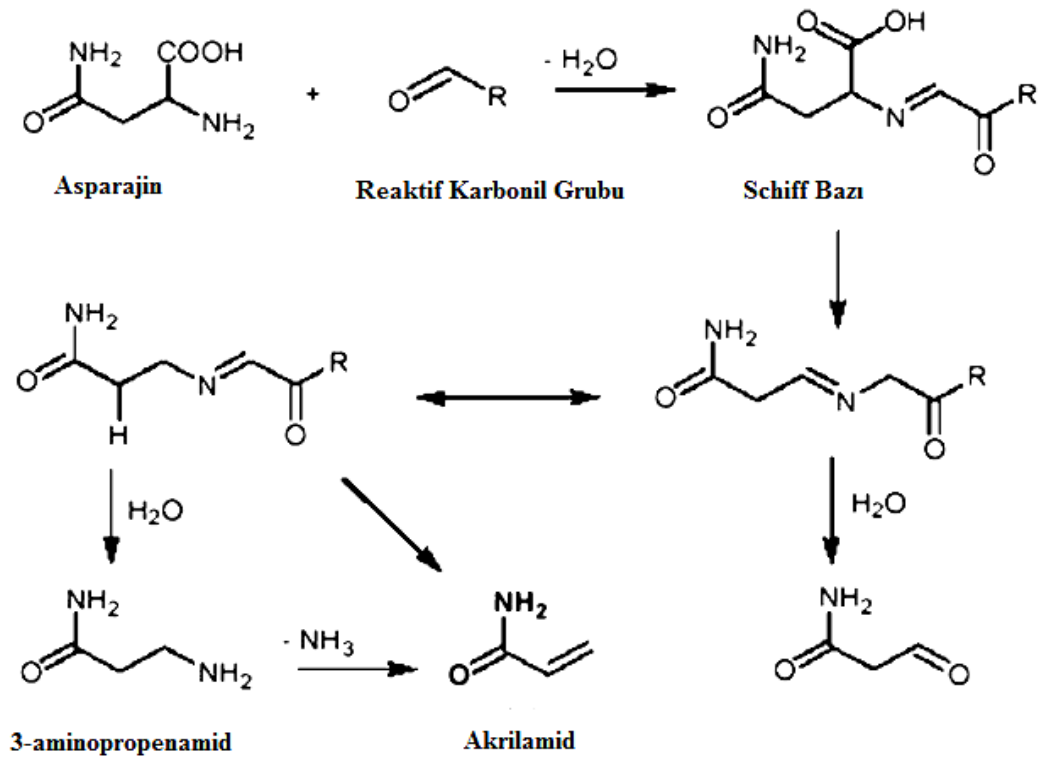
1994 yılında Uluslararası Kansere Araştırma Kurumu (IARC) AA'ı “ İnsanlar için olası kanserojen madde” olarak sınıflandırmıştır. 1997 yılında İsveç’ de bir tünellerin inşası sırasında oluşan su sızıntısı ile birçok balık ve büyükbaş hayvan ölü bulunmuş ve tünellerin duvarlarının monomerik akrilamid ve N-metilolakrilamid içerdiği anlaşılmıştır. Tüneller işçilerinde gelişen periferik sinir bulguları sonucu işçilerin kanlarında AA'nin hemoglobine bağlanarak oluşturduğu metabolite rastlanmıştır [42]. 2000 yılında kızarmış besinlerle beslenen farelerle yapılan deneylerde AA'in kanda hemoglobin bağlayıcı rolünün olduğu ve AA'in metaboliti olarak oluşan gilisidamidin DNA ile reaksiyona girdiği kanıtlanmıştır. Gilisidamidin, yapılan canlı dışı ve in-vivo çalışmalarla memeliler için mutajenik ve genotoksik bir bileşik olduğu kabul edilmektedir [40]. AA'e maruz kalmayan faklı bir denetim grubundaki insanların kanında da gilisidamide rastlanması ile AA'in beslenme yoluyla da alınabileceği şüphesi uyanmıştır [2]. 2001 yılında Toksikite, Ekotoksikite ve Çevre Bilimsel Komitesi AA'in toksik özelliklerinden (nörotoksikite, genotoksikite, kanserojenlik) dolayı insan sağlığı üzerine oluşturduğu tehlikelere dikkat çekmiştir [43]. AA'e mesleki olarak deri emilimi ve solunum yoluyla maruz kalanlarda nörotoksik etkiler görülmektedir. Nörotoksik etki, kas koordinasyon bozukluğu ve iskelet kasları zayıflığı olarak kendini göstermektedir. Fare ve sıçanlar üzerinde yapılan deneyler sonucunda nörotoksik etkinin ancak günde 0,2 -10 mg/kg ve üzeri değerlerde gözlemlendiği açıklanmıştır [44].

2002 yılında, İsveçli Bilim adamları yaptıkları çalışmalarla, yüksek ısı işlem görmüş nişastaca zengin patates, tahıl gibi gıdalarda ve kahvede akrilamid tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Norveç, İsveçre, İngiltere ve Amerika'da yapılan çalışmalarla desteklenen sonuçlar, gıdalarda AA oluşumu ve analizi üzerine ilginin artmasına sebep olmuştur [1,2].

Yapılan çalışmalarda ortalama bir tüketici için alınan AA miktarı 1µg/kg-vücut ağırlığı/gün iken AA içerikli gıdaları fazla tüketenler için bu değer 4µg/kg-vücut ağırlığı/gün'e ulaşabilmektedir [45]. Tüketilen akrilamid miktarının hergün 1µg akrilamid /kg vücut ağırlığı başına olması durumunda yaşam boyu kanser riskinin 1000'de 0,7–4,5 arasında olduğu kabul edilmektedir [41].

2.3 Akrilamid Oluşum Mekanizması

Gıdaların işlenmeleri ve saklanması sırasında 90-200°C arasında pişirme, fırınlama, kızartma, kavurma, sterilizasyon gibi işlemlere başvurulmaktadır. Uygulanan yüksek sıcaklıklar gıdalarda kanserojenik ve/veya mutajenik bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Bu bileşiklerden en önemlileri ve en yaygın bilinenleri; heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-alkil-N-nitrosamin bileşikleri ve akrilamiddir [46]. AA oluşum mekanizmasını aydınlatmak üzere birçok çalışma yapılmıştır. AA'ın, ağırlıklı olarak asparajinin amino grubu ile indirgen şekerlerin (glukoz, fruktoz ve maltoz) karbonil grubundan türeyen bileşiklerle gerçekleşen Maillard reaksiyonu sonucu oluştuğu varsayılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşum Mekanizması [42].

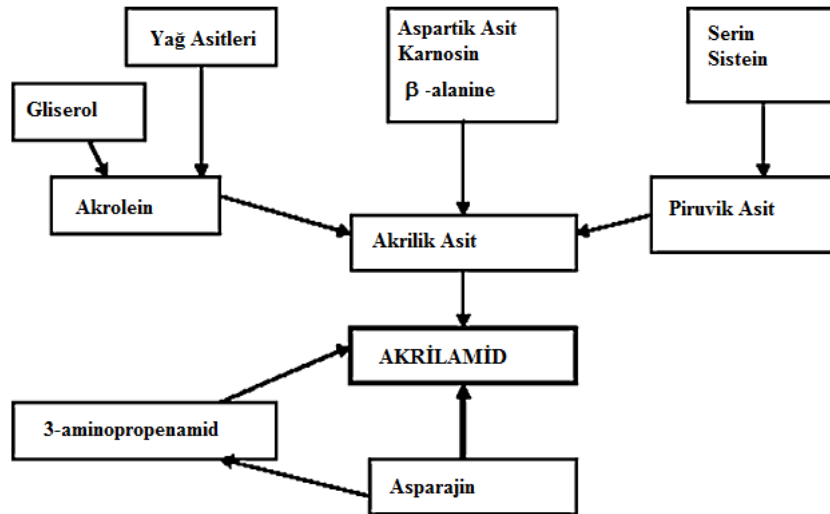
AA oluşumunu etkileyen faktörler, gıdadaki indirgen şekerlerin ve asparajinin oranı, fırınlama ya da kızartma sıcaklığı ve zamanı; gıdadaki matriks ortamı ve su miktarıdır [42].

Ortam pH'ı hem şekerlerin hem de amino grubunun reaktifliğini dolayısıyla Maillard reaksiyonunu etkilemektedir. Düşük pH'larda akrilamid oluşumunun azalacağı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [47].

Başka bir çalışmada akrilamid oluşumunda kızartma sıcaklığının, kızartma süresinden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sabit kızartma süresinde kızartma sıcaklığındaki artışla oluşan akrilamid miktarının üssel bir fonksiyonla arttığı; sabit kızartma sıcaklığında kızartma süresine bağlı olarak gerçekleşen akrilamid miktarındaki artışın ise yüksek sıcaklıklarda lineer arttığını göstermişlerdir [48].

Stadler ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları model çalışmada, eşdeğer molar miktarda asparajin ve glukoz 180°C derecede 30 dakika piroliz edildiğinde 368 µmol AA/mol asparajin elde edilmiştir. Aynı karışımda asparajin monohidrat kullanıldığında veya 0,05 ml su ilavesi yapıldığında AA konsantrasyon oranı 960 µmol/mol'a yükselmiştir. Ayrıca sıcaklığın 120 °C'dan 170°C'a yükselmesiyle AA oluşumunun arttığı da gözlemlenmiştir [5]. Tahıllar ve patates yaklaşık olarak sırasıyla % 40 ve % 14 oranında serbest amino asit asparajin içerdiklerinden AA içeriğinin bu gıdalarda fazla miktarlarda oluşması yapılan model deneylerle de uyumluluk göstermektedir .

AA'nın Akrolein, Akrilik asit ve 3-aminopropenamidin deaminasyonundan türediği de varsayılmaktadır (Şekil 2.3)[49].



Şekil 2.3: Akrilamid için Alternatif Oluşum Yolları [47].

Diğer varsayımlar kısaca açıklanacak olursa:

- Akrolein ısıyla trigliseridden oluşarak oksidasyon ile akrilik aside ya da akrilik radikale dönmektedir. Bu metabolitlerin yağca zengin gıdaların ısıtılması sonucu ortamda bulunan azot kaynağı bileşiklerle reaksiyona girerek AA'ı oluşturduğu varsayılmaktadır.
- Aspartik asit, karnosin ve β -alaninin termal bozunma ile ortamdaki amonyak ile reaksiyona girerek akrilik aside dönüştüğü ve akrilik asidin de akrilamide dönüştüğü varsayılmaktadır.
- Pirüvik asit, serin ve sisteinin dehidrasyon ve desulfatasyonu ile oluşarak indirgenme ile akrilik aside dönüştüğü ve akrilik asidin de akrilamide dönüştüğü varsayılmaktadır.
- Bunların dışında AA oluşumu için birçok model sistem çalışılmış ve farklı hipotezler öne sürülmüştür [49] .

2.4 Gıdalarda Akrilamid

AA özellikle 120°C üzerinde işlem görmüş nişastaca zengin patates cipsi, patates kızartması, işlenmiş tahıllar ve ekmek gibi gıdalarda oluşmaktadır [3]. Çiğ ve haşlanmış patatesten bulunmayan akrilamid; patatesin kızartılması ve fırınlanması sırasında yüksek miktarlarda oluşmaktadır. Yapılan bir çalışmada patates kızartma sıcaklığının 150°C'den 190°C'e çıkartılmasıyla akrilamid miktarında belirgin bir artış olduğu gözlemlenmiştir [50]. Farklı bir çalışmada ticari ve laboratuarda hazırlanan çeşitli gıda maddelerinde AA konsantrasyonları karşılaştırılmış ve karbonhidratlarca zengin besinlerde AA miktarlarının proteince zengin gıdalara göre çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir [3].

Nisan 2009'da Avrupa Komisyonunun özel isteğiyle, Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) 2008 ve 2009 yılında 22 ülkede yapılan analizlerin sonuçlarına göre çeşitli gıdalardaki akrilamid değerlerini rapor etmiştir. Bu değerlerden bazıları Çizelge 2.1'de görüldüğü gibidir. Bu gıdaların dışında fındık, badem, zeytin ve kurutulmuş meyvelerde de az da olsa AA tespit edilmiştir [40].

Çizelge 2.1: Farklı Gıdalardaki Akrilamid Değerleri (µg/kg) (EFSA,2009).

Gıda Türü	N ^b	Ortalama Değer	En Yüksek Değer
Bisküvi	227	317	4200
Ekmek	272	136	2430
Kahvaltılık Tahıl	128	156	1600
Tahıl bazlı bebek Maması	76	74	353
Kahve	208	253	1158
Patates Kızartması	529	350	2668

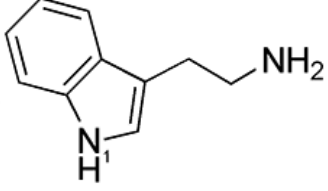
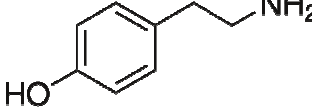
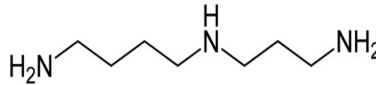
3. BİYOJENİK AMİNLER

3.1 Biyojenik Aminlerin Genel Özellikleri

Biyojenik aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyon ve transaminasyonu ile oluşan düşük molekül ağırlıklı, uçucu olmayan azotlu bileşiklerdir [22]. Bu reaksiyonlar organizmaya özgü enzimlerle olabildiği gibi mikrobiyal olarak da gerçekleşmektedir. İnsan, hayvan ve mikroorganizmaların metabolik ürünleri oldukları için biyojenik amin olarak adlandırılmaktadırlar [28].

Gıdalarda oluşan biyojenik aminler sadece toksikolojik olarak tehlikeli olması açısından değil, gıda kalitesinin göstergesi olarak kabul edildiği için de oldukça önemlidir. Gıdalarda oluşan en önemli biyojenik aminler histamin, tiramin, putresin, kadaverin, b-feniletilamin, triptamin, spermidin ve spermin olup, bu aminler sırasıyla histidin, tirozin, ornitin, lizin, fenil alanin, triptofan ve arginin amino asitlerinden dekarboksilasyon sonucu oluşmaktadır. Biyolojik aminler, alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) kimyasal yapıya sahiptirler. İçerdikleri amin gruplarına göre de monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak gruplandırılırlar [51]. Analizi yapılan biyojenik aminlerin kimyasal yapıları ve özellikleri Çizelge 3.1’de görüldüğü gibidir. Gıdalarda biyojenik amin oluşumunu etkileyen faktörler sıcaklık, serbest amino asit varlığı, tuz miktarı, başlangıç kültür konsantrasyonu, olgunlaşma, ısı işlem ve oksijen olarak değerlendirilir [22]. Ayrıca yüksek dekarboksilaz enzimi etkinliğine sahip mikroorganizmaların ortamda bulunması, mikroorganizmaların gelişimi ve dekarboksilazların oluşumu için uygun çevre koşullarının var olmasına bağlıdır [52].

Çizelge 3.1 : Biyojenik aminler ve kimyasal özellikleri [21,53].

Biyojenik Amin	Molekül Formülü	Kimyasal Yapı	Molekül Ağırlığı	pK _a
Kadaverin	C ₅ H ₁₄ N ₂		202,2g/mol	pK ₁ :11,0 pK ₂ :9,9
Histamin	C ₅ H ₁₀ N ₃		111,1g/mol	pK ₁ :9,8 pK ₂ :6,0
Putresin	C ₄ H ₁₂ N ₂		88,2 g/mol	pK ₁ :10,8 pK ₂ :9,4
Triptamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂		160,2g/mol	pK:10,2
Tiramin	C ₈ H ₁₁ NO		137,2g/mol	pK:9,6
Spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃		145,2g/mol	pK ₁ :9,5 pK ₂ :10,8 pK ₃ :11,6

3.2 Sağlık Üzerine Etkileri

Biyojenik aminler insan ve hayvan fizyolojisinde protein, hormon ve nükleik asit sentezinin ilk basamağını oluşturmak gibi önemli görevlere sahiptirler. Fakat gıda yolu ile fazla alındıkları takdirde histamin zehirlenmesi gibi insan sağlığına olumsuz etkileri olabilmektedir. Histamin böbrek üstü bezlerini etkileyerek kalbi, rahim, bağırsak ve solunum bölgelerindeki düz kasları, duyu ve motor sistemini harekete geçirip, gastrik asit salgısını kontrol altına almaktadır. Bu nedenle histamin zehirlenmesi genellikle geniş bir yelpazede belirtiler gösterir [54] Histamin zehirlenmesinin besin kaynakları, balık ve balık ürünlerinden sonra peynirdir [51]. Belirtileri bulantı, solunum sistemi bozuklukları, ateşlenme, terleme, kalp çarpıntısı, baş ağrısı, kızarıklar, ağızda yanma ve kuruluk, yüksek ya da düşük tansiyondur [55].

Bir diğ er biyojenik amin zehirlenmesi de peynirlerde yaygın olarak bulunan tiraminden kaynaklanmaktadır. Monoamin oksidaz enzim işlevi yetersiz insanlar tiramin'in toksik etkisine karşı hassastır. Bu zehirlenme peynir reaksiyonu olarak da bilinmektedir [56]. Tiramince zengin peynirler feniletilamin de içerir. Tiramin ve 2-feniletilamin'in hipertansiyon ve migrene sebebiyet verdiği, bunun yanı sıra, biyojenik aminlerin nitritlerle reaksiyona girerek kanserojenik nitrozaminlere dönüştüğü yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Putresin ve kadaverinin diğ er aminlerin toksin etkisini arttırdığı ve hipotansiyona neden olduğu da belirtilmiştir [57]. Biyojenik amin toksisitesinin eşik değerleri kesin değerlerle verilmemektedir. Bireylerin detoksifikasyon özelliklerindeki farklılıklar olabildiği gibi solunum ve koroner sistem problemleri, mide-bağırsak rahatsızlıkları, yüksek tansiyon, B₁₂ vitamini eksikliği gibi sorunları olan bireyler için biyojenik aminlerin düşük dozları dahi sorun oluşturabilmektedir [55].

ABD, Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) balıklarda histamin miktarının insan sağlığı açısından maksimum 50  g/g değerinde olması gerektiğini kararlaştırmıştır. Avrupa komisyonunun gıdalarda histamin için izin verdiği değer 100  g/g'dır [58]. Gıdalarda tiramin için 1080 mg/kg üzeri toksik ve 100 mg/kg üzeri değerlerin migren tetikleyici olduğu öngörülmüştür [21]. Her bir biyojenik aminin toksisitesi farklı olduğu için, bir öğünde toplam 40 mg alınmasının potansiyel toksik etki yaptığı da varsayımlar arasındadır [22].

3.3 Gıdalarda Biyojenik Aminler

Biyojenik aminler büyük ölçüde proteince zengin et, balık, peynir gibi gıdalarda ayrıca şarap, bira gibi içeceklerde oluşmaktadırlar. Mandalina, portakal, limon, greyfurt, ahududu,  ilek ve  z mden elde edilen meyve suları veya nektarlarının, farklı konsantrasyon ve yapıda biyojenik amin i erebildikleri belirlenmiş ve bunların başında ise putresinin gelmekte olduğu vurgulanmıştır [22,51]. Bunların yanı sıra çikolata, fermente sebze ve meyve, soya fasulyesinde de çeşitli biyojenik aminler bulunmaktadır [21]. Peynir, diğ er fermente gıdalar gibi biyojenik amin üretimi için ideal bir ortam sağlar ve peynirin olgunlaşması aşamasında amin üretimi de artar. Tiramin, histamin, putresin, kadaverin, triptamin ve  -feniletilamin peynirlerde oluşan biyojenik aminlerdir [22].

Uskumru, ton balığı, ringa ve sardalya gibi balıklarda histamin, putresin, kadaverin, tiramin, spermin, spermidin gibi pek çok farklı biyogenik amin tespit edilmiştir [51]. Histamin zehirlenmesi, özellikle *Scombridae* (ton, uskumru, sardalye, tuna, bonito, palamut, ispanyol uskumrusu) ve *Somberesocidae* (zurna balığı) familyalarına ait balıkların tüketimi ile ortaya çıktığından ilk olarak ‘scombroid’ ya da ‘scombrototoxic’ balık zehirlenmesi olarak adlandırılmıştır. Bu balıkların kaslarında histaminin öncülü olan histidin çokca bulunmaktadır [59]. Balıklar sahip oldukları nötral pH ve içerdikleri yüksek oranda nem ve serbest aminoasitlerle mikrobiyal bozulmalara açıktır. Balık kasında en sık bulunan biyogenik aminler histamin, kadaverin ve putresindir. Kadaverin ve putresin gibi biyogenik aminler, gıdalarda ve özellikle balıklarda tazelik ve bozulma indikatörü olarak değerlendirildikleri için önem taşımaktadırlar. Balıkta bakteriyel bozulmanın başlamasıyla putresin ve kadaverin üretiminin sürekli olarak artmaya başladığı [60] ve bu aminlerin histaminin toksisitesini arttırdığı bildirilmiştir [61]. Bilinenin aksine tuzlanmış balık örneklerinde de biyogenik amin olduğu yapılan deneylerle kanıtlanmıştır. Biyogenik aminler tuzlama işleminden önce, işlem sırasında ve depolama aşamasında oluşmaktadır. [21,62].

ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) balıklarda histamin miktarının <50 mg/kg değerlerde güvenli, 50- 200 mg/kg değerleri arasında olası toksik, 200- 1000 mg/kg yüksek oranda toksik 1000 mg/kg ve üzeri değerler toksik ve insan sağlığı için olumsuz olarak değerlendirmiştir [21].

4. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Kapiler Elektroforez hızlı, çok az madde kullanımlı ve ayırma gücü yüksek bir analitik ayırma yöntemidir. CE yöntemi, klasik elektroforezin ayırma tekniği ile kromatografik yöntemlerin aletsel tasarımının birleşmesinden oluşmaktadır. Bu yöntem ile inorganik katyon ve anyonlar gibi en küçük iyonlardan, DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllere kadar çeşitli maddelerin kantitatif ve kalitatif olarak tayini mümkündür.

4.1 Kapiler Elektroforezin Prensipleri

Kapiler elektroforezin en sık kullanılan şekli “Kapiler Zon Elektroforez”dir. CZE’de ayırım, elektrolit çözeltisi ile dolu olan kapilerde maddelerin farklı yük/büyüklik oranları nedeniyle farklı göç zamanlarına sahip olmasına dayanır.

Kapilerin bir polimer veya jel çözeltisi ile dolu olduğu CE şekli ise “Kapiler Jel Elektroforez”dir (CGE). CGE’de ayırım makromoleküllerin moleküler büyüklüklerine göre gerçekleşmektedir.

Yüksüz maddelerin ayırımı için kullanılan CE türlerinden biri “Misel Elektrokinetik Kromatografi”dir. MEKC’de ayırımın esası elektrolit çözeltisine katılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu misel adı verilen kümeler ile çözücü arasında yüksüz maddelerin paylaşım farklılıklarına dayanır.

İzoelektrik odaklanma kapiler elektroforez yöntemi proteinlerin ayırımında kullanılır. Bu yöntemde ayırım, proteinlerin farklı pH’larda izoelektrik noktaya sahip olmalarından yararlanarak yapılır.

Kapiler Elektrokromatografi (CEC) tam bir kromatografi yöntemidir. Kapilerin içi yaklaşık 1µm çaplı sabit fazla doldurulur. Analitler uygulanan elektrik voltaj altında sabit fazda tutunmalarına göre ayrılırlar.

Bir diğ er CE y ontemi izotakoforezdir (ITP). ITP’de örnek farklı iyon mobilitesine sahip iki elektrolit çözeltisi arasında yürütülür.

4.2 Elektroforetik G   

 yonlar elektrik alan altında sabit bir hızla hareket ederler. Elektrik alan kuvvetini arttırmak her zaman iyonların g    hızlarını da arttırır, dolayısıyla daha hızlı ayırım sağılanır. Elektroforetik mobilite ve elektrik alan arasındaki ili    aşağıdaki eşitlikteki gibidir:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (4.1)$$

v =  yonun hızı ; μ_e = Elektroforetik mobilite ; E = Elektrik Alan

Elektrik alan kullanılan kapilerin boyu ve uygulanan voltaja göre değı ir.

$$E=V/L \text{ (Volt/cm)} \quad (4.2)$$

Burada V uygulanan voltaj, L kapiler kolonun uzunluğudur.

 yonların sahip oldukları elektroforetik mobilite, elektrik kuvveti (F_E) ile doğıru orantılı iken ortamdaki sürtünme kuvvetiyle (F_F) ters orantılıdır. Elektrik kuvvet,

$$F_E=q.E \quad (4.3)$$

ve küresel olduğı varsayılan bir iyonun sürtünme kuvveti,

$$F_F= -6\pi\eta r v \quad (4.4)$$

eşitlikleri ile verilir.

q =iyonun yükü ; η =  zeltinin vizkositesi ; r =iyonun yarıçapı ; v =iyonun hızı

Elektroforetik g    boyunca bu iki kuvvet birbirine eşit fakat zıttır.

$$F_E = F_F \quad (4.5)$$

$$q.E = -6\pi\eta r v$$

Denklem 4.1 ve 4.5 ile elektroforetik mobilite aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$\mu_e = q / 6\pi\eta r \quad (4.6)$$

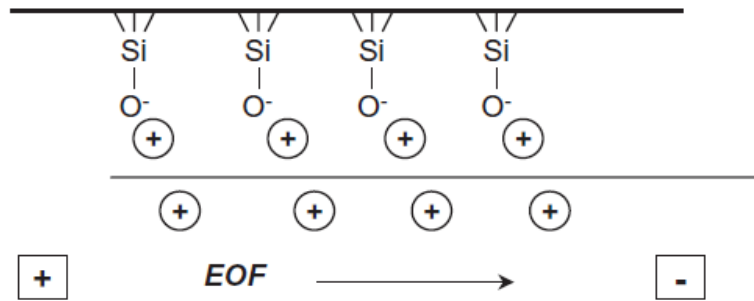
Bu eşitlikten görüldüğü gibi maddenin elektroforetik mobilitesi sabit viskoziteli ortamda yük/büyük oranına bağlıdır. Kısaca küçük ve yükü fazla olan maddeler daha hızlı hareket ederler.

4.3 Elektroosmotik Akış

Elektrik alan altında kapilerin içindeki ayırma elektroliti, bir elektroosmotik akış oluşmasını sağlar. Ayırma ortamının pH'ı, 2'nin üzerinde olduğu zaman silika kapilerin duvarı negatif yüklenir. Bunun nedeni silanol gruplarının disosiyasyonu olmasıdır.



Tampon çözeltisindeki pozitif yükler elektrostatik çekimle duvarın negatif yüküyle bir çift tabaka oluşturur ve zeta potansiyeli denilen bir potansiyel farkı oluşur. Bu sisteme yüksek voltaj uygulanması ile çift tabakanın pozitif iyonları hızla negatif elektroda doğru hareket ederler. İyonlar sulu çözeltide hidratize halde olduklarından çözücüyü de sürüklerler ve kapiler içinde bir elektroosmotik akış (EOF) oluşur. EOF hızı genel olarak enjekte edilen analitlerin elektroforetik mobilitelerinden büyüktür. Bu sebeple EOF ile, anod yönünden enjekt edilen bütün maddeler yüklerine bakılmaksızın katoda doğru sürüklenirler (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : EOF'nin şematik gösterimi.

Pozitif ve negatif iyonların hızları elektroforetik mobilitelerine, ortamdaki elektroosmotik mobiliteye ve uygulanan elektrik alana bağlı olarak aşağıdaki eşitlikteki gibi değişir.

$$v_+ = (\mu_o + \mu_{e+}) \cdot E \quad (4.7)$$

$$v_0 = \mu_o \cdot E$$

$$v_- = (\mu_o - \mu_e) \cdot E$$

v_+ = Pozitif yüklü iyonun hızı ; v_0 = Nötral maddenin hızı ; v_- = Negatif yüklü iyonun hızı

ve μ_o = Elektroosmotik mobilité ; μ_e = Elektroforetik mobilitédir.

Maddelerin göç zamanları sadece elektroforetik mobiliteleri ile değişmez. Aşağıdaki eşitlikde de görüldüğü gibi göç zamanları, kapillerin boyu ve uygulanan voltaj ile alakalıdır. Kapillerin etkin boyu, enjeksiyon noktasından dedektöre kadar olan kısmının uzunluğudur.

$$t = lL / (\mu_{eof} \pm \mu_e)V \quad (4.8)$$

t = geliş süresi ; L = Kapillerin tam boyu ; l = Kapillerin etkin boyu ; V = voltaj

4.3.1 Elektroosmotik Akışa Etki Eden Faktörler

EOF'e etki eden faktörler aşağıdaki Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : EOF'e etki eden faktörler [63].

Ayırma sistemindeki değişiklik	EOF'e etkisi
Tamponun pH değeri arttığında	EOF ↑
Tampon konsantrasyonu arttığında	EOF ↓
Sıcaklık arttığında	EOF ↑ (η değişimi nedeniyle)
Organik çözücü ilavesi ile	EOF ↓ ↑
Pozitif yüklü yüzey aktif ilavesi ile	EOF terse çevrilir
Elektrik alan arttığında	EOF ↑

4.4 Band Genişlemesi

Ayırma etkinliği HPLC de olduğu gibi CE'de de teorik plato sayısı ile gösterilir. Aşağıdaki denklem Gaussian pikleri için kullanılır.

$$w_b = 4\sigma \quad (4.9)$$

w_b = Pikin taban genişliği ; σ = Pikin standart sapması

$$N = 5,54.(t / w_{1/2})^2 \quad (4.10)$$

N= Teorik plato sayısı ; t= Piki geliş zamanı ; $w_{1/2}$ = Yarı yükseklikteki pik genişliği
Eşitlik 4.10'dan da görüldüğü gibi band genişliğinin artması ayırma etkinliğini düşürür. Band genişlemesine neden olan etkenlerden en önemlisi difüzyondur. Kapilerin çapı küçük olduğu için, kapiler çapı boyunca difüzyon ihmal edilebilir ancak kapiler boyunca difüzyon oluşabilir. Difüzyon ve N arasındaki eşitlik şöyledir:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DIL / \mu_e.V \quad (4.11)$$

D=Analitin difüzyon katsayısı

Eşitlik 4.10 ve 4.11 yardımıyla teorik plato sayısı ve difüzyon arasında bir eşitlik verilebilir.

$$N = \mu_e.V.l / 2DL = \mu_e.E.L / 2D \quad (4.12)$$

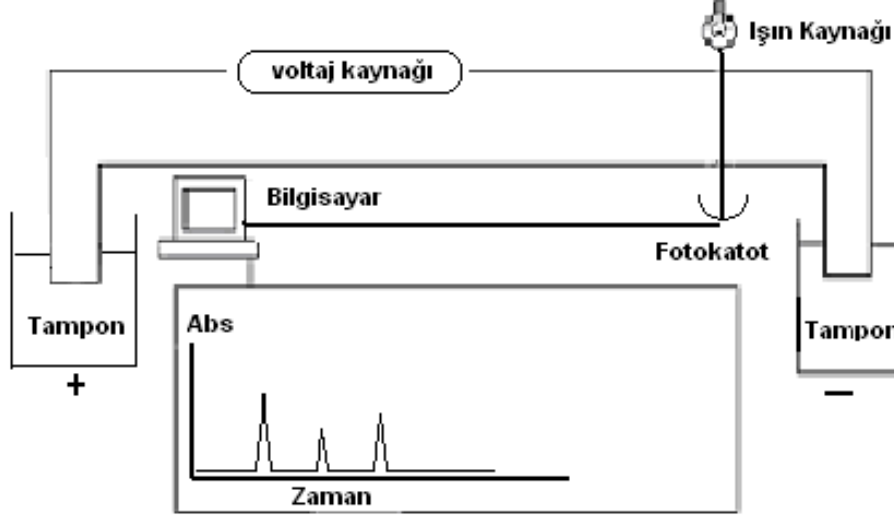
Bu denklemden de görüleceği gibi teorik plato sayısı difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Büyük molekül ağırlığına sahip maddeler daha küçük difüzyon katsayılarına sahip oldukları için daha yüksek plato sayıları ile ayrılabilirler. Ayrıca denklem 4.11'de görüldüğü gibi analiz süresi kısaltıldıkça difüzyon nedeniyle pik genişlemesi azalacaktır. Kapiler elektroforezde yüksek voltaj altında ayırmalar genellikle çok kısa sürede tamamlandığından pikler dik ve simetrikler. Band genişlemesine neden olan diğer parametreler Çizelge 4.2'de verilmektedir.

Çizelge 4.2 : Band genişlemesine neden olan diğer etkenler [63].

Termal Etkiler	Tampon vizkositesinde lokal değişimler nedeniyle pik genişlemesi
Enjeksiyon Hacmi	Büyük hacimlerde difüzyon nedeniyle pik genişlemesi
Örneklerin duvara adsorpsiyonu	Pik şekillerinde kuyruklanma
Elektrodispersiyon (örnek ve tampon çözelti arasındaki iletkenlik farklılıkları)	Pik şekillerinin üçgen halinde görülmesi

4.5 Kapiler Elektrophorez Cihazının Bölümleri

Kapiler Elektrophorez cihazının şematik gösterimi Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.2 : CE'in şematik gösterimi [64].

4.5.1 Voltaj Kaynağı

Tipik bir CE sisteminde uygulanan voltaj en fazla 30 kV'dur. Yapılan çalışmanın güvenilirliği uygulanan voltajın kararlılığıyla yakından alakalıdır. Denklem 4.2' den de görülebileceği gibi voltaj değişimiyle elektrik alan da değişir. Elektrik alanın değişimi göç zamanından alan tekrarlanırlığına birçok önemli parametrenin değişmesine neden olur.

4.5.2 Kapiler

CE'de kullanılan kapillerlerin iç çapı 25-100 μm ; dış çapı 150-520 μm arasında değişir. Kapillerin boyu en sık 50-75 cm arasında kullanılır. Kapillerin iç çapının ve boyunun değişmesi göç zamanı, sıcaklık, adsorpsiyon, dedeksasyon limiti, enjeksiyon hacmi, ayırma etkinliğinin değişmesine neden olur. Kapiler kolonlar eritilmiş silikadan üretilir. Dış yüzeyi poliimid ile kaplanarak esnek bir yapıya kavuşan silika kapilerde dedeksasyon penceresi polimer tabakası yakılarak açılabilir. İlk defa kullanılacak bir silika kapiler ilk önce 1M NaOH ile 30 dakika ardından su ve çalışma tamponuyla da yıkanarak şartlandırılır.

4.5.3.Enjeksiyon

Enjeksiyon hacmi 2-20 nL arasında değişir. Aşırı hacimlerde çalışmak pik şeklinin bozulmasına, band genişlemesine, rezolüsyonun azalmasına sebep olur. 2 tip enjeksiyon şekli vardır.

4.5.3.1 Hidrokinamik Enjeksiyon

Bu tür enjeksiyon en yaygın kullanılan enjeksiyon türüdür. Kendi arasında 3 değişik şekilde gerçekleştirilebilir. Kapilerin dedektör tarafına vakum uygulanarak, kapilerin enjeksiyon kısmına basınç uygulanarak ya da enjeksiyon kabının yükseltilmesiyle bir sifon etkisi yaratılarak enjeksiyon yapılabilir. Hidrokinamik enjeksiyon için Poiseuille'nin denkleminde enjeksiyon hacmi hesaplanabilir.

$$V=\Delta P\pi r^4/8\eta l \quad (4.13)$$

- ΔP = kapiler boyunca basınç farkı (dyn.cm⁻²)
- t= enjeksiyon süresi (s)
- η = tamponun vizkozitesi (dyn.s.cm⁻²)
- L= kapilerin toplam boyu

Sifonik enjeksiyon için ΔP aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$\Delta P=\rho g\Delta h \quad (4.14)$$

- ρ = örneğin yoğunluğu (kg.m⁻³)
- g= yerçekimi ivmesi katsayısı (9,82 N.kg⁻¹)
- Δh = örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı (m)

4.5.3.2 Elektrokinetik Enjeksiyon

Elektrokinetik enjeksiyon, örnek kabı ile çıkış tampon kabı arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak yapılır. Elektro kinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı hidrokinamik enjeksiyona göre daha azdır. Enjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır [65].

4.5.4 Dedektör

CE'de en sık kullanılan detektörler UV-VIS ve floresans dedektörlerdir. Diğer dedeksiyon yöntemleri izelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 : CE’de kullanılan dedeksiyon yöntemleri [66].

Dedeksiyon Türü	LOD (mol/L)
UV absorbsiyon	10^{-5} - 10^{-8}
İndirekt UV	10-100 kat<UV
Floresans	10^{-7} - 10^{-9}
Laser İndüklenmiş Floresans	10^{-14} - 10^{-16}
Amperometri	10^{-10} - 10^{-11}
Kütle spektrometrisi	10^{-8} - 10^{-9}

5. AKRİLAMİD ANALİZİ DENEYSEL KISIM

5.1 Malzeme ve Yöntemler

5.1.1 Malzemeler

Asetonitril (ACN), hekzan, N,N-dimetilformamid (DMF) Riedel marka (Seelze, Almanya). Akrilamid (AA), benamid, perklorik asit (HClO₄) (%70), ve asetik asit Merck marka (Darmstadt, Almanya). Tüm çözeltiler ACN içersinde hazırlanmıştır. Moleküler elek 4A (kristal sodyum alüminyum silikat) 4-8 mesh taneli, Aldrich marka (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya). Moleküler elekler 2 saat 150°C'da vakum altında etkinleştirildikten sonra oda sıcaklığında kullanılmışlardır. Patates kızartması ekstraktından alınan 5 mL'lik örnek kısım, 14-16 saat boyunca 0,5 g moleküler elek içersinde tutulmuştur. Genel olarak, kızartma örnekleri hazırlandıkları gün analiz edilmişlerdir. Gerektiğinde patates kızartması örnekleri buzlukta -4 ° C'da saklanmıştır.

5.1.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları

Ayırımlar diod-dizi dedektör ile birleştirilmiş Agilent marka kapiler elektroforez (Waldbronn, Germany) cihazında, veri işlenmesi ise Agilent ChemStation yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışılan dalga boyu 200 nm'dir. Ayırım için uygulanan voltaj 25 kV'dur. Çalışma sıcaklığı 25°C'a ayarlanmıştır. Enjeksiyonlar 40 mbar basınçla 6 saniyede yapılmıştır . Deneysel çalışmalarda 75 µm iç çapında Agilent marka çıplak silika kapiler kullanılmıştır . Silika kapilerin toplam uzunluğu 52,5 cm ve dedektöre olan uzaklığı 44 cm'dir. Yeni silika kapiler ilk kullanımdan önce 1mol/L NaOH ile 30 dakika, ardından 10 dakika su ile yıkanarak şartlandırılmıştır. Her çalışma gününün başında silika kapiler 0,1 mol/L NaOH ve ardından su ile 2 dakika yıkandıktan sonra, kapilerden 1 dakika hava geçirilerek sulu çözelti tamamen uzaklaştırılmıştır. Ardından kapiler 10 dakika çalışma tamponu ile yıkanarak şartlandırılmıştır. Enjeksiyonlar arasında 2 dakika tampon yıkaması yapılmıştır.

5.1.3 Standard Çözeltilerin Hazırlanması

Akrilamidin ana standart çözeltisi 1 mg/mL derişimde asetonitril ile hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlardaki akrilamid çözeltileri de asetonitril ile seyreltilerek hazırlanmıştır. 2 mol/L HClO₄ ana çözeltisi susuz asetik asit içersinde hazırlanmıştır. Tampon çözelti, 2 mol/L perklorik asit ana çözeltisinden ACN ile seyreltilerek, günlük olarak hazırlanmıştır.

5.1.4 Gıda Ekstraktlarının Hazırlanması

Gıda örneklerinde akrilamid ekstraksiyonu için kabul edilen genel bir ekstraksiyon yöntemi yoktur. Çoğu araştırmacı su, metanol ya da aseton-su gibi bazı çözücü karışımlarını kullanarak çeşitli gıda örneklerinde akrilamid ekstraksiyonunun verimi üzerine yoğunlaşmıştır. En yaygın ekstraksiyon su ile oda sıcaklığında yapılan yöntem olmakla beraber 80⁰C'a kadar ultrason banyosunda ısıtılarak yapılan ekstraksiyon yöntemleri de bulunmaktadır [8,67]. Diğer yandan ısıtma işleminin Maillard reaksiyonunu devam ettirdiği iddia edilmektedir. Deneysel bir çalışmada patates cipsindeki akrilamid miktarının 10 gün boyunca Sokslet ekstraktörü altında 14,5 mg/kg'a yükseldiği gösterilmiştir [68]. Fakat bu çalışmaya üç farklı grubun yorumu, Maillard reaksiyonunun ısı ile devam ederek akrilamid miktarını arttırdığı yönünde olmuştur [69-71].

Bu sebeple patates örneklerinin ekstraksiyonu oda sıcaklığında yapılmıştır. Patates kızartması örnekleri ayçiçek yağında evde kızartılarak hazırlanmıştır. Patates cipsi ve kızartılmış patatesler bir parçalayıcıda öğütüldükten sonra, kızartılmış patates için 2 g ve cips için 4 g'lık kısımlar 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Ekstraksiyon yönteminin seçimi için üç farklı deneme yapılmıştır. Patates kızartması ve cips örneklerindeki yağ uzaklaştırmak için örnekler hekzan ile muamele edilmiştir. Yağ tamamen hekzan fazına geçmiştir. Küçük polar bir molekül olan akrilamidin hekzan çözünürlüğü olmadığından tüm AA asetonitril fazında bulunmaktadır.

- İlk denemede, 2 g patates kızartması örneğine önce 10 mL ACN, ardından 5 mL hekzan eklenmiştir. Bu örnekler 1 dakika vorteks cihazında tutulduktan sonra, hekzan fazı ayrılmıştır. Hekzan ile bu işlem üç kez tekrarlanarak yağ, kızartma örneklerinden uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, örnekler dönen çalkalayıcıda (Edmund Bühler 7400, Tübingen, Germany) 1 saat çalkalanmıştır.

- İkinci grup örnek için alınan 2 g'lık kısma 10 mL ACN eklendikten sonra dönen çalkalayıcıda 1 saat çalkalanmıştır. Ardından 5 mL hekzan eklenerek, yağ örneklerden uzaklaştırılmıştır. Hekzan ile yapılan bu işlem üçer kez tekrarlanmıştır.
- Üçüncü grup örnek için hekzan ile çalkalama işlemi, hem ekstraksiyon öncesinde (5 mL ile ikişer kez) hem de sonrasında (5 mL ile) yapılmıştır. Süspansiyonlar 4000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra 0,2 µm'lik filtreden süzülüp doğrudan enjekte edilmişlerdir.

Geri kazanım değerlerinde ($98,6 \pm 5,6$) bu taktikler arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Sonrasında, patates cipsi ve farklı patates kızartması örnekleri 2. ekstraksiyon yöntemine göre ekstrakte edilmişlerdir

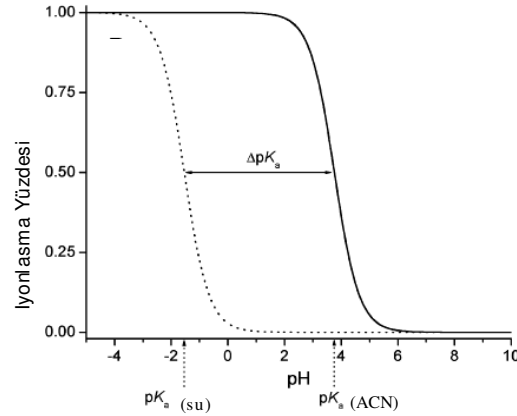
5.2 Metod Optimizasyonu

Akrilamid sulu çözeltide yüksüz polar bir moleküldür. Teorik olarak bir baz olduğundan çözücünden bir proton alarak pozitif olarak yüklenmesi beklenebilir. Ancak oluşacak konjuge asidin (HB^+) pK_a değeri, $\text{pK}_{a,\text{HB}^+} < 0$ olduğundan sulu çözeltide normal pH değerlerinde ($\text{pH}=1-14$) protonlaşması beklenemez. Sulu çözeltide akrilamidi protonlamak ancak aşırı derişik kuvvetli asit varlığında ($\text{pH}<0$) gerçekleşebilir. Oysa ki, CE'de bu kadar yüksek kondüktivitede ayırma ortamı kullanmak, ayırma elektrolitinde izin verilen elektrik akımının en üst sınır değerini (200 µA) aşar. Bu yüzden akrilamidi sulu ortamda yüküne bağlı olarak ayırmak mümkün değildir.

Akrilamidi CE'de ayırımı için bu çalışmada öngörülen prensip, akrilamidin $\text{pK}_{a,\text{HB}^+}$ sabitini mümkün olduğunca yükselterek ve böylece kuvvetli asitlerin düşük konsantrasyonlarını içeren susuz bir çözücü kullanarak, analitin protonlanmasını sağlayacak ayırım ortamını yaratmaktır. ACN ve metanol gibi CE çalışmalarında çokça kullanılan organik çözücüler içersinde asitlerin pK_a değerleri sudakine göre daha yüksektir. ACN ile metanol karşılaştırıldığında, ACN ortamındaki pK_a artışı metanole göre 2-3 kat daha fazladır [72]. Sonuç olarak, ACN'de suya kıyasla asitlerin asitlik sabiti (K_a) azalırken eşlenik bazlarının bazlık kuvveti artmaktadır.

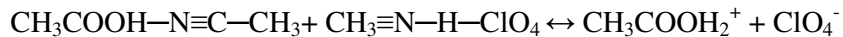
Kolthoff ve Chantooni [73] bazı zayıf bazların ve amidlerin protonlaşma sabitlerinin logaritmik değerlerinin ($\log K_{\text{BH}^+}^f$) suyun yerini ACN aldığı zaman 5 ile 7 birim

arasında arttığını göstermişlerdir. Aslında Kolthoff'un verdiği tabloda $\log K_{BH}^{f+}$ değerleri amidlerin protonlanmış şeklinin asitlik sabiti ($pK_{a,HB+}$) ile aynı anlamdadır. Akrilamidin sudaki ve ACN'deki $pK_{a,HB+}$ sabiti literatürde bulunmamaktadır. Kolthoff'un verdiği tablodaki diğer amidlerin değerlerine göre yorum yapılarak AA'nin $pK_{a,HB+}$ değerinin suda eksi ve ACN'de 3 katı veya fazlasına yükseleceği öngörülmüştür. Şekil 5.1'de protonlanmış Benzamidin pH'a karşı Teorik iyonlaşma yüzdesindeki değişim görülmektedir.



Şekil 5.1: Protonlanmış benzamidin pH'a karşı teorik iyonlaşma yüzdesi [20].

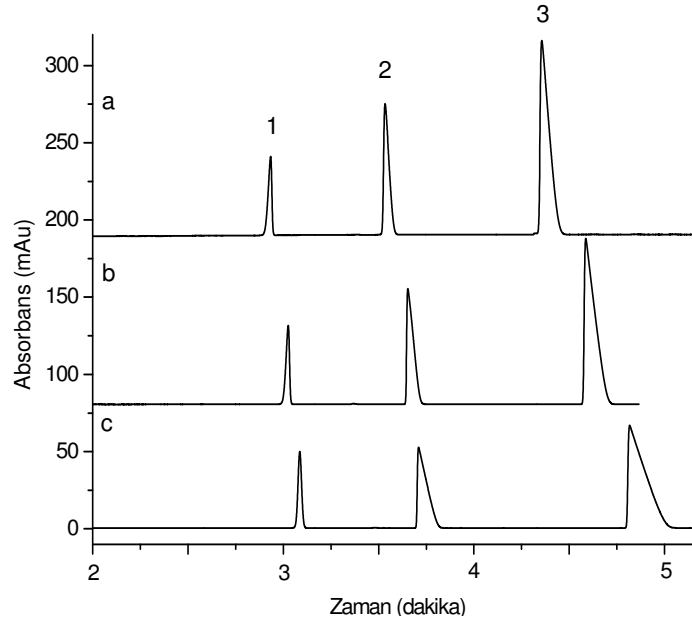
Su yerine asetonitril kullanarak akrilamidi daha düşük konsantrasyonlarda kuvvetli asitler ile protonlamak mümkün olacaktır. Ancak burada başka bir engelleme ortaya çıkmaktadır. Bilindiği gibi, suda tamamen iyonlaşan kuvvetli Brönsted asitlerinin de (HCl, HI, H₂SO₄ vb.) ACN ortamında asidik kuvvetleri azalacaktır. Ancak perklorik asit ACN'de hala kuvvetli elektrolit olarak davranır [74]. ACN içerisinde hazırlanmış 10 mmol/L sülfürik asit çözeltisine kıyasla aynı konsantrasyondaki perklorik asidin kondüktivitesi 30 kat daha fazladır [74]. O halde, AA'nin protonlanması için asidik ortamı sağlayan ve kabul edilebilecek konsantrasyon değerlerinde kullanılabilecek asit HClO₄ asittir. Ancak, perklorat iyonu (ClO₄⁻) ACN ortamında ACN ile hidrojen bağı oluşturmakta ve HClO₄ nin dissosiyasyonunu engellemektedir. Perklorik asit, asetik asit içerisinde hazırlandığı zaman aşağıdaki denklemde görüldüğü gibi CH₃COOH₂⁺ClO₄⁻ iyon çifti oluşturur ve bu iyon çifti ACN ortamında tamamen disosiyeye olur [75].



5.2.1 Tampon Konsantrasyonun Seçilmesi

İlk denemelerde 10 mmol/L HClO₄ ACN içerisinde Bölüm 5.1.3’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Bu tamponda CH₃COOH konsantrasyonu 72,5 mmol/L’e denk gelmektedir. Bu elektrolitin teorik pH değeri literatürde ~2,1 olarak verilmiştir [20]. Akrilamidin gerek su da gerek ACN li ortamda pK_{a,HB+} değerleri bilinmediği için, bu değerler literatürde belli olan iki amid ile karşılaştırılarak tahmin edilmeye çalışılmıştır. DMF’nin sudaki pK_{a,HB+} değeri literatürde -1,2 ile -1,13 [76,77] benzamid için -2,16 ile -1,54 olarak verilmiştir [78,79]. Bu analitlerin pK_{a,HB+} değerleri ACN ortamında sırasıyla +6,1 ve +3,76’a yükselmektedir [73].

pH~2,1 ortamında DMF tamamen protonlaşırken benzamid kısmen protonlaşır ve her ikisi de CZE ortamında kendi elektroforetik hızları ile göç ederler. AA’in incelenen ayırma ortamında ne derecede protonlaştığı, pK_a değerleri bilinen bu iki amid ile beraberce enjekte edilerek kontrol edilmiştir. Denemelerde AA’nın bu iki amid arasında göç ettiği görülmüştür (Şekil 5.2c). Bu duruma göre AA’nın pH~ 2,1 ortamında kısmen HB⁺ formuna dönüştüğü ve ACN ortamında pK_{a,HB+} değerinin +3,76 ile +6,1 arasında olduğu söylenebilir.



Şekil 5.2: AA’in üç farklı HClO₄ konsantrasyonunda, ACN’de DMF ve benzamid ile birlikte elektroferogramları. (a) 30 mmol/L HClO₄ , 218 mmol/L CH₃COOH; (b) 20 mmol/L HClO₄, 145 mmol/L CH₃COOH; (c) 10 mmol/L HClO₄ 72,5 mmol/L CH₃COOH. Voltaj: 25 kV(injeksiyon pozitif elektrottan yapılmıştır). Kapiler 75 µm, (52,5 x 44) cm; dalgaboyu: 200 nm; injeksiyon: Hidrodinamik 40 mbar, 6 s. 1= DMF; 2=AA; 3=BA Herbirinin konsantrasyonu 0,1 mmol/L.

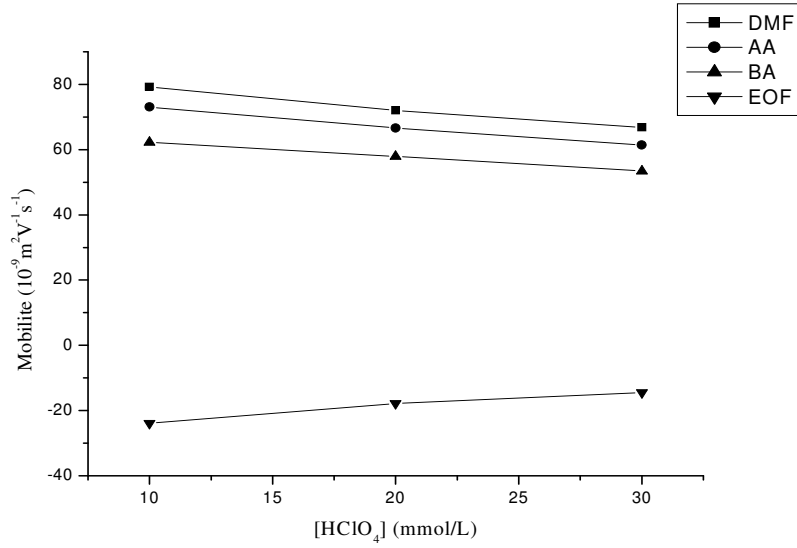
AA'nın DMF ve benzamidle birlikte elektroforetik davranışı 10, 20, ve 30 mmol/L HClO₄ konsantrasyonlarındaki elektrolit çözeltilerde denenmiştir. Bu tamponlardaki CH₃COOH konsantrasyonları sırasıyla 72,5 mmol/L ; 145 mmol/L ve 218 mol/L'dir. Artan HClO₄ konsantrasyonlarıyla beraber pik simetrileri yükselmiştir. 7 mg/L AA standartının üç farklı konsantrasyondaki pik yükseklikleri, rezolüsyon ve ayırma ortamının akım değerleri Çizelge 5.1 verildiği gibidir.

Çizelge 5.1 : HClO₄ konsantrasyonlarına karşı pik ve akım değerleri.

HClO ₄	Pik Yüksekliği	Pik Simetrisi	Akım
10 mM	52,1 mAU	0,14	33 µA
20 mM	75,7 mAU	0,25	61 µA
30 Mm	86,5 mAU	0,55	91 µA

Elektroosmotik akış hızını belirlemek için sulu ortamda kullanılan nötral aseton, su ve formamid gibi işaretleyiciler ACN içinde düşük pH değerlerinde pozitif yüklenirler ve işaretleyici özelliğini kaybederler. Daha önce yapılan bir çalışmada nitrometanın %100 sülfürik asit içersinde dahi pK_{a,HB+} değeri ölçülememiştir [20]. Bu yüzden susuz ortamda elektroosmotik mobilite hesaplamaları için nötral işaretleyici olarak nitrometan kullanılmıştır. Elektroosmotik mobilite değerleri sırasıyla 10, 20 ve 30 mmol/L HClO₄ içeren tamponlar için 23,9 ; 17,8 ve 14,5 (x 10⁻⁹ m²/V.s) olarak bulunmuştur. Perklorik asid konsantrasyonuna karşı üç amidin ve elektroosmotik akışın mobilite değişimleri Şekil 5.3'de verilmiştir.

Organik çözücüler kullanıldığında kapiler duvarındaki silanol gruplarının diğer zayıf asitler gibi davranması ve dissosiyasyonunun azalması beklenir. Elektroosmotik akışın yönünün metanol ortamında ve düşük pH'larda katoddan anoda doğru olduğu ve pH 7 civarında tersine döndüğü daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [18]. Bu çalışmada da tüm denenilen elektrolit konsantrasyonlarında elektroosmotik akış yönünün anodik (katoddan anoda doğru) olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5.3: Perklorik asit konsantrasyonunun elektroforetik ve elektroosmotik mobilitelere etkisi. Şartlar Şekil 5.2’de verildiği gibidir.

Elektroosmotik akış ve elektroforetik mobiliteler, HClO₄ konsantrasyonunun yanı sıra tamponun su içeriği ve CH₃COOH konsantrasyonundan da etkilenmektedir. Aynı elektrolit çözeltisi ile yapılan bir çalışmada su içeriğinin % 2’den fazla olması durumunda elektroosmotik akışın yönünün anoddan katoda doğru değiştiği görülmüştür [20]. Bu çalışmada denemelerde kullanılan en düşük tampon çözeltide (30 mmol/L) dahi su içeriği %0,129 w/v değerini geçmediğinden EOF yönü daha önce belirtildiği gibi katoddan anoda doğrudur. Bu az miktarda su, ticari HClO₄ çözeltisinin %100 lük asit çözeltisi olmaması nedeniyle, ana çözeltiden gelen az miktarda sudur.

Son olarak en uygun şartlarda, Akrilamidin iyonlaşması ACN yerine metanol içeren tampon ile de denenmiştir. AA tam olarak yüklenmemiş dolayısıyla AA piki gözlemlenmemiştir.

5.3 Metod Validasyonu

5.3.1 Kalibrasyon Doğrusu

En uygun koşullarda (30 mmol/L HClO₄ , 218 mmol/L CH₃COOH ve % 0,129 w/v su) düzeltilmiş pik alanlarına göre 0,5 ; 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 mg/L konsantrasyon değerlerinde doğrusal kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon

doğrusunun denklemi $y=5,80 \cdot 10^{-2} x + 1,51 \cdot 10^{-1}$ ve korelasyon değeri 0,999 (r) olarak tespit edilmiştir.

5.3.2 Tekrarlanırlık

Yöntemin kesinliği 7,1 mg/L (0,1 mmol/L) AA standartının aynı gün içerisinde ardarda 5 kez enjeksiyonu ile kontrol edilmiştir. Günler arası tekrarlanırlık için aynı standart üç farklı günde ardarda beş kez enjekte edilmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanırlık değerleri pik alanları ve düzeltilmiş pik alanlarına göre Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2 : Tekrarlanırlık sonuçları.

Değişken	Değer
Gün içi, %RSD (n=5)	
Alan (A)	1,90
Düzeltilmiş Alan (A/t)	1,65
Günler Arası %RSD (n=5x3 gün)	
Alan (A)	13,5
Düzeltilmiş Alan (A/t)	3,90

5.3.3 LOD ve LOQ Değerleri

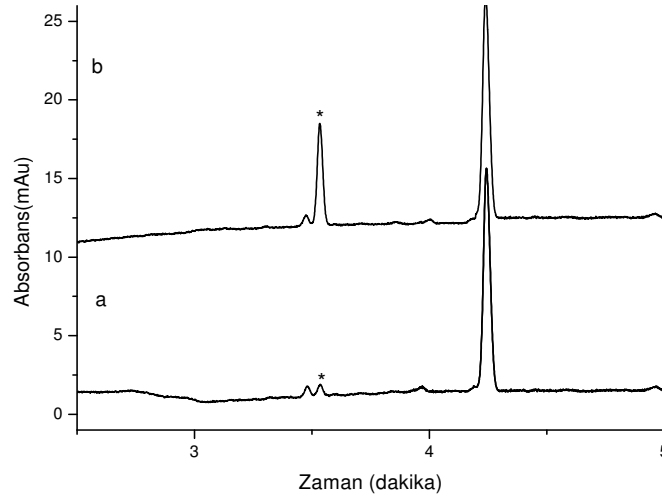
LOD (Dedeksiyon sınırı) değeri 3 farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün üç katı olarak hesaplanmıştır. Akrilamid için LOD değeri 0,041 mg/L ve LOQ (Tayin sınırı) değeri 0,137 mg/L olarak saptanmıştır.

6. ANALİZ YÖNTEMİNİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

6.1 Gıda Örneklerinin Analizi

6.1.1 Gıda örneklerine CE yönteminin uygulanması

Patates cipsi ve patates kızartması örnekleri optimize edilen yöntemle analiz edilmiştir. Patates kızartması örnekleri Bölüm 5.1.4’de anlatıldığı gibi 2. ekstraksiyon yöntemine göre ekstrakte edilip 0,2 µm’lik filtrelerden süzildükten sonra enjekte edilmiştir. Patates kızartması için 3 farklı günde 2 g civarı patates ve 4 g civarı patates cipsi örnekleri ekstrakte edilmiştir. Şekil 6.1 a en uygun koşullar altında enjekte edilen patates cipsinin Şekil 6.1 b ise 0,5 mg/L akrilamid standartı eklenmiş patates cipsi örneğinin elektroferogramını göstermektedir. Farklı markadaki patates cipsilerinin ekstraksiyonu ile elde edilen elektroferogramlarda birkaç matriks piki görülmüştür ve matriks görünümü Şekil 6.1 a daki elektroferograma çok benzerlik göstermektedir.



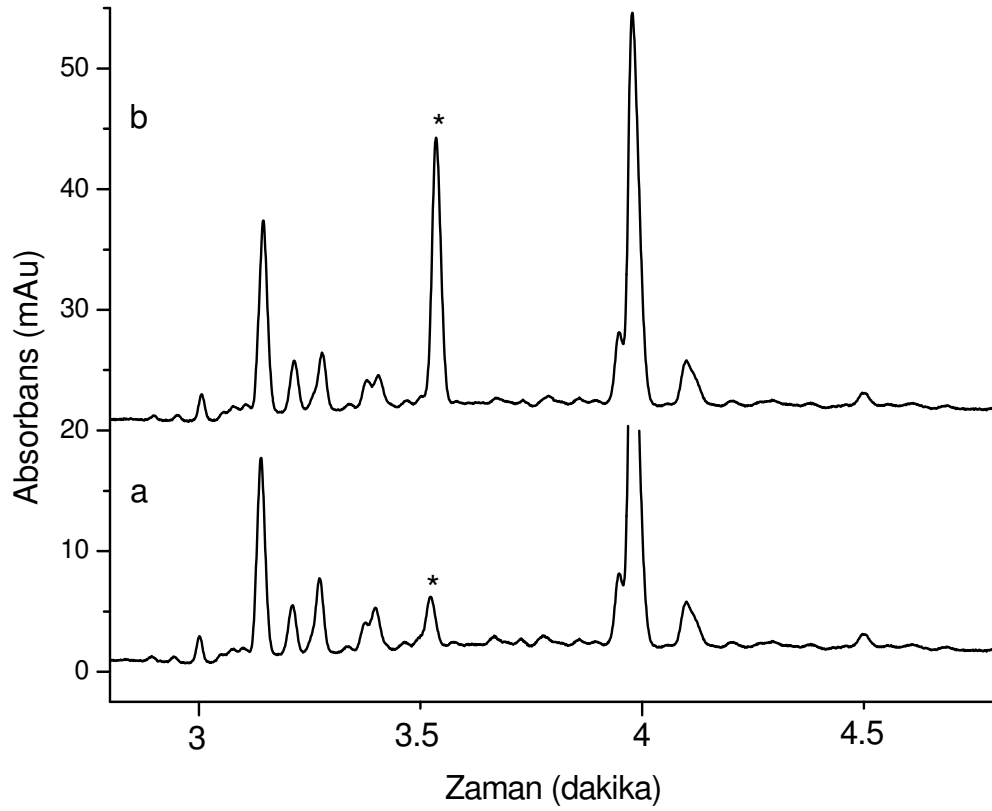
Şekil 6.1 : (a) patates cipsi ekstraktı ve (b) 0,5 mg/L akrilamid standartı eklenmiş patates cipsi ekstrakt örneği. * Akrilamid pikini göstermektedir. Koşullar Şekil 5.2a’da verildiği gibidir.

Diğer yandan, farklı patates cinsleri ile yapılan patates kızartması örnek ekstraktlarından elde edilen elektroferogramlardaki matriks piklerinin görünümü ve sayıları birbirlerinden oldukça farklılık göstermiştir. Ayrıca, ekstraksiyondan önce standart ilavesi yapılmış bazı patates kızartması örneklerinin geri kazanım değerleri oldukça düşük bulunmuştur ($\approx\%68$). NaCl'ün asetonitrildeki çözünürlüğü çok az olduğundan, tuz ACN fazına geçemez ve NACE yönteminde tuzlu örneklerde matriks etkisi nedeniyle pik baskılanması beklenmez. Bunun sebebinin, değişik patates cinslerinde bulunan, farklı su içeriği miktarına bağlı olduğu anlaşılarak,

- İlkinde patates kızartması örnekleri etüvde kurutulduktan sonra ekstrakte edilmiş fakat olumlu bir sonuç alınamamıştır.
- Daha sonraki denemede patates kızartması ekstraktları çeşitli miktarlardaki $MgSO_4$ ile çalkalanarak ortamdaki su çekilmek istenmiş fakat bu denemeden de olumlu sonuç alınamamıştır.
- Son olarak moleküler elek denenmiştir. 5 mL patates kızartması ekstraktına 0,5; 1 ve 3 gram moleküler elek eklenerek denemeler yapılmış ve 0,5 gram moleküler eleğin 5 mL ekstraktdaki suyu çekmek için yeterli olduğu gözlemlenmiştir.

Bundan sonra tüm denemelerde, analizden önce patates kızartması ekstraktlarına moleküler elek ilave edilerek gece boyunca bekletilmişlerdir. Patates cipsi ekstraktları için bu işlem gerekmemiştir. 5 farklı patates cinsinin ekstraktlarına aynı işlem uygulanmıştır. Bulunan akrilamid miktarları 2,09 ile 5,47 mg/kg arasında değişmiştir. Şekil 6.2 a patates kızartması ekstraktının elektroferogramı Şekil 6.2 b ise 2 mg/L akrilamid standartı eklenmiş patates kızartması ekstraktının elektroferogramını göstermektedir.

Moleküler elek olarak olarak tip 4A sodyum alüminyum silikat ve tip 5A kalsiyum alüminyum silikat denenmiştir. AA standartı ile yapılan denemelerde tip 5A moleküler eleğin su ile beraber bir miktar AA'yi tuttuğu gözlemlenmiştir. Tip 4A moleküler eleğin standartlarla yapılan denemelerde AA'yi tutmadığı kanıtlanmıştır. Bu konuda AA'e yönelik literatür bilgisi bulunmamaktadır.



Şekil 6.2 : (a) Patates kızartması ekstraktı (b) 2mg/L akrilamid standartı eklenmiş ekstrakt.
* AA pikini göstermektedir. Koşullar Şekil 5.2a’da verildiği gibidir.

6.1.2 Kızartma süresinin akrilamid miktarına etkisinin gözlenmesi

Tüm patates örnekleri aynı ortamda yaklaşık~20 dk geleneksel evde pişmiş rengini elde edene kadar kızartılmıştır. Patateslerin kızarma süresi ile akrilamid miktarı arasındaki bağıntıyı gözlemlemek amacıyla, patateslerin rengi kahverengi olana kadar kızartma işlemi yapılmış ve gerçekten de akrilamid miktarında önemli artış gözlemlenmiştir. Bu işlemden sonra yapılan ekstraksiyonlar sonucunda bir patateste akrilamid miktarı $2,95 \pm 0,11$ mg/kg dan $7,83 \pm 0,46$ mg/kg’ a kadar yükselmiştir.

6.2 Gerçek Örneklerdeki Rezolüsyon ve Pik Simetrileri

Patates cipsi için Şekil 5.4 a’daki Akrilamid pikinin yanındaki komşu pikle rezolüsyonu 1,37 ve akrilamid pikinin simetrisi 1,19 dur.

Patates kızartması için Şekil 6.2 a'daki akrilamid pikinin solundaki küçük pik ile rezolüsyonu 1,61 ve küçük pikin solundaki akrilamid pikine benzer pik ile rezolüsyonu ise 2,29 olarak bulunmuştur. Akrilamidin pik simetrisi 1,03 dür.

6.3 Metodun Doğruluğu

Metodun doğruluğu seçilen bir patates ve cips ekstraktına akrilamid standart çözeltisinin farklı konsantrasyonlarda ilavesi ve geri kazanım değerlerinin saptaması ile yapılmıştır. Bu amaçla seçilen patates kızartmasındaki akrilamid miktarı, üç ayrı ekstraksiyon sonucunun ortalaması olarak $2,95 \pm 0,11$ mg/kg ve patates cipsindeki akrilamid miktarı ise 3 ayrı ekstraksiyon sonucunda olarak $0,187 \pm 0,019$ mg/kg olarak hesaplanmıştır.

Her bir konsantrasyonda ilave standart değeri iki kez tekrar edilmiştir. Konsantrasyonlar ve geri kazanım değerleri Çizelge 6.1'de verilmiştir.

Çizelge 6.1: Akrilamidin geri kazanım değerleri (n=2).

Arttırılan Konsantrasyon (mg/L)	% Geri Kazanım
Patates cipsi	
1,0	98,3±5,2
0,5	96,8±7,3
0,25	90,2±6,5
Patates Kızartması	
4,0	102±3,9
2,0	99,2 ± 4,4
0,5	95,7±5,5

6.4 Sonuçlar

Bu çalışmada, akrilamidin bir matriks içinden ayrımı, teşhisi ve kantitatif tayini için ilk kez bir susuz ortam kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrusal kalibrasyon aralığı yüksek regrasyonla belirlenmiştir. Akrilamid enjeksiyon sonuçlarının tekrarlanırlık değerleri CE için kabul edilen sınırlar içinde bulunmuştur. CE yönteminde standartların tekrarlanırlık değerleri genel olarak gün içi $A/t \leq \% 3$ 'e (% RSD), günler arası $A/t \leq \% 6$ 'a (% RSD) kadar kabul edilebilir.

Gerçek örneklerde bu değer daha üst sınırlara da çıkabilmektedir. Yöntemin belirleme ve tayin sınırları patates kızartması ve patates cipsi içindeki akrilamid tayinini gerçekleştirecek kadar düşük olarak tespit edildiğinden geliştirilen analiz yönteminin uygulaması bu iki gıda örneğindeki akrilamid tayinine uygulanmıştır. Denenen örneklerde tespit edilen akrilamid içerikleri, literatürde farklı analiz yöntemleri ile bulunan sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Literatür çalışmaları ve uluslararası gıda organizasyonları şimdiye kadar patates cipsi için 0,17- 3,7 mg/kg arasında, patates kızartması için 0,2- 12 mg/kg arasında akrilamid içeriği rapor etmişlerdir [38]. Çalışılan örneklerle yapılan geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır.

Geliştirilen analiz yönteminin en büyük avantajı basit bir ekstraksiyon işlemi ardından hiçbir ön türevlendirme, ön saflaştırma veya ön derişiklendirme işlemleri gerekmeden örneklerin doğrudan kolona enjeksiyonu sonucu ayırma işleminin basitliği ve kısa süresidir. Ayrıca nL boyutundaki enjeksiyon hacmi nedeniyle hem kullanılan standartlar hem de düşük hacimli ayırma ortamı ile kimyasal ekonomi sağlayan bir yöntemdir. Ayırma ara yıkamalarla sürekli yenilenen ve likit kromatografinin pahalı kolonları yerine çok daha ucuz silika kapillerlerde gerçekleştiği için tüm analiz yöntemi hem zaman hem de madde açısından ekonomiktir.

Akrilamidin ısıl işlem sonucunda gıda örneklerinde ortaya çıktığı bilinmektedir. Şu anda çalışmalar gıda ürünlerinde gerçekleştirilecek işlemler sonucu bu oluşumu önlemek ya da akrilamid miktarlarını azaltmak yönünde gelişmektedir. Bu çalışmalar esnasında, her laboratuvar tarafından temin edilebilecek, hızlı sonuç alınan ve ekonomik analiz yöntemlerinin önemi artmaktadır. Geliştirilen NACE yöntemi bu açıdan faydalı olacaktır.

7. BİYOJENİK AMİN DENEYSEL KISIM

7.1 Malzemeler ve Yöntemler

7.1.1 Malzemeler

Floresein izotiyosiyanat izomer I (FITC), triptamin, spermidin, putresin Fluka marka (Buchs, Almanya); Histamin, tiramin ve kadaverin Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) marka; Brij 35, dodesilsülfat sodyum tuzu (SDS), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Trikloroasetik asit (TCA) ve aseton Merck (Darmstadt, Almanya) markadır. Susuz sodyum karbonat Carlo Erba'dan (Rodano, İtalya) temin edilmiştir. Tüm biyogenik aminlerin ana çözeltileri Elga Purelab Option-7-15 model sistemi ile elde edilen deiyonize su ile, FITC ana çözeltisi ise 20 mM olacak şekilde asetonda çözülerek hazırlanmıştır. Bütün ana çözeltiler karanlıkta ve 4°C'de saklanmış ve gerektiğinde yeniden hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan balık örnekleri salamura palamut-lakerda (Sadra sadra) ve tuzlu sardalyadır (Sardina pilchardus). Balıklardaki nem oranları 5 gramlık balık örneğinin fırında 105°C sıcaklıkta sabit tartıma gelene kadar kurutulmasıyla tespit edilmiştir. Nem oranları lakerda için % 58 (a/a), sardalya için % 53 (a/a); tuz oranları ise mühr yöntemi kullanılarak sırasıyla % 16 (a/a) ve % 19 (a/a) olarak tespit edilmiştir.

7.1.2 Salamura Balık Örneklerinin Hazırlanması

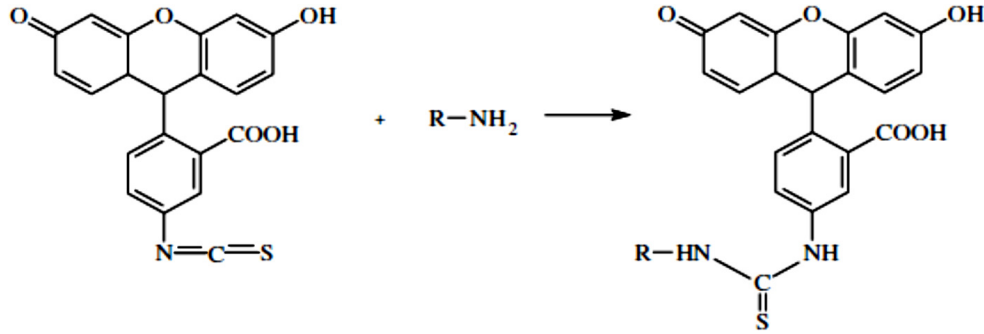
Üreticiden alınan bilgiye göre, lakerda balıklar yaklaşık enlemesine 3 cm genişliğinde kesildikten sonra (baş ve kuyruk hariç) balığın kılçığı dikkatlice çıkartılmıştır. Balık parçaları soğuk su ile iyice yıkandıktan sonra tüm gece boyunca tuzlu suda kanı gidene kadar tutulmuştur. Ardından 10-14 gün boyunca kaya tuzunda bekletilmiştir. Bu zaman sürecinde kanlı su –eğer varsa- değiştirilmiştir. Kuru tuzlanan lakerdalar % 20-25 tuzlu suda saklanmıştır. Sardalya balıklar bir tabaka tüm halde sardalya, bir tabaka tuz şeklinde sıralanarak salamura edilmiştir.

7.1.3 Balık Örneklerinin Ekstraksiyonu

Balık örnekleri el blenderında parçalandıktan sonra 5 gramlık kısım % 6 trikloroasetik asitin 10 mL'si ile 2'er dakika vorteksde karıştırılmıştır. 3500 rpmde 10 dakika santrifüjlendikten sonra, kalan katı kısma aynı işlem tekrar uygulanmıştır. Toplanan sıvı kısım önce whatman 41 süzgeç kağıdı ile ardından 0,45 µm'lik membran filtreden süzölmüş ve ardından NaOH ile pH'ı 7 e ayarlanarak 25 mL hacme deiyonize su ile tamamlanmıştır.

7.1.4 Standartların Türevlendirilmesi

Her bir biyojenik amin konsantrasyonu 0,3 mM olacak şekilde; 9,5 mM FITC, 84 mM Na₂CO₃ içeren 1 mL'lik çözelti karışımı ana çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı NaOH ile 9 olarak ayarlandıktan sonra 40°C da karanlıkta 4 saat türevlendirilmiştir. Kullanılan FITC'in mol oranı biyojenik aminlerin toplam mol sayısının 5 katı olarak optimize edilmiştir. Türevlendirme sıcaklığı ve zamanı da standartların pik alanlarının en yüksek değerine göre optimize edilerek seçilmiştir. Türevlendirilen standart biyojenik amin karışımı iki kademede 1000 kez seyreltilerek enjekte edilmiştir. Şekil 7.1'de FITC ile biyojenik aminlerin verdiği reaksiyon görölmektedir.



Şekil 7.1: FITC ile aminlerin reaksiyonları.

7.1.5 Örneklerin Türevlendirilmesi

Balık örneklerindeki türevlendirici konsantrasyonu, artan oranlarda FITC kullanılarak biyojenik aminlerin pik yüksekliklerinin ve türevlendiricinin aşırısının pikinin gözlemlenmesi ile seçilmiştir. 100 µL balık ekstraktı, 200 µL 19 mM FITC ve 300 µL 0,3 M karbonat tamponu (pH=9) eklendikten sonra 1 mL hacime

deiyonize su ile tamamlanan örnek 40⁰C da 4 saat türevlendirmiştir. Balıklardaki biyojenik aminlerin nicel ve nitel analizi amacıyla bu örneklerden 20 ile 1000 kat deiyonize suyla seyreltme yapılarak injeksiyon yapılmıştır. Seyreltmeye bağlı hataların oluşmasını en aza indirmek amacıyla çalışmada 2 kademeli seyreltme yapılmıştır.

7.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları

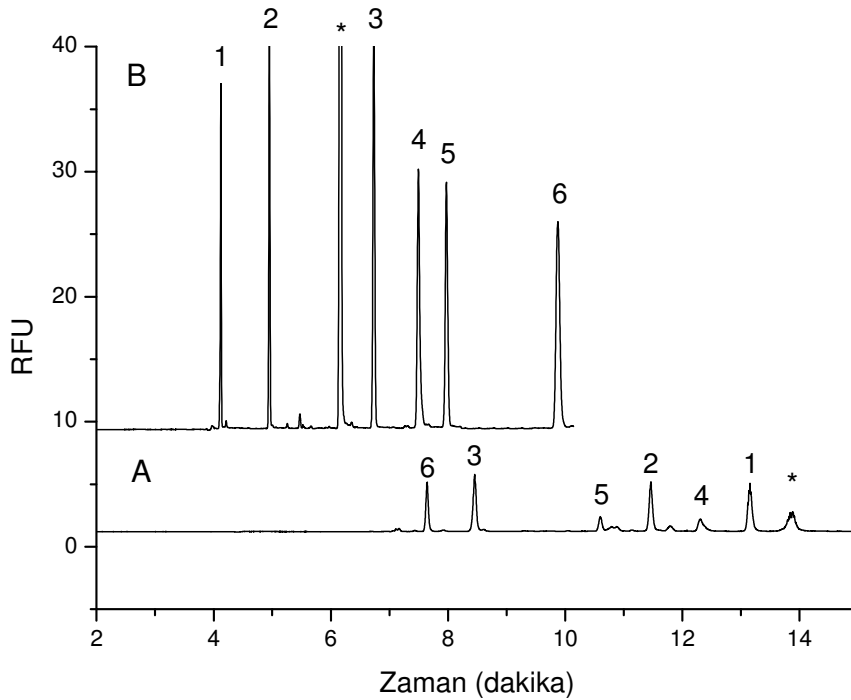
Ayırımlar Agilent kapiler elektroforez sisteminde (Waldbronn, Almanya) gerçekleştirilmiş ve ZETALIF 2.000 lazer indüklenmiş floresans dedektör ile (Picometrics, Montlaur, Fransa) dedekte edilmiştir. 488 nm'de Ar-iyon lazer ile uyarılmıştır. Veri eldesi ve değerlendirmesi Agilent ChemStation programında yapılmıştır. Ayırım 25 kV potansiyel uygulanarak 25⁰C derecede, injeksiyonlar 50 mbar basınçta 6 saniyede gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan silika kapiler kolon 50 µm iç çapına sahiptir ve Polymicro Technologies'den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir. Toplam uzunluğu 63 cm ve etkin uzunluğu 47 cm'dir. Yeni silika kapiler ilk kullanımda 1 M NaOH ile 30 dakika, su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Gün başlarında kapiler kolon 1 M NaOH ile 15 dakika, su ile 2 dakika ve tampon çözelti ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Enjeksiyonlar arasında 2 dakika 0,1 M NaOH ve 2 dakika su ardından 5 dakika süreyle tampon çözelti ile yıkama yapılmıştır.

8. BİYOJENİK AMİN ANALİZİ SONUÇLARI

8.1 Metod Optimizasyonu

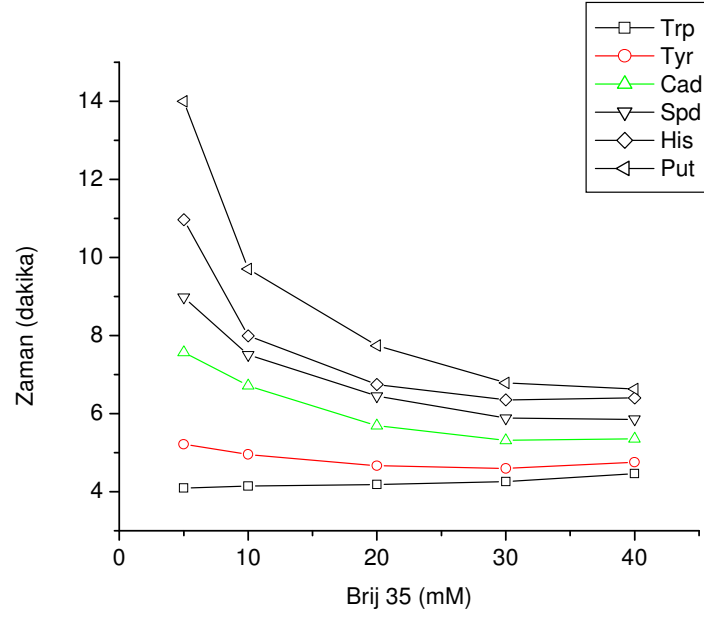
Sodyum dodesil sülfat (SDS) biyojenik aminlerin ayrımında çokca kullanılan bir yüzey aktif maddedir [25]. Bu çalışmada biyojenik aminlerin ayrımı için ilk kez yüksüz bir yüzey aktif madde olan Brij 35 kullanılmıştır. Türevlendirilen biyojenik amin standart karışımı SDS ve Brij surfaktanı içeren 75 mM borat pH:9,7 tamponuna ayrı ayrı enjekte edilmiştir. Brij 35 içeren tamponda SDS'li tampona göre hem ayırım zamanında kısalma hem de floresans şiddetinde artış gözlemlenmiştir. Tamponda Brij 35 kullanıldığında elektroforetik ayırım 10 dakikada gerçekleşmiş ve de floresans şiddetinde 4 ile 21 kat arasında artış gözlemlenmiştir. (Şekil 8.1)



Şekil 8.1 : Biyojenik aminlerin elektroferogramları A) 75 mM Borat, 20 mM SDS (pH:9,7) B) 75 mM Borat , 10 mM Brij. Voltaj:25 kV. Kapiler 50µm (63x47)cm, injeksiyon:hidrodinamik, 50 mbar, 6 s. 1=Trp, 2=Tyr, 3=Cad, 4=Spr, 5=His, 6=Put. Her birinin konsantrasyonu 0,3 µM . *=FITC

İlk tampon denemelerinde 100 mM Boratla çalışılmış fakat sonrasında denenen 75 mM Borat tamponunda pik yükseklikleri arttığı için çalışmalara 75 mM Borat tamponu ile devam edilmiştir. Hem SDS hem de Brij 35 içeren tamponlarda biyojenik aminlerin yerlerini tespit etmek amacıyla üçlü biyojenik amin karışımları değişen konsantrasyonlarda enjekte edilmiştir. Optimum türevlendirme sıcaklığının belirlenmesi için eş zamanlı olarak oda sıcaklığında ve 40°C derecede 1-2-4-6 ve 24 saat karanlıkta bekleyen örnekler enjekte edilmiştir. 4 saat 40°C derecede türevlendirilen örneğin en yüksek pik boylarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Türevlendirici (FITC) konsantrasyonunun seçilmesi için toplam biyojenik amin mol sayısının 1,5 – 2,5 ve 5 katları denenmiş ve 5 kat FITC en uygun örnek olarak belirlenmiştir.

Son olarak Brij konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Brij 35 yüksüz miseller halinde bulunur ve bu miseller elektroosmotik akış ile katoda doğru hareket ederler. FITC ile türevlendirilmiş biyojenik aminler negatif yüklendiklerinden anoda doğru hareket etmeye meyilli olacaklar ve ancak onlarda elektroosmotik akış ile katod yönüne sürükleneceklerdir. Bu arada elektroosmotik mobilite ile daha hızlı hareket eden Brij miselleri ile ilişkiye giren biyojenik aminlerin detektöre ulaşma hızı artacaktır. Şekil 8.2 tampondaki Brij 35 konsantrasyonuna karşı biyojenik aminlerin göç zamanlarındaki değişimi göstermektedir. Yüksüz yüzey aktif maddenin bir avantajı olarak, 5 ile 40 mM Brij konsantrasyonlarında akım neredeyse aynı kalmaktadır (104 μ A - 97 μ A). Tüm denenen Brij 35 konsantrasyonlarında biyojenik aminler arasındaki rezolüsyon değerleri yeterlidir. Brij konsantrasyondaki değişim, pikler arasındaki rezolüsyonu etkilediği gibi pik alanlarını etkilememiştir. Bu nedenle, farklı gerçek örneklerdeki biyojenik aminlerin matriks piklerinden ayrılması değiştirilen Brij 35 konsantrasyonu ile akım ve pik alanı değişmeksizin gerçekleştirilebilir.



Şekil 8.2 : Tampondaki Brij 35 konsantrasyonuna karşı biyogenik aminlerin göç zamanı grafiği.

8.2 Metod Validasyonu

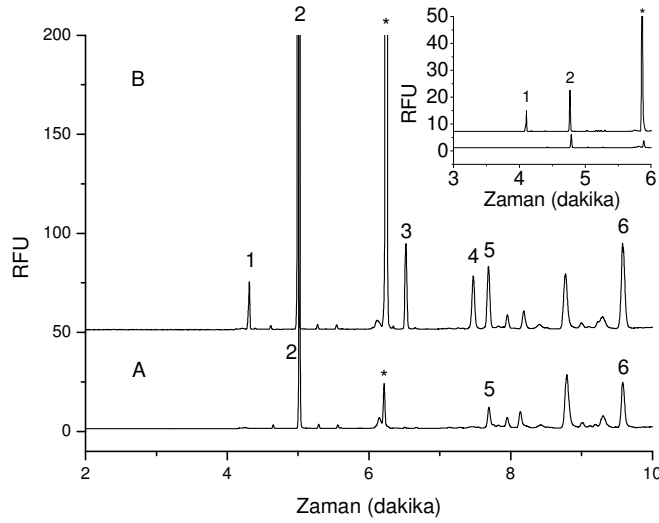
Yöntemin biyogenik aminler için doğrusal kalibrasyon aralığı, kalibrasyon eşitliği ve regrasyonu ve LOD ve LOQ değerleri toplu olarak Çizelge 8.1 de verilmiştir. Literatürde, biyogenik aminlerin FITC ile türevlendirilerek CE-LIF yöntemiyle tayin edildiği 3 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda dedeksiyon limitleri sırasıyla 0,72-35 nM [28], 10 nM [80] ve 1,8-2,5 nM [31] olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi bu tez çalışmasında daha düşük LOD değerlerine ulaşılmıştır. CE-LIF yöntemi ile biyogenik amin tayinlerinde sadece CaO ve arkadaşları [81] (0,25-2,5 nM) ve Zhang ve arkadaşları [82] (0,4-1,5 nM) kendi laboratuvarlarında sentezledikleri floresan boyalarla türevlendirilen biyogenik aminlerin LOD değerleri bizim LOD değerlerimize yaklaşabilmiştir.

Çizelge 8.1 : Yöntem validasyon toplu sonuçları.

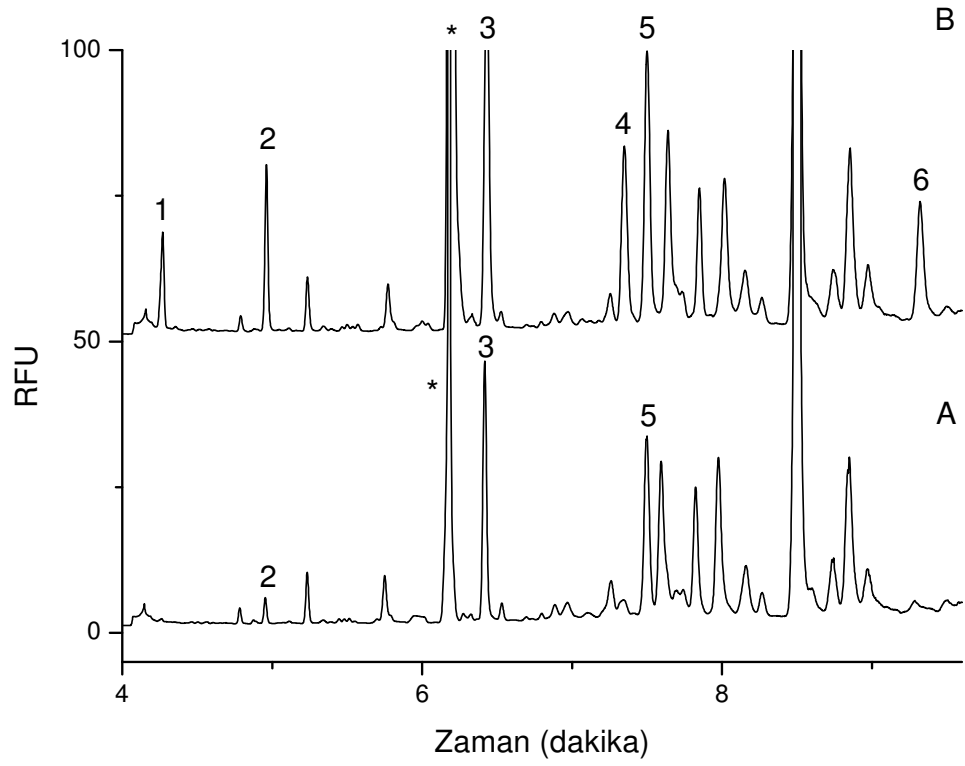
B.A	Lineer Alan (nmol/L)	Doğrusal Eşitlik	r ²	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)	A/t (% RSD)
Trp	1-300	y=0.538826x-0.0002388	0,99974	0,416	1,39	1,98
Tyr	1- 225	y=0.689102x-0.00094	0,99976	0,420	1,40	3,21
Cad	6 -300	y=0.63582891x-0.000933	0,99949	0,627	2,09	2,99
Spd	6- 800	y=0.31973449x+0.0018684	0,99873	1,00	3,34	3,24
His	6-1000	y=0.241110021x+0.0079926	0,99364	1,02	3,38	2,65
Put	4- 450	y=0.39447384+0.0007039	0,99920	1,26	4,19	1,63

8.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması

Balık örnekleri yukarıda anlatıldığı şekilde türevlendirildikten sonra, Lakerda örneği 100 kez ve tiramin teşhisi için yüksek konsantrasyonda tiramin içerdiği için 1000 kez seyreltilerek enjekte edilmiştir. Standart biyojenik amin karışımı seyreltik balık örneklerine eklenerek biyojenik aminlerin yerleri tespit edilmiştir (Şekil 8.3). Sardalya örneği de ön denemelerden sonra 20 kez seyreltilerek enjekte edilmiştir (Şekil 8.4).



Şekil 8.3: (A)Lakerda Ekstrakt Elektroferogramı (1/100 seyreltilmiş) (B) Biyojenik amin standartları eklenmiş Lakerda Ekstrakt Elektroferogramı.1:Triptamin 2:Tiramin * FITC 3:Kadaverin 4:Spermidin 5: Histamin 6:Putresin. Üst elektroferogram 1/1000 seyreltilmiş tampondaki Brij 35 konsantrasyonuna karşı biyojenik aminlerin göç zamanı grafiği. Şartlar Şekil 8.1 A'da verildiği gibidir.



Şekil 8.4 : (A) Sardalya ekstrakt elektroferogramı (1/20 seyreltilmiş) (B) Biyojenik amin standartları eklenmiş Sardalya ekstrakt elektroferogramı .

Balık örneklerindeki biyojenik amin miktarları Çizelge 8.2’de verilmiştir.

Çizelge 8.2 : Balık örneklerindeki biyojenik amin miktarları (mg/kg) .

	Trp	Tyr	Cad	Spd	His	Put
Lakerda	-	310±9	-	-	72,3±2,1	135±5
Sardalya	-	4,12±0,05	34,0±0,7	-	66,6±2,8	-

8.3.1 Metodun Doğruluğu

Geri kazanım çalışmaları, balık örneklerine üç farklı konsantrasyonda biyogenik amin standartı eklenerek yapılmıştır. Toplu geri kazanım sonuçları Çizelge 8.3’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 8.3: Geri kazanım sonuçları .

Biyogenik Amin	Balık Örneğindeki Miktar (µM)	Eklenen Miktar (µM)	Geri Kazanım
Trp	0	0,060	% 93,7
	0	0,15	% 101
	0	0,30	% 103
Tyr	0.090	0.040	% 90
	0.090	0,096	% 105
	0.021	0,045	% 102
Cad	0	0,060	% 99
	0	0,15	% 105
	0	0,30	% 102
Spr	0	0,060	% 95,9
	0	0,15	% 99,3
	0	0,30	% 99,7
His	0,14	0,060	% 99,3
	0,14	0,10	% 102
	0,14	0,30	% 101
Put	0,33	0,15	% 100
	0,33	0,30	% 103
	0,16	0,30	% 99,6

8.4 Sonuçlar

Geliştirilen analiz yöntemiyle, biyojenik aminler etkin bir şekilde ayrılırken, kullanılan yüksüz yüzey aktif maddenin floresans duyarlılığını arttırması sonucu literatürde CE-LIF yöntemleriyle şimdiye kadar ulaşılan en düşük belirleme sınırlarına inilmiştir. Yöntemin doğrusal kalibrasyon aralığının ve tekrarlanabilirliğinin biyojenik aminlerin güvenilir analizini gerçekleştirecek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin gerçek örneklere uygulanması tuzlanmış balık örneklerinde biyojenik amin tayinlerinde gerçekleştirilmiştir. Çok düşük dedeksiyon sınırlarına inildiğı için tuzlu örnekler çok seyreltilerek enjekte edilebilmiştir. Tuzlanmış balık örneklerinin tuz miktarları ekstraksiyon çözeltilerinde seyreltme oranlarına göre 0,055 mM ile 2,74 mM konsantrasyona indiğı için tuzun olumsuz matriks etkisi ortadan kalkmıştır. Gerçek örneklere yapılan standart eklemelerle yöntemin doğruluğı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] **Swedish National Food Administration.** (2002). *Information about Acrylamide* in Food 24 April 2002, <http://www.slv.se>. alındığı tarih: 2/09/2011
- [2] **Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Toernqvist, M.** (2000). Acrylamide: A Cooking Carcinogen?, *Chem. Res. Toxicol.*, **13**(6) , 517-522.
- [3] **Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Toernqvist, M.** (2002). Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(17) , 4998-5006.
- [4] **Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T.** (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, **419**(6906), 448-449.
- [5] **Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F. ve diğerleri** (2002). Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, **419**(6906), 449-450.
- [6] **Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, Y.** (2005). Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods - Review and recent developments, *J. Chromatogr. A*, **1075**(1-2), 1-21.
- [7] **International Agency for Research on Cancer.** (1994). Some Industrial Chemicals, IARC Monographs on the Evaluation for Carcinogenic Risk for Chemicals to Humans, **60**, IARC, Lyon, Sf. 435.
- [8] **Wenzl, T., M., de la Calle , M. B., Anklam, E.** (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review, *Food Addit. Contam.*, **20**(10), 885-902.
- [9] **Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H. et al.** (2003). Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods, *Food Addit. Contam.*, **20**(3), 215-220.
- [10] **Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K. et al.** (2002). Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods, *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, **93**, 638-652.
- [11] **Tateo, F., Bononi, M.** (2003). A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food, *Ital. J. Food Sci.*, **15**(1), 149-151.
- [12] **Bermudo, E., Ruiz-Calero, V., Puignou, L., Galceran, M.T.** (2004). Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food, *Electrophoresis*, **25**(18-19), 3257-3262.
- [13] **Bermudo E., Núñez O., Puignou .L, Galceran M.T.** (2006). Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis, *J .Chromatogr. A*, **1120**(1-2), 199-204.

- [14] **Bermudo E., Núñez O., Puignou. L, Galceran M.T.** (2006). Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis, *J.Chromatogr. A*, **1129**(1) 129-134.
- [15] **Zhou X., Fan L.-Y., Zhang W., Cao C.-X.** (2007). Separation and determination of acrylamide in potato chips by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Talanta*, **71**(5), 1541-1545.
- [16] **Chantooni, M. K., Jr., Kolthoff, I. M.** (1975) Acid-Base Equilibria In Methanol, Acetonitrile, And Dimethyl-Sulfoxide In Acids And Salts Of Oxalic-Acid And Homologs, Fumaric And Orthophthalic Acids - Transfer Activity-Coefficients Of Acids And Ions, *J. Phys. Chem.*, **79**(12), 1176-1182.
- [17] **Geiser L., Veuthey J.-L.** (2007) Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Electrophoresis*, **28**(1-2), 45-47.
- [18] **Porras S. P., Riekkola M.-L, Kenndler, E.** (2003). The principles of migration and dispersion in capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents, *Electrophoresis*, **24**(10), 1485-1498.
- [19] **Porras S. P., Kenndler, E.** (2005). Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion, *Electrophoresis* , **26**(17), 3203-3220.
- [20] **Porras S. P.** (2006). Capillary zone electrophoresis of some extremely weak bases in acetonitrile, *Anal.Chem.*, **78**(14), 5061-5067.
- [21] **Saaïd, M., Saad, B., Hashim, N. H., Mohamed Ali, A. S.,Saleh, M. I.** (2009) Determination of biogenic amines in selected Malaysian food, *Food Chem.*, **113**(4), 1356–1362.
- [22] **Shalaby, A. R.,** (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Res. Int.*, **29**(7), 675–690.
- [23] **Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H. C., Dykes, G. A.** (2009). Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation: A Review *Crit.Rev. Food Sci.*, **49**(4), 369–377.
- [24] **Buatti, S., Boschelle, O., Mozzon, M., Battistutta, F.** (1995). Determination of biogenic amines in alcoholic and non-alcoholic beers by HPLC, *Food Chem.* **52**(2), 199-202.
- [25] **Chiu, T. C ., Lin, Y. W., Huang, Y. F., Chang, H. T.** (2006). Analysis of biologically active amines by CE, *Electrophoresis*, **27**(23), 4792–4807.
- [26] **Garcia-Canas, V., Cifuentes, A.** (2008). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis, *Electrophoresis* , **29**(1), 294–309.
- [27] **Cifuentes, A.** (2006). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis , *Electrophoresis* , **27**(1), 283–303.

- [28] **Rodríguez, I., Lee, H. K., Li, S. F. Y.** (1999) Ion-pair solid-phase extraction of biogenic amines before micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection of their fluorescein thiocarbamyl derivatives, *Electrophoresis* **20**(9), 1862–1868.
- [29] **Cortacero-Ramírez, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.** (2007). Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection, *Food Chem.*, **100**(1), 383–389.
- [30] **Feng, X., Chen, S., Xu, Y., Du, W., Luo, Q., Liu, B.-F.** (2008). Separation and determination of biogenic amines in fish using MEKC with novel multiphoton excitation fluorescence detection, *J. Sep. Sci.*, **31**(5), 824–828.
- [31] **MingDu, M., Flanigan, V., Ma, Y.** (2004). Simultaneous determination of polyamines and catecholamines in PC-12 tumor cell extracts by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **25**(10-11), 1496-1502.
- [32] **Lalljie, S. P. D., Sandra, P.** (1995) MEKC Analysis of FITC and DTAF Amino-Acid Derivatives With LIF Detection, *Chromatographia*, **40**(9-10), 513–518.
- [33] **Hu, S., Li, P. C. H.** (2000) Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and fluorescent detection of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, *J. Chromatogr. A*, **876**(1-2), 183–191.
- [34] **Liu, X., Li, D. F., Wang, Y., Lu, Y. T.** (2004) Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in apple extracts by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **1061**(1), 99–104.
- [35] **Molina, M., Silva, M.** (2001). Simultaneous determination of phosphorus-containing amino acid-herbicides by nonionic surfactant micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **22**(6), 1175–1181.
- [36] **Molina, M., Silva, M.** (2002). Analytical potential of fluorescein analogues for ultrasensitive determinations of phosphorus-containing amino acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **23**(7-8), 1096–1103.
- [37] **Cao, L. W., Hong, W., Zhang, H. S.** (2006). Determination of phosphoamino acids by 6-oxy-(N-succinimidyl acetate)-9-(2'-methoxycarbonyl)fluorescein and MEKC with LIF detection, *Chromatographia*, **63**(11-12), 571–578.
- [38] **Friedman, M.** (2003). Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *J. Agric. Food Chem.*, **51**(16), 4504-4526.

- [39] **Johnson, K., Gorzinski, S., Bodner, K.,Campell, R., Wolf, C., Friedman, M.; ve Mast, R.** (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rat, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **85**, 154-168.
- [40] **Capuano, E., Fogliano, V.** (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies, *Food Science and Technology*, **44** (4) , 793-810.
- [41] **Mucci, L., Dickman, P., Steineck, G., Adami, H., Augustsson, K.** (2003). Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden, *British Journal of Cancer*, **88**, 84-89.
- [42] **Hagmar, L., Wirfalt, E., Paulsoon, B., Törnqvist, M.** (2005). Differences in haemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender, *Mutation Research*, **580** , 157-165.
- [43] **Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., Jafari, M.** (2011). Acrylamide in Baking Products: A Review Article, *Food Bioprocess Technology*, **4** (4), 530-543.
- [44] **WHO.** (2005). Summary report of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additive (JECFA). Rome, Italy: The ILSI Press International Life Sciences Institute. Washington, DC, 1-47.
- [45] **Url-1**<http://www.who.int/ipcs/food/jecta/summaries/summary_report_64.final.pdf>, alındığı tarih: 13/10/2011
- [46] **Claeys, W.L., Vleeschouwer, K.D., Hendrickx, M.E.** (2005). Quantifying The Formation of Carcinogens During Food Processing Acrylamide, *Trends in Food Science & Technology*, **16** (5), 181–193.
- [47] **Rydberg, P., Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.;Ehrenberg, L.; Törnqvist, M.** (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7012-7018.
- [48] **Gökmen, V., Palazoğlu, T. K., Şenyuva, H. Z., Karlsson, P.;Ehrenberg, L.** (2006). Relation Between The Acrylamide Formation and Time-Temperature of Surface and Core Region of French Fries., *Journal of Food Engineering.* **77**, 972-976.
- [49] **Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., Soltanizadeh, N.** (2011). Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review, *Food Bioprocess Technology*, **4** (4), 340-363.
- [50] **Pedreschi, F., Kaack, K., Granby, K., Troncoso, E.,** (2006). Acrylamide Reduction Under Different Pre-Treatments in French Fries, *Journal of Food Engineering*, **79** (4), 786-793.
- [51] **Santos, S.** (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int.J.Food Microbiol.* **29**, 213-231.

- [52] **Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho M. A, Hirn J. A.** (1993). The Effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J Food Protect*; **56** (2): 125-129.
- [53] **Kvasnička, F., Voldřich, M.** (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection, *Journal of Chromatography A*, **1103**, 145-149.
- [54] **Özoğul, F., Küley, E., Özoğul, Y.** (2004). Balık ve Balık Ürünlerinde Oluşan Biyojenik Aminler, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*. **21**, 375-381.
- [55] **Bardocz, S.** (1995). Polyamines in Foods and Their Consequences for Food Quality and Human Health, *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 341-346.
- [56] **Halasz, A., Barath, L.S.S., Holzapfel, W.** (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. **5**, 42-49.
- [57] **Maijala, R., Eerola, S.** (1993). Contaminant Lactic Acid Bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine, *Meat Sci.*, **35**, 387-395.
- [58] **EU Directive.** (2007). Amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007. *Official Journal of European Union*,.
- [59] **Gökoglu N., Varlık C.** (1995). Sardalya konservelerinin histamin biyojen amini yönünden incelenmesi, *Gıda.*, **5**, 273-279.
- [60] **Fernandez, S. J., Mackie, I. M.** (1987). Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of spanish canned fish. *Int. J. Food Sci. Technol.* **22**, 409-412.
- [61] **Rawles, D. D., Flick, G. J.** (1996). Biogenic amines in fish and shellfish. *Adv. Food Nut.. Res.* **39**, 329-365.
- [62] **Auerswald, L., Moren, C., Lopata, A. L.** (2006) Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood, *Food Chem.*, **98** (2), 231-239.
- [63] **Engelhardt, H. and Beck, W., Schmitt, T.,**1994. Capillary Electrophoresis , Lengericher Handelsdruckerei, Lengerich.
- [64] **Url-2** <<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/14-Electrophoresis.pdf>>, Alındığı Tarih: 23.03.2005
- [65] **Bjergegaard, C. And Michaelsen, S.,** 1999. Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis, Paston Prepress, Denmark.
- [66] **Heigher, D.N.,** 1992. High Performance Capillary Electrophoresis, Heelet Packard GmbH, Germany.
- [67] **Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, Y.** (2005). Occurrence and Analytical Methods of Acrylamide in heat-treated foods, *J. Chromatogr. A*, **1075**, 1–21.
- [68] **Pedersen, J. R., Olsson, J. O.** (2003). Soxhlet Extraction of Acrylamide From Potato Chips, *Analyst* , **128**, 332–334

- [69] **Grob, K., Biedermann, M., Hoenicke, K., Gatermann, R.** (2003). Comment on “Soxhlet Extraction of Acrylamide From Potato Chips” by J. R. Pedersen and J. O. Olsson, *Analyst*, 2003, 128, 332, *Analyst*, **128**, 92.
- [70] **DeVries, J. W., Post, B. E.** (2004). Comment on “Soxhlet Extraction of Acrylamide From Potato Chips” by J. R. Pedersen and J. O. Olsson, *Analyst*, 2003, 128, 332, *Analyst*, **129**, 93–95.
- [71] **Tanaka, M., Yoneda, Y., Terada, Y., Endo, E., Yamada, T.** (2004). Comment on “Soxhlet Extraction of Acrylamide From Potato Chips” by J. R. Pedersen and J. O. Olsson, *Analyst*, 2003, 128, 332, *Analyst*, **129**, 96–98.
- [72] **Chantooni, M. K., Jr., Kolthoff, I. M.** (1975). Acid-base equilibriums in methanol, acetonitrile, and dimethyl sulfoxide in acids and salts of oxalic acid and homologs, fumaric and o-phthalic acids. Transfer activity coefficients of acids and ions, *J. Phys. Chem.* , **79**, 1176–1182.
- [73] **Kolthoff, I. M., Chantooni, M. K., Jr.** (1973). Protonation Constants of Very Weak Uncharged Bases in Acetonitrile, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8539–8546.
- [74] **Coetzee, J. F., Kolthoff, I. M.** (1957). Polarography in Acetonitrile III. Bronsted Acids. Amperometric Titration of Amines with Perchloric Acid. Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6110–6115.
- [75] **Kinugasa, M., Kishi, K., Ikeda, S.** (1973). Infrared Study of the Interaction Between Anhydrous Perchloric Acid and Acetonitrile, *J. Phys. Chem.*, **77**, 1914–1918.
- [76] **Bagno, A., Lovato, G., Scorrano, G.** (1993). Thermodynamics of protonation and hydration of aliphatic amides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1091–1098.
- [77] **Grant, H. M., McTigue, P., Ward, D. G.** (1983). The basicities of aliphatic amides, *Aust. J. Chem.*, **36**, 2211–2218.
- [78] **Cox, R. A., Druet, L. M., Klausner, A. E., Modro, T. A. ve diğerleri.** (1981). Protonation acidity constants for some benzamides, acetamides, and lactams, *Can. J. Chem.*, **59**, 1568–1573.
- [79] **Edward, J. T., Chang, H. S., Yates, K., Stewart, R.** (1960). Protonation Of The Amide Group: I. The Basicities Of Substituted Benzamides, *Can. J. Chem.*, **38**, 1518–1525.
- [80] **Rodríguez, I., Lee, H. K., Li, S. F. Y.** (1996). Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, **745**, 255–262.
- [81] **Cao, L., Wang, H., Ha, M., Zhang, H.** (2006). Determination of biogenic amines in HeLa cell lysate by 6-oxy-(*N*-succinimidyl acetate)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein and micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **27**(4), 827–836.

- [82] **Zhang, N., Wang, H., Zhang, Z. X., Deng, Y. H., Zhang, H. S.** (2008). Sensitive determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with a new fluorogenic reagent 3-(4-fluorobenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde , *Talanta* , **76** (4), 791–797.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Selda BAŞKAN KAHRAMAN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul 31/07/1980

Adres: İTÜ Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü 34469 Maslak/İstanbul

E-Posta: baskansel@itu.edu.tr

Lisans: YTÜ Kimya Lisans 2003

Yüksek Lisans : İTÜ Kimya Yüksek Lisans 2005

Mesleki Deneyim ve Ödüller: “Principles and Applications of Metrology in Chemistry Training Course” 2004, Ulusal Metrolji Enstitüsü.

Yayın Listesi:

- Uzascı, S., Baskan, S., Erim, F. B. (2012) Biogenic Amines in Wines and Pomegranate Molasses-A Non-Ionic Micellar Electrokinetic Chromatography Assay with Laser-Induced Fluorescence Detection, Food Analytical Methods, 5(1) , 104-108.
- Oztekin, N., Baskan, S.,Kepekci, S. E., Erim, F. B., Topcu, G. (2010) Isolation and analysis of bioactive diterpenoids in Salvia species (Salvia chionantha and Salvia kronenburgii) by micellar electrokinetic capillary chromatography, Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis ,51(2), 439-442.
- Oztekin, N., Baskan, S., Erim, F. B. (2007) Determination of alginate copolymer in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, 850, 488-492.
- Baskan, S., Daut-Ozdemir, A., Gunaydin, K ., Erim, F. B. (2007) Analysis of anthraquinones in Rumex crispus by micellar electrokinetic chromatography, 71(2), 747-750.
- Baskan, S., Oztekin, N., Erim, F. B. (2007) Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis, 101 (4), 1448-1452.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- Baskan, S., Tezcan, S.,Kose, S.,Öztekin, N., Erim, F. B. (2010) Non-ionic micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence: A new method tested with biogenic amines in brined and dry-salted fish, Electrophoresis, 31(13), 2174-2179.
- Baskan, S., Erim, F. B. (2007) NACE for the analysis of acrylamide in food, Electrophoresis, 28 (22), 4108-4113.