

**AKRİLAMİD'İN ANALİTİK YÖNTEMLER
KULLANILARAK ANALİZİ VE
GİDALARDAKİ TAYİNİ**

Doktora Tezi

Müjde Aşlı IŞIKDAĞ

Eskişehir 2018

**AKRİLAMİD' İN ANALİTİK YÖNTEMLER KULLANILARAK ANALİZİ
VE GIDALARDAKİ TAYİNİ**

Müjde Aşlı IŞIKDAĞ

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1103S046 no. lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Müjde Aslı IŞIKDAĞ'ın "Akrilamidin Analitik Yöntemler Kullanılarak Analizi ve Gıdalardaki Tayini" başlıklı tezi 10.08.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek 'Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin' ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Göksel ARL

Üye : Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR

Üye : Prof. Dr. Osman Sermet KABASAKAL

Üye : Doç. Dr. Bülent ERGUN

Üye : Doç. Dr. Fatma TÜMSEK

Prof. Dr.
Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Enstitü Müdürü

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “Analysis of Acrylamide using Analytical Methods and Its Determination in Foodstuffs” has been prepared and submitted by Mjde Aslı IŞIKDAĞ in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Analytical Chemistry Department has been examined and approved on 10/08/2018.

Committee Members

(Supervisor) : Prof. Dr. Göksel ARLİ

Member : Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR

Member : Prof. Dr. Osman Sermet KABASAKAL

Member : Assoc. Prof. Dr. Bülent ERGUN

Member : Assoc. Prof. Dr. Fatma TÜMSEK

Signature

Prof. Dr.
Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Director
Graduate School of Health Sciences

ÖZET

AKRİLAMİD'İN ANALİTİK YÖNTEMLER KULLANILARAK ANALİZİ VE GIDALARDAKİ TAYİNİ

Müjde Aslı IŞIKDAĞ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2018

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN

Bu çalışmada dönüşümlü voltametri çalışmaları sonucunda akrilamidin indirgenme reaksiyonunun tersinmez ve difüzyon kontrollü olduğunu göstermiştir. Bu amaçla Osteryoung Kare Dalga Voltametrisi yöntemi kullanılarak yürütülen çalışmalarda öncelikle hücreden 5 dk. süresince 0.5kg cm⁻² basınçta azot gazı geçirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, tamponsuz çalışılmasına karar verilmiş ve başlangıç potansiyeli -1400mV olarak tespit edilmiştir. Civa büyüklüğü 80 ms'ye tekabül eden değerin analitik açıdan en kaliteli veriyi sağlayan civa büyüklüğü olduğu görülmüştür. Destek elektrolit seçimi için yapılan çalışmalarda; tetra butil amonyum bromür kullanıldığında -1.5V ve -1.97V'da iki polarografik pik gözlenmiştir. Tetra metil amonyum iyodür ve LiCl ile alınan voltamogramlarda ise LiCl ile elde edilen pikin daha düzgün olduğu saptanmıştır ve 0,5M LiCl derişiminde çalışılmasına karar verilmiştir. Optimal koşullar altında, 2.8×10^{-6} – 6×10^{-5} M (0,2ppm-4,26ppm) derişim aralığında kalibrasyon çalışmaları yapılmış, $R^2 = 0.999$ ve %RSD= 1,24 elde edilerek, gıdalarda akrilamid tayini için tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak akrilamidin gıdalardaki tayini için hızlı, kolay, duyarlı, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan, bir voltametrik yöntem geliştirilmiştir. Gıdalarda daha düşük seviyelerdeki akrilamid tayini ise, isokratik elüsyon tekniği kullanılarak bir ters faz kolonu kullanılarak YPSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Akrilamid, Gıda Analizleri, Osteryoung Kare Dalga Voltametrisi, YPSK

ABSTRACT

ANALYSIS OF ACRYLAMIDE USING ANALYTICAL METHODS AND ITS DETERMINATION IN FOODSTUFFS

Müjde Aslı IŞIKDAĞ

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health, August, 2018

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

In this study, the conversion of the acrylamide reduction reaction is irreversible and diffusion controlled as a result of the cyclic voltammetry studies we have done. For this purpose, in studies carried out using Osteryoung Square Wave Voltammetry method, 5 min. nitrogen gas was passed through at a pressure of 0.5 kg cm⁻². In the studies conducted, it was decided to work without the buffer and the initial potential was determined as -1400 mV. The mercury size was found to be the mercury size which provides the highest quality data in terms of analytical value corresponding to 80 ms. In studies for support electrolyte selection; two polarographic peaks were observed at -1.5V and -1.97V when tetrabutyl ammonium bromide was used. In the voltamograms obtained with Tetra methyl ammonium iodide and LiCl, the peak obtained with LiCl was found to be smoother and it was decided to work at 0.5 M LiCl concentration. Under optimal conditions, calibration studies were performed at a concentration range of 2.8x10⁻⁶ - 6x10⁻⁵ M (0.2 ppm-4,26 ppm), and reproducibility and reproducibility studies were performed for acrylamide determination in food with R² = 0.999 and % RSD = 1,24 As a result, a voltammetric method has been developed that is quick, easy, sensitive, selective and does not require any separation for the acrylamide residue. Lower levels of acrylamide were determined by HPLC using an inverted phase column using an isocratic elution technique.

Keywords: Acrylamide, Food Analysis, Osteryoung Square Wave Voltammetry, HPLC

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, bana her zaman destek olan, yol gösteren, tecrübelerini ve engin bilgilerini benden esirgemeyen çok değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Göksel ARLI**'ya,

Tez çalışmalarım süresince bilimsel ve akademik desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım **Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR**, **Doç. Dr. Bülent ERGUN** ve **Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN**'a,

Bana her konuda destek olan aileme ve eşim **Burak IŞIKDAĞ**'a, teşekkürlerimi sunarım.

Müjde Aslı IŞIKDAĞ

Ağustos 2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir görselde ‘intihal içermediğini’ beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Müjde Aslı IŞIKDAĞ

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.


Müide Aslı IŞIKDAĞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
FINAL APPROVAL FOR THESIS STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Akrilamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
1.1.1. Monomer.....	2
1.1.2. Polimer.....	2
1.2. Alınabilecek Akrilamid Miktarı.....	4
1.3. Akrilamid'in Mekanizması.....	4
1.4. Akrilamidin Kanserojen Özelliği.....	5
1.5. Akrilamidin Maillard Reaksiyonu ile Oluşumu.....	6
1.6. Akrilamidin Diğer Yöntemlerle Oluşumu.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Voltametri.....	9
2.1.1. Voltametrinde akımlar.....	11
2.1.2. Voltametri cihazı ve elektrotlar.....	12
2.1.2.1. Civa kökenli elektrotlar.....	15
2.1.2.1.1. Damlayan civa elektrodu (DME).....	15
2.1.2.1.2. Durgun civa damla elektrodu (SDME).....	16
2.1.2.1.3. Asılı civa damla elektrodu (HDME).....	16
2.1.2.1.4. Civa film elektrot (MFE).....	16
Elektro kaplama ile civa filminin oluşturulması.....	16

Amalgam yoluyla civa filminin oluşturulması.....	17
2.1.2.2. Katı elektrotlar.....	17
2.1.2.2.1. Platin elektrot.....	18
2.1.2.2.2. Altın elektrot.....	18
2.1.2.2.3. Karbon elektrotlar.....	18
Elmas.....	18
Grafit elektrot.....	18
Karbon pasta elektrot.....	19
Camı karbon elektrot.....	19
Empreyene karbon elektrotlar.....	20
Pirolitik grafit elektrot.....	20
2.1.2.2.4. Bizmut elektrot.....	20
2.1.2.3. Modifiye elektrotlar.....	20
2.1.2.4. Dönen disk ve halka disk elektrotlar.....	21
2.1.2.5. Karşılaştırma (referans) elektrodu.....	21
2.1.2.6. Yardımcı (karşıt) elektrot.....	21
2.1.2.7. Destek elektrolit.....	22
2.2. Polarografi.....	22
2.2.1. Voltametrik teknikler.....	25
2.2.1.1. Normal puls polarografisi.....	25
2.2.1.2. Diferansiyel puls polarografisi (DPP).....	26
2.2.1.3. Kare dalga voltametrisi (SWV).....	27
2.2.1.4. Voltametrik hücreler.....	28
2.2.1.5. Polarogramlar.....	30
3. AKRİLAMİD İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
4. VOLTAMETRİK YÖNTEMLE YAPILAN DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
4.1. Kullanılan Cihazlar.....	35
4.1.1. Elektrokimyasal analizör.....	35
4.1.2. Elektrotlar.....	35
4.1.2.1. Referans elektrot.....	35
4.1.2.2. Karşıt elektrot.....	36
4.1.3. Çözeltilerin hazırlanması.....	36

4.1.3.1. Standart akrilamid çözeltisinin hazırlanışı.....	36
4.1.3.2. LiCl çözeltisinin hazırlanışı.....	36
4.1.3.3. Britton-Robinson tampon çözeltisi (B-R tamponu).....	37
4.2. Analiz Parametreleri.....	37
4.3. Deneysel Çalışmalar ile Elde Edilen Sonuçlar.....	37
4.3.1. Voltametrik çalışmalar.....	37
4.3.2. Dönüşümlü voltametri (CV).....	39
4.3.3. Kare dalga voltametrisi ile yapılan çalışmalar.....	44
4.3.3.1. PH taraması.....	44
4.3.3.2. Başlangıç potansiyeli taraması.....	45
4.3.3.3. Civa damlası büyüklüğü seçimi.....	46
4.3.3.4. Destek elektrolit seçimi.....	47
4.3.3.5. LiCl derişiminin etkisi.....	48
4.3.3.6. Difüzyon katsayısının hesaplanması.....	49
4.3.3.7. Kalibrasyon çalışması.....	51
4.3.4. Kare dalga voltametrisi ile gıdalarda akrilamid analizi.....	52
4.3.4.1. Standart akrilamid numunesinin hazırlanması.....	52
4.3.4.2. Standart tost ekmeği (galeta-rusk) numunesinin hazırlanması.....	52
4.3.4.3. Tost ekmeği numunesi üzerine geri kazanım Çalışmaları.....	53
4.3.4.4. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi ve tekrarlanabilirlik – tekrar üretilebilirlik çalışmaları.....	59
4.3.4.5. Tanımlama limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ).....	59
4.3.4.6. Tekrarlanabilirlik.....	60
4.3.4.7. Tekrarüretilebilirlik.....	61
4.3.4.8. Grubb testi.....	62
4.3.4.9. Horwitz oranı (HorRat).....	63
4.3.4.10. Doğruluk parametrelerinin pratikte kullanımı.....	63
4.3.4.11. LOD ve LOQ çalışmaları.....	64
4.3.4.12. Tekraredilebilirlik çalışmaları.....	65
4.3.4.13. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları.....	67

5. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ	
ÇALIŞMALARI.....	69
5.1. Kullanılan Cihazlar.....	70
5.2. UV- Spektrofotometresi.....	71
5.3. Yöntemler.....	73
5.3.1. Hareketli fazın hazırlanışı.....	73
5.3.2. Standart çözeltilerin hazırlanışı.....	73
5.3.3. Akrilamidin numunelerden ekstraksiyonu.....	73
5.3.4. Akrilamid ekstraktlerinin katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmesi.....	74
5.3.5. Analiz parametreleri.....	75
5.3.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazında yapılan çalışmalar.....	76
5.3.7. Kalibrasyon-lineer ölçüm aralığı.....	81
5.3.8. LOQ-LOD çalışması.....	82
5.3.9. Tekrarlanabilirlik.....	83
5.3.10. Gerçeklik (geri alma).....	84
6. SONUÇLAR ve DEĞERLENDİRME.....	87
KAYNAKÇA.....	90
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Akrilamidin kimyasal yapısı ve kimyasal/fiziksel özellikleri.....	3
Tablo 4.1. CV çalışmasında tarama hızına karşı elde edilen akım değerleri.....	41
Tablo 4.2. 2×10^{-4} M Akrilamid için tarama hızı ile akım değişimi.....	42
Tablo 4.3. $2,08 \times 10^{-7}$ M Akrilamid çözeltisi üzerine eklenen akrilamid, LiCl ve distile su miktarları.....	54
Tablo 4.4. Eklenen akrilamid miktarlarına karşılık ve bulunan akrilamid miktarları ile geri kazanım yüzdeleri.....	55
Tablo 4.5. LOD ve LOQ çalışmaları.....	64
Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlar için performans kriterleri.....	65
Tablo 4.7. Tekraredilebilirlik sonuçları, galeta (rusk) numunesi ($2,08 \times 10^{-7}$ M).....	66
Tablo 4.8. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları.....	67
Tablo 5.1. Akrilamidin UV-spektrofotometrik analizine ilişkin veriler.....	73
Tablo 5.2. Akrilamid miktarı bilinen galeta (rusk) matriksine akrilamid ilavesi çalışması sonuçları.....	82
Tablo 5.3. Akrilamid miktarı bilinen ($2,08 \times 10^{-7}$ M) galeta (rusk) örneğine spike edilerek tekrarlanabilirlik çalışması.....	83
Tablo 5.4. Tekrarlanabilirlik için yapılan analiz sonuçları kullanılarak elde edilen geri alma oranları.....	84
Tablo 5.5. AOAC guidelines for dietary supplements and botanicals kaynağına göre farklı konsantrasyonlar için performans kriterleri.....	85
Tablo 5.6. Tost ekmeği ve gevrek için sonuçlar.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Akrilamidin molekül yapısının gösterimi.....	1
Şekil 2.1. Voltametre hücresi ve voltametrik ölçme sistemi	13
Şekil 2.2. Bazı voltametrik mikroelettrot tipleri: (a) disk elettrot(b) asılı civa damla elettrot (c) civa damla elettrot (d) statik civa damla elettrot	14
Şekil 2.3. Voltametrizde kullanılan elettrotlarının sınıflandırılması	15
Şekil 2.4. Damla ömrü süresince Faradaik ve kapasitif akım değişimi.....	25
Şekil 2.5. Normal puls polarografisinde potansiyelin zamanla değişimi	25
Şekil 2.6. Diferansiyel puls polarografisinde potansiyelin zamanla değişimi.....	26
Şekil 2.7. Diferansiyel puls polarografisinde akım-potansiyel eğrisi.....	27
Şekil 2.8. Kare dalga voltametrisi a) Potansiyelin zamanla değişimi b) Akım farkları ve katodik, anodik bileşenleri	28
Şekil 2.9. Civa damlalı elettrot ve hücreler	29
Şekil 2.10. Tipik bir voltametri hücresi.....	29
Şekil 2.11. Kadmiyum iyonunun polarogramı	31
Şekil 4.1. BAS100 model elektrokimyasal analizör	35
Şekil 4.2. Ag/AgCl (3M KCl) referans elettrot	36
Şekil 4.3. Platin elettrot	36
Şekil 4.4. Oksijence doymuş 0,1 M KCl çözeltisinin polarogramı, oksijenin peroksit ve oksit basamağına indirgenmesini gösterir.....	38
Şekil 4.5. Akrilamid elettrot reaksiyonu	39
Şekil 4.6. (-30 ile -100mV/s) arasındaki potansiyel taraması.....	40
Şekil 4.7. (-100 ile – 2750mV/s) arasındaki potansiyel taraması	40
Şekil 4.8. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki ($v^{1/2}$) - (I_p) grafiği	43
Şekil 4.9. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki logv- log I_p grafiği	43
Şekil 4.10. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki tarama hızına karşı pik potansiyeli grafiği	44
Şekil 4.11. $5 \cdot 10^{-5}$ M için pH taraması	45
Şekil 4.12. 3×10^{-5} M AA için başlangıç potansiyeli taraması	46
Şekil 4.13. 5×10^{-5} M AA için civa büyüklüğü taraması	46
Şekil 4.14. 3×10^{-5} M AA için destek elettrolit seçimi çalışması	47
Şekil 4.15. LiCl derişiminin pik akımına etkisi (1. Deneysel çalışma)	48

Şekil 4.16. LiCl derişiminin pik akımına etkisi (2. Deneysel çalışma)	49
Şekil 4.17. 3×10^{-5} M akrilamidin normal pulse polarogramı	50
Şekil 4.18. $2.8 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında OSWV tekniğı ile elde edilen voltamogram (Potansiyel aralığı -1,4V-2,1V, civa büyüklüğü 8).....	51
Şekil 4.19. $2.8 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiğı	52
Şekil 4.20. Ekstraksiyon şeması	53
Şekil 4.21. $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid çözeltisi üzerine 1×10^{-3} M'lık standarttan eklenmesi sonucu elde edilen voltamogramlar	54
Şekil 4.22. 1×10^{-5} M AA ve 1×10^{-5} M AA + numune voltamogramları	56
Şekil 4.23. 2×10^{-5} M AA ve 2×10^{-5} M AA + numune voltamogramlar	56
Şekil 4.24. 3×10^{-5} M AA ve 3×10^{-5} M AA + numune voltamogramları	57
Şekil 4.25. 4×10^{-5} M AA ve 4×10^{-5} M AA + numune voltamogramları	57
Şekil 4.26. 5×10^{-5} M AA ve 5×10^{-5} M AA + numune voltamogramları	58
Şekil 4.27. 6×10^{-5} M AA ve 6×10^{-5} M AA + numune voltamogramları	58
Şekil 4.28. Grubb testi formül	62
Şekil 4.29. Horrat formülü	63
Şekil 4.30. 1×10^{-5} M (0,71ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları	68
Şekil 4.31. 3×10^{-5} M (2,13ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları	68
Şekil 4.32. 6×10^{-5} M (4.26ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları	69
Şekil 5.1. Akrilamidin 190-400 nm aralığındaki UV-görünür bölgedeki spektrumu (1×10^{-5} M- 9×10^{-5} M)	72
Şekil 5.2. Akrilamid çözeltisi (1×10^{-5} M- 9×10^{-5}) için derişim-absorbans kalibrasyon grafiğı	72
Şekil 5.3. Ekstraksiyon ve temizleme işlemleri	75
Şekil 5.4. F_R-T_R grafiğı	78
Şekil 5.5. F_R-A grafiğı	79
Şekil 5.6. T-P grafiğı	80
Şekil 5.7. T- T_R grafiğı	80
Şekil 5.8. Kalibrasyon alanları ve eğrileri cihaz çıktısı	81
Şekil 5.9. Hesaplanan kalibrasyon doğrusu	82

Şekil. 5.10. Tost ekmeği numunesinin YPSK grafiği.....	86
Şekil 5.11. Gevrek (Crispbread) numunesinin YPSK grafiği	86

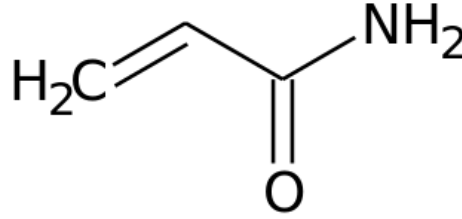
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

C	: Konsantrasyon
CAS	: Chemical Abstract Service (Kimyasal Özetler Servisi)
CV	: Dönüşümlü Voltametri
D	: Difüzyon katsayısı
DCE	: Damlayan Civa Elektrot
DKE	: Doygun Kalomel Elektrot
DME	: Damla Civa Elektrodu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPP	: Diferansiyel Puls Polarografisi
E	: Elektrot Potansiyeli
E	: Elektronun yükü
Eref	: Referans potansiyeli
FAO	: Gıda ve Tarım Organizasyonu
FSA	: Gıda Standartları Ajansı
GC	: Gaz Kromatografisi
HDME	: Asılı Civa Damla Elektrodu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
Id	: Ortalama difüzyon akımı
Ip	: Pik akımı
JIFSAN	: Gıda Güvenirliliği Enstitüsü
k	: Sabit katsayı
KOC	: Adsorpsiyon Katsayısı
LC	: Sıvı Kromatografisi
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
m	: Civa akış hızı
MFE	: Civa Film Elektrot
MS	: Kütle Spektrometresi
NPP	: Normal Puls Polarografisi
NOAEL	: Nörotoksik Etki

ODS	:Oktadesil silan
ORT	: Ortalama
OSWV	:Osteryoung Kare Dalga Voltametrisi
PVDF	:Poliviniliden florür
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
RSD	: Bağlı Standart Sapma
RSDr	: Tekrarlanabilirlik İçin İzin Verilen Bağlı Standart Sapma
RSDR	: Tekrarüretilebilirlik İçin Altındaki Bağlı Standart Sapma
SCE	: Doygun Kalomel Eletrot
SD	: Standart Sapma
SDME	: Durgun Civa Damla Elektrodu
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
SWV	: Kare Dalga Voltametrisi
td	: Durulma süresi
TMAB	: Tetra Butil Amonyum Bromür
TMAI	: Tetra Metil Amonyum İyodür
USA	: Amerika Birleşik Devletleri
v	: Tarama hızı
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
τ	: Bir pulsun bitiminden akımın ölçüldüğü ana dek geçen süre
τ'	: İki puls arasındaki zaman dilimi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Akrilamid insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen toksik bileşenlerden birisidir. 79-06-1 CAS numarasına sahip olan akrilamidin diğeri isimleri etilen karboksamid, propenoik asit amid, akrilik amid ve vinil amiddir. CAS adlandırması 2-propenamid şeklindedir ve $\text{CH}_2\text{-CHCONH}_2$ molekül formülüne sahiptir. Molekül ağırlığı 71,08 olan akrilamid, benzenden kristallendirilir ve oda sıcaklığında kokusuz, tatsız, beyaz renkli katı kristaller halinde bulunur. Bileşiminde %50,69 karbon, %7,09 hidrojen, %19,71 azot ve %22,51 oksijen elementlerini içerir. Hem zayıf asidik hem de zayıf bazik karaktere sahip olan akrilamidin iki ve üç boyutlu molekül şekilleri bulunmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Akrilamidin molekül yapısının gösterimi

Akrilamid'in bilim dünyasına girişı 1997 yılında İsveç'te gerçekleştirilen bir tünel inşaatı sırasında yaşananlara dayanmaktadır. Tünel duvarlarının inşaatı sırasında nehir yatağından kaynaklı su sızıntısını engellemek amacıyla, bağlayıcı harca su tutucu özelliğinden dolayı akrilamid katılmış ve bir süre sonra çevrede büyükbaş hayvan ve balık ölümleri görülmeye başlanmıştır. Bunun üzerine yapılan incelemede çevreye büyük miktarda akrilamid sızdığı ve bu sızıntının hayvan ölümlerine neden olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, yayılan akrilamidin çevrede yaşayan insanları ve inşaatı çalışan personeli de etkilediği düşünülmüş, yapılan analizlerde bireylerin kanında akrilamidin hemogloblin ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan bazı katılma ürünlerine rastlandığı rapor edilmiştir [1].

24 Nisan 2002 yılında İsviçre Ulusal Gıda Otoritesi ve Stokholm Üniversitesi ısıtım işlem görmüş karbonhidrat bakımından zengin besinlerin önemli ölçüde akrilamid içerdiklerini duyurmuşlardır [2]. Bu tespit daha önce hayvansal besinlerde de akrilamid bulunduğu yönündeki açıklamaları takip eden yeni bir tespit olmuştur. Bütün bu bulgular ışığında Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı akrilamidi 2A grubu "insan sağlığı için

olası kanserojen” olarak olarak sınıflandırmıştır. Ayrıca yüksek seviyelerde alındığında sinir sistemine zarar verdiğinin belirlenmesi, akrilamidin dünya çapında dikkat çekmesine neden olmuştur [2-4]. Özellikle karbonhidratça zengin besinlerde, örneğin yüksek sıcaklıklarda işlem görmüş patates kızartması ve patates cipslerinde, akrilamid oluşumu dikkat çekmiştir. Avrupa ve Amerika’da yapılan araştırmalar sonucunda 120⁰C’nin üzerindeki sıcaklıklarda pişirilen besinlerde oluşan akrilamid ve Gıda ve Tarım örgütü (FAO), Gıda Güvenirliliği Enstitüsü (JIFSAN) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da üzerinde dikkatle durulması gereken bir madde olarak sınıflandırılmıştır. Bütün bu gözlemlerden sonra pek çok araştırmacı tarafından akrilamide maruz kalma ile ilgili, akrilamidin besinlerde nasıl oluştuğu ve ne şekilde bulunduğu ile ilgili, ayrıca insan sağlığına karşı etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [2, 3, 5].

Akrilamid ile ilgili ilk başarılı çalışma, farklı guruplar tarafından eşzamanlı olarak yürütülen akrilamidin kompleks Maillard reaksiyonu ile, şeker ve asparajın miktarının düşmesi sonucu oluşum mekanizmasının aydınlatıldığı çalışmalar olmuştur. Daha sonra buna ek olarak, peptitlerden, proteinlerden ve biyojenik aminlerden oluşum mekanizmaları da aydınlatılmıştır [2].

1.1. Akrilamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Akrilamid, suda eriyen bir vinil monomeridir. Yapısında farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerde polar fonksiyonel gruplar içeren poliakrilamidlerin ve kopolimerlerin sentezinde kullanılmaktadır. Akrilamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Tablo 1.1)’de verilmiştir. Akrilamidin monomer ve polimer olmak üzere yapıları vardır.

1.1.1. Monomer

Otonom sinir sistemi üzerinde toksik etkiye neden olduğu, laboratuvar hayvanlarında yapılan deneylerde kanserojen etkileri tespit edildiği ve bu nedenle insanlar üzerinde de kanserojen özellikleri olabileceği düşünülmektedir. Akrilamidin bu formu araştırma laboratuvarlarında jel hazırlanmasında ve protein ayırma tekniklerinden biri olan elektroforez işleminde kullanılmaktadır.

1.1.2. Polimer

Polimer olarak akrilamid birçok alanda kullanılmaktadır. İçme suyu ve atık suların iyileştirilmesinde, zenginleştirilmiş petrolün geri kazanımında, kağıt, boya, kozmetik ve sabun, diş macunu gibi temizlik malzemeleri endüstrisinde, boya üretiminde, toprak düzenleyici ajan olarak, madenlerin işlenmesinde, katkı maddesi olarak, plastik üretiminde, kontak lens üretiminde, kimyasal ve çevresel bazı uygulamalarda kullanıldığı belirtilmiştir [6].

Tablo 1.1. Akrilamidin Kimyasal Yapısı ve Kimyasal/Fiziksel Özellikleri

Özellikleri	Veri	Kaynak
CAS No.	79-06-1	
Yaygın adlandırma	2-propenamid	Budavari ve ark. 1989
Molekül formülü	C ₃ H ₅ NO	
Kimyasal yapısı	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}-\text{NH}_2$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$	
Fiziksel durumu	katı kristal	Budavari ve ark. 1989
Molekül ağırlığı	71.08	Budavari ve ark. 1989
Erime noktası	84.5 °C	Budavari ve ark. 1989
Kaynama Noktası	125 °C	Budavari ve ark. 1989
Suda çözünürlüğü	2155 g/L at 30 °C	Budavari ve ark. 1989
Yoğunluğu	25 °C'de, 1.127	Budavari ve ark. 1989
Buhar Yoğunluğu (hava = 1)	2.46	Verschueren 1983
KOC	önemli miktarda adsorpsiyonu yok	HSDB 1994
Buhar basıncı	7 x 10 ⁻³ torr at 20 °C	ACGIH 1991
Reaktivite	Isıtıldığı zaman şiddetle Polimerize olur.	Keith ve Walters 1985
Parlama noktası	138 °C	Keith ve Walters 1985
Henry's Yasası sabiti	302 x 10 ⁻¹⁰ atm-m ³ /mol	HSDB 1994
Koku	kokusuz	Keith ve Walters 1985
Dönüşüm faktörleri	1 ppm = 2.95 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0.34 ppm	Verschueren 1983

1.2. Alınabilecek Akrilamid Miktarı

Farklı beslenme programları uygulanarak çeşitli gruplar üzerinde akrilamid alımı ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Hesaplanan ortamala akrilamid miktarı, yetişkinlerde vücut ağırlığı başına günlük ortalama 0,3-0,6 µg/kg iken çocuklar ve ergenlerin vücut ağırlıkları başına daha fazla akrilamid alımına eğilimli olarak beslendikleri belirlenmiştir (0,4-0,6 µg/kg). Bu durum çocuklar ve ergenlerin daha fazla oranda akrilamid içeren patates kızarması ve patates cipsleri gibi besinleri tüketmeleri ile açıklanabilir. Besinlerin yüksek akrilamid içerikleri ülkeden ülkeye geleneksel beslenme şekillerine ve yiyecekleri hazırlama metodlarına pişirme tekniklerine göre değişmektedir. Örneğin Almanya’da patates ürünleri, ekmek ve çörekler yaklaşık 240 g/gün gibi yüksek tüketim oranları nedeniyle alınan akrilamidin yaklaşık %25’ini oluşturur. Amerika’da yapılan Peterson ve Tran’ın çalışmasında, akrilamid miktarı çok olan besinlerin, günlük enerji alımının %38’ine, demir alımının %47’sine, folat alımının %42’sine denk geldiğini tespit etmişlerdir. Sigara içimi de akrilamid alımını 1-2 µg/sigara olarak arttırmaktadır [2].

1.3. Akrilamid’in Mekanizması

Polaritesi ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle besinlerde bulunan akrilamid hayvanlar ve insanlar tarafından kolaylıkla alınır ve vücutlarında dağılır. Ancak, büyük olasılıkla protein içerikli besinler gibi bazı karmaşık besin matriksleri ile akrilamidin etkileşimi bu durumun artmasına neden olmaktadır. Besin alındıktan sonra, kan yoluyla akrilamid bütün vücutta hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Timus, karaciğer, kalp, beyin, böbrekler ve hatta anne sütünde bile bulunabilmektedir [2].

Akrilamidin karaciğerde sitokrom (P450) yolu ile glutatyona bağlanması ve bunun yanı sıra glisidamide epoksidasyonu bu büyük ve önemli metabolik yolu açıklamaktadır. İlginç bir şekilde, toksikokinetik çalışmalar kandaki akrilamid seviyesinin düşmesinde daha önemli bir ikinci yol açıklamaktadır. Glisidamide oluşumu akrilamidin genotoksik etkilerinin oluşmasında önemli bir basamak olarak görülmektedir. Akrilamid ve glisidamide (ki daha yüksek oranda glisidamide) kandaki hemoglobin ve enzimler gibi makromoleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. Böylelikle akrilamidin epoksidasyonu sonucu oluşan glisidamid DNA ile reaksiyona girebilmekte ve genlerdeki mutasyona ve kanser oluşumuna neden olabilmektedir [2].

1.4. Akrilamidin Kanserojen Özelliği

Yapılan çalışmalar akrilamidin 2 önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Bunlar kanserojen etkisi ve nörotoksik etkisidir. Nörotoksik etki, yalnızca yüksek akrilamid seviyelerinde (NOAEL 0,5 mg/kg vücut ağırlığı ve günlük) görülebilir. Vücuda besinlerle bu oranda akrilamid almak mümkün görülmemektedir. Bununla beraber akrilamid ve akrilamidin metaboliti olan glisidamide'in kanserojik ve genotoksik etkileriyle ilgili önemli kanıtlar bulunmaktadır. Farelerde ve insan hücresinde yapılan hücre kültürü çalışmaları akrilamidin kromazomal kırılmaları teşvik ettiğini ve mutasyonlara neden olabildiğini göstermektedir. Bu kromazomal değişim özellikle adeninin guaninle, guaninin sitosin ile değişimi ile olmaktadır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, akrilamidin troid bezlerinde, testislerde, akciğerlerde ve beyinde tümörlere neden olabileceğini göstermektedir. Fischer sıçanları üzerinde yapılan çalışmalarda vücut ağırlığı başına 2mg'dan fazla miktarda akrilamid alındığında, tiroid bezlerinde merkezi sinir sisteminde, rahim bezlerinde ve diğer bezlerde tumor oluşumunun arttığı görülmüştür [2].

Akrilamidin ağızdan tek doz olarak alınması ile hayvanlar ve insanlar üzerinde sinir sistemlerinde zararlı etkilerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Özellikle bu toksik etki erkek deney hayvanlarında üreme organlarında ortaya çıkmıştır. Akrilamid için zararlı doz, gün içerisinde besinlerle alınan yaklaşık dozun (besinlerden alınan miktar 1-10 µg/kg/gün) 4-5 katı veya fazlasıdır [6].

Ancak hayvanlarla yapılan deneylerde yüksek oranda akrilamid kullanıldığı için, besinlerle alınan akrilamid miktarlarının bu sonuçları doğruladığını kesin olarak söylenemez. İnsanlardaki kanser riski üzerine de epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Mucci ve arkadaşlarının İsviçrede yaptıkları çalışma, yenilen gıdaların mesane, bağırsak ve böbrek kanserleri üzerinde kesin ve çok önemli bir etkisi olmadığını açığa çıkarmaktadır. Ancak aksini gösteren birçok detaylı çalışma açık kanıtlar sunsa da, akrilamid "insanlar için potansiyel kanserojen" olarak açıklanmıştır Bu nedenle besinlerdeki akrilamid seviyesi olabildiğinde düşük tutulmalıdır. Bu amaçla akrilamidin oluşum mekanizması açıklanmalı ve böylelikle uygun ölçüm yöntemleri geliştirilmelidir [2].

1.5. Akrilamidin Maillard Reaksiyonu ile Oluşumu

Akrilamidin oluşum mekanizmasıyla ilgili olarak ilk detaylı bilgi Zyzak ve arkadaşları ile Yaylayan ve arkadaşları tarafından verilmiştir [8]. Bu bilgiler Stadler ve arkadaşları ile Mottram ve arkadaşları tarafından belirtilmiş olan hipotezi doğrulamaktadır. Akrilamid, asparajin ve karbonil kaynağının (örneğin indirgen şekerlerin), Millard reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Dekarboksilasyon ve deaminasyon ile akrilamidin ısıl oluşum sürecinde asparajin önemli rol oynasa da, gerçekte asparajinin akrilamide dönüşümünde karbonhidratlar gereklidir. Teoride, α -hidroksi karbonil bileşikler olarak tanımlanan birçok karbonil bileşik bu reaksiyonun oluşumunu arttırır. Fruktoz ve glikoz ise aktivasyon enerjisi üzerindeki düşük etkilerinden dolayı diğerlerinden daha etkilidirler. Akrilamid oluşturma bakımından şekerler sıralandığında en fazla akrilamid oluşturan şekerin fruktoz, en düşük düzeyde akrilamid oluşturan şekerin ise sakkaroz olduğu tespit edilmiştir. Ancak millard reaksiyonundaki glioksal gibi şeker parçalanma ürünlerinin de bu reaksiyonlar üzerinde önemli ölçüde payları vardır. Akrilamidin maillard reaksiyonu ile oluşumunda ilk basamak, Schiff baz oluşumu olup, bu oluşum Amadori ürünlerinin dekarboksilasyonuna alternatif düşük enerji sağlamaktadır. Akrilamid oluşumunda birinci yol; Schiff bazının parçalanmasıyla 3-aminopropionamid'in hidrolize olması ve buradan da akrilamidin oluşması iken, ikinci yol ise aradaki 1-2 oluşum elimine edilerek Schiff bazından direkt akrilamidin oluşmasıdır [2, 9].

1.6. Akrilamidin Diğer Yöntemlerle Oluşumu

Akrilamidin gıdalarda oluşumu ile ilgili öncelikli olarak Millard reaksiyonu ile açıklansa da birçok başka mekanizma da rapor edilmiştir. Yağların yüksek sıcaklıklara ısıtılmasıyla gliserolün dehidratasyonu sonucu akrolein ve akrilik asitten oluşabilmektedir. Akrilamid amonyak ile birlikte aminoasitlerin indirgenmesinden de oluşabilmektedir [10]. Ancak amonyum tuzları, yağlar ve akrolein ile yapılan deneyler gıdalarda akrilamid oluşumunun, bu mekanizmalara bağlı olamayacağını gösteren çalışmalar da vardır.

Asparajinden akrilamidin oluşumunda 3-aminopropionamide geçici bir ara ürün olarak görülse de, asparajinin enzimatik dekarboksilasyonu sonucu da ortaya çıkmaktadır ve belirli reaksiyon koşulları altında akrilamidin oluşum reaksiyonunda önemli bir ara maddedir. Bu yol izinin, gıdalara uygulanan işlem sırasında toplam akrilamid oluşumuna katkısı halen açıklama gerektirmektedir [8].

Yaylayan ve arkadaşları ısıtılan etlerde akrilamidin dipeptit karnosinden oluştuğunu açıklamışlardır. Bu peptit aminoasitlerin Strecker sentezi sonucunda β -alaninne hidroliz olur. Buğday gluteni ve gluten ilaveli buğday ekmeği ruloları için tarafından da peptitlerin kullanıldığı benzer bir oluşum mekanizması açıklanmıştır [11]. Bu açıklama Claus ve arkadaşları tarafından da doğrulanmıştır [2].

Akrilamid ilk kez C. Maurea tarafından 1893 yılında 10 °C da akril klorürün doymuş benzen çözeltisine yavaş yavaş kuru amonyak eklenerek kaynatıldıktan sonra süzülerek amonyum klorürün uzaklaştırılması ve soğutularak akrilamidin çöktürülmesi yolu ile hazırlanmıştır.

Akrilamidin nörotoksik etkisi ilk kez bundan 30 yıl önce laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneylerle tespit edilmiştir. Son yıllarda genotoksik ve kanserojen etkisi de belirlenmiştir. Akrilamid bazik veya asidik ortamda hidrolizlenerek karboksilli asitlere, amonyak veya aminlere dönüşür.

Akrilamid oluşumu pişirme işlemi uygulanmamış gıdalarda görülmez. Düşük sıcaklıklarda pişirilmiş gıdalarda ise; çok düşük veya tespit edilemeyen değerlerde oluşur. Akrilamid genellikle 120 °C ve üzeri sıcaklıklarda pişirilen gıdalarda, pişirme sırasında yan ürün olarak meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalara göre; akrilamid oluşumu genellikle patates ve tahıllar gibi yüksek miktarda karbonhidrat içeren gıdalara uygulanan ısıtılımlar sırasında ortaya çıkmaktadır.

Gıda maddelerinde akrilamid varlığının tespit edilmesi, özellikle son on yılda dikkatleri beslenme ve insan sağlığı ilişkisine yoğunlaştıran, konu ile ilgili endüstriyel üretim standartlarına ve kalite kontrol yaklaşımlarına farklı bakış açıları ve uygulamalar getiren, aynı zamanda WHO ve FAO gibi örgütlerin de öncelikli olarak ele aldığı konulardan biridir [12].

Akrilamid, 1950'li yıllardan beri endüstrinin pek çok dalında kullanılmaktadır. İnsan yaşamına etki eden yönünün ortaya çıkması ise konunun çok boyutlu olarak yeniden ele alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Beslenme yönünden ele alındığında akrilamid, pişirilmiş besin maddelerinin büyük bir çoğunluğunda meydana gelebilen, çeşitli mekanizmalarla nörotoksik ve karsinojenik etkiler gösterebilen ve Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı tarafından 2A kategorisinde değerlendirilerek "İnsanlar için olası kanserojen madde" olarak tanımlanmış bir maddedir [3].

Akrilamidin insan vücuduna etkileri kısa ve uzun süreli olarak tanımlanmıştır. Bu bulgular insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Maksimum Kontaminant Seviyesi'nin

üstünde kısa için maruz kalındığında, halsizlik, sinir sisteminde hasar ve bacaklarda koordinasyon bozukluklarına neden olabileceği açıklanmıştır. Kişi hayatı boyunca maruz kalınması durumunda ise, kanser, sinir sisteminde ciddi hasarlar ve felç gibi önemli hastalıklarla karşı karşıya kalabilir. Karsinojen özellikleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, meme bezlerinde, tiroid bezinde, üreme organlarında, ağızda, beyinde ve omurilik sapında çeşitli tipte kanserlere sebep olabileceği belirlenmiştir.

Akrilamidin gıda maddelerinde oluşum yolları ile ilgili olarak birçok araştırma yapılmıştır ve hala da yapılmaktadır. Stockholm Üniversitesi'nden bir grup araştırmacı yaptıkları çalışmada akrilamidin nişastaca zengin besinlerde ortaya çıktığını bulmuşlardır. Nisan 2002'de İsveç Ulusal Gıda Enstitüsü ve Stockholm Üniversitesi çeşitli ısıtılmalardan geçmiş olan gıdalarda akrilamid saptandığını açıklamışlardır [13]. Yapılan birçok çalışma, akrilamidin temel gıda hammaddeleri de dahil olmak üzere birçok gıda maddesinde bol miktarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada, hemoglobine bağlanan akrilamid katılma ürünü miktarının, pişmiş yemlerle beslenen sıçanlarda, pişmemiş yemlerle beslenen sıçanlara göre fark edilir ölçüde artış gösterdiği saptanmış ve pişirilen yiyeceklerin akrilamid içerdiği görüşü ortaya atılmıştır [14]. Eş zamanlı yapılan bazı çalışmalarda ise akrilamid ile çalışan kişilerdeki maruziyetin $80\text{--}100\ \mu\text{g.gün}^{-1}$ değerine kadar yükselebildiği rapor edilmiştir [7, 15]. Sonuçta bu bulgular da IARC tarafından 2A kategorisinde değerlendirilen akrilamid ile ilgili endişeleri üst düzeye çıkarmıştır. 2002 yılında yapılan bir çalışmada ise yüksek sıcaklığa maruz bırakılan bazı gıdaların yüksek miktarda akrilamid içerdiği tespit edilmiş ve bu tespit başta İsveç, İngiltere, Norveç, İsviçre, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere birçok ülkenin resmi gıda komisyonları tarafından da onaylanmıştır [16, 17].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda, arasında nişastalı ürünlerin (mısır ve patates gevrekleri, tost ekmeği, patates kızartması, kraker, bisküvi, cips gibi) pişirme işlemleri sonrasında yapılarında en fazla miktarda akrilamid oluşan gıdalar oldukları tespit edilmiştir. Gıda Standartları Ajansı (FSA) araştırmacılar tarafında yapılan analiz sonuçlarına göre, ön pişirme işlemi uygulanmış, paketlenmiş ürünlerde, cipslerde, özellikle patatesten hazırlanan ürünlerde akrilamid yüksek oranda akrilamid olduğunu açıklamıştır. Günümüzde, gıdalardaki akrilamid miktarlarının tespit edilmesi oldukça önemli bir konu haline gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı karsinogen özellik taşıyan akrilamid maddesinin bazı gıdalardaki düzeylerinin, başta polarografik yöntem olmak üzere gerekirse diğer analitik yöntemlerle araştırılmasıdır.

Çalışmaların sonucunda geliştirilen analiz yöntemleri, ülkemizde gıda endüstrisi alanında üretim yapan kuruluşların kolaylıkla uygulayabileceği nitelikte, analiz araç ve gereçleri ucuz, doğru ve kesin sonuçlar veren bir yöntem özelliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Voltametri

Voltametri, bir elektrot ile çevresinde bulunan ortamdaki iyon, atom ya da moleküller arasındaki elektron aktarımının incelendiği elektroanalitik yöntemler grubudur [18]. Akım-voltaj-derişim ilişkilerinin araştırıldığı elektroanalitik yöntemlere voltametri denir. Voltametri sözcüğü, volt ‘‘amper’’ ve ölçüm anlamına gelen ‘‘metri’’ kelimelerinin bir araya gelmesi sonucu oluşmuştur. Voltametrizde, polarize olabilen yani polarlanabilen ve polarize olmayan yani polarlanmayan iki elektrot arasına pozitif ya da negatif yönde gittikçe artan bir potansiyel uygulanmaktadır. Sistemde, zamanla artan potansiyele karşılık gelen akım değerleri ölçülmektedir. Elektroaktif maddenin miktarı ölçülen bu akım değerleri ile orantılıdır. Bir başka deyişle, $I = f(E)$ eğrileri çizilerek akım, potansiyel ve elektroaktif maddenin derişimi arasındaki ilişkiyi araştıran bilim dalına voltametri denir. Analizler sonucunda ortaya çıkan, akım–potansiyel eğrilerine ise voltamogram denir [19].

Voltametri, uygulanan voltaja karşı akımın ölçülmesi işlemidir. Voltametrizde polarize olabilen bir çalışma elektrotu kullanılarak akım, uygulanan gerilimin fonksiyonu olarak ölçülür. Buna bağlı olarak yükseltgenebilen ve/ya da indirgenebilen (elektrot tepkimesine giren, elektroaktif) anorganik, organik ve metaloorganik maddelerin elektrokimyasal davranışları incelenir ve değerlendirilir. Voltametrik yöntemlerin performansı büyük ölçüde çalışma elektrodu materyaline bağlıdır [18, 20].

Voltametrinin gelişimi, 1920’li yıllarda Çekoslovak kimyacı Heyrovski tarafından bulunan ve bu tekniğin özel bir tipi olan ‘‘polarografi’’ ile başlamıştır. Voltametri’nin önemli dalı olan polarografiyi diğer voltametrik tekniklerden ayıran özellik çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrotun kullanılmasıdır. Kılcal bir boru haznesinden akararak zamanla büyüyen ve belli bir büyüklüğe ulaştığında koparak düşen bir civa

damlası temelli olan bu mikroelettrodun voltametrinde kullanılan diğ er çalışma elektrotlarına üstünlüklerinden biri, cıvanın hidrojen iyonunun indirgenmesine karşı g sterdiğı yüksek aşırı gerilimdir. Bu nedenle bağıl olarak büyük negatif gerilimlerde kullanılabilir olmasından dolayı birçok indirgenme tepkimesinin incelenmesine olanak sağılar. Bir diğ er üstünlüğü ise, herbir cıva damlası ile yeni bir metal yüzeyi yaratılıyor olmasıdır. Deney süresince elektrot yüzeyinde adsorplanmış veya birikmiş safsızlıklar olmayacağından son derece düzenli ve tekraredilebilir bir davranış sergiler.    nc   st nl ğ , herhangi bir gerilimde anında tekrarlanabilir akımlar oluşturmasıdır. Bir başka üstünlüğü ise boyutları küçük olduğından mikro hücreler ile düşük hacimlerin çalışılabilir olmasına olanak sağılamasıdır [19]. Buna karşılık cıva elektrotun kullanımında bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Metalik cıva yaklaşık +0.4 V'dan daha yüksek gerilimlerde kolaylıkla yükseltgenerek çözündüğünden yükseltgenmeye dayalı tepkimelerde kullanılamamaktadır. Ayrıca kullanılan cıvanın temizlenmesi, damlama süresini ayarlamanın zorluğı, cıvanın damlatılmasında kullanılan kılcalların tıkanması, cıva buharlarının sağığa zararlı olması, tekniğ n direkt olarak dokuya uygulanamaması bu elektrodun polarografik kullanımındaki sakıncaları oluşurmaktadır [19].

Voltametri yöntemi, indirgenebilen, yükseltgenebilen maddelere uygulanabildiğı gibi bir kimyasal reaksiyon ile indirgenen veya yükseltgenen böylece başka yapıya dönüşebilen, organik, inorganik, iyonik veya moleküler maddelere uygulanabilir. Voltametri ile Pd, Cd, Cu, Zn, Hg, As gibi metal iyonlarının, Ni ve Co gibi bir ligand ile kompleks oluşturarak elektrot yüzeyine adsorplanabilen metal iyonlarının; S^{2-} , CN^- , Cl^- , F^- gibi anyonların; IO_3^- , NO_2^- , SCN^- , $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} ve SO_2 gibi inorganik bileşiklerin; aromatikler, peroksitler, eterler, nitroaromatikler, aminler, heterosiklik aminler, fenoller, alifatik halojenler, kinonlar, karboksilli asitler, dienler, asetilen gibi organik bileşiklerin analizi yapılmaktadır. Ayrıca Cr(III)/Cr(VI), Au(I)/Au(III) ve Fe(II)/Fe(III) gibi elementlerin yükseltgenme basamakları incelenmekte ve bu basamaklardan yararlanarak t rleme çalışmaları yapılabilmektedir [21]. Voltametrik ve polarografik yöntemlere, element analizinin yanı sıra, çözünürlük, kompleks oluşumu, hidroliz, adsorpsiyon, kimyasal reaksiyonların stokiyometrik ve kinetik incelemelerinde ve ilaç etken maddeleriyle ilgili çalışmalarda ve elektrot reaksiyonlarının mekanizmalarının aydınlatılmasında başvurulmaktadır.

2.1.1. Voltametricde akımlar

Voltametric bir yöntemde, belli bir potansiyel uygulandığında elektrot yüzeyinde, $O + ne \rightarrow R$ tepkimesine göre, O ile gösterilen çözelti içindeki yükseltgenmiş tür, n sayıda elektron alarak, R ile gösterilen yüzeyde indirgenmiş türü meydana getirir. Potansiyel negatife doğru taranırsa elektrot yüzeyinde indirgenme başlar ve potansiyelin değişimine bağlı olarak derişim eğimi (gradienti) (dC/dx) hızla artar ve sınır akıma ulaşıldığında elektroda gelen aktif tür anında indirgenmeye uğrar. Bu durumda akım ancak difüzyonla taşınan madde miktarına bağlı olur. Bu nedenle bu akıma difüzyon kontrollü anlamında difüzyon akımı denir. Bunun dışında elektrot yüzeyinde elektroaktif tür bir kimyasal tepkime ile oluşuyor ve bu tepkimenin hızı elektrot tepkimesinin hızını belirliyorsa elde edilen akım kinetik kontrollü (kinetik akım, I_k) olur. Benzer şekilde adsorpsiyon akımından da söz edilebilir. Yukarıdaki redoks tepkimesi sonucu oluşan akıma, Faraday yasalarına uyumlu olduğu için faradaylık akım denir [22]. Elektroaktif bir madde içermeyen ve sadece çözücü ile iletkenliği sağlamak üzere eklenmiş destek elektroliti içeren bir çözeltide oluşan akıma artık akım denir. Artık akım, elektriksel çift tabakanın yüklenme akımı (kapasitif akım) ile çözeltide bulunan elektroaktif safsızlıkların meydana getirdiği akımın toplamıdır. Civa damla elektrodu çalışma elektrodu olarak kullanıldığında oluşan akım,

$$I_d = 708,2 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t_d^{1/6} \cdot C \quad (2.1)$$

ilkoviç Denklem 2.1 ile vermiştir. Burada m, civanın mg/s cinsinden kapilerden akış hızı; C, mM cinsinden derişim; D, difüzyon katsayısı; t, civanın kapilerden akış süresi ve d; difüzyon akımıdır [23].

Deneyler aynı cihaz ve sabit şartlarda yapılırsa, derişimden başka bütün değişkenler sabit hale gelir ve Denklem 2.2 haline gelir.

$$I_d = k \cdot C \quad (2.2)$$

Polarografide nicel analiz için aşağıdaki yöntemler kullanılır;

- Doğrudan karşılaştırma
- Standart ilave yöntemi
- Kalibrasyon grafiği yöntemi
- İç standart ilave yöntemi

Elektrot yüzeyinde elektroaktif maddenin kütle taşınımı, elektrot tepkimesi nedeniyle, çözelti içinde derişimin yüksek olduğu yönden, derişimin düşük olduğu elektrot yüzeyine doğru kendiliğinden hareketle oluyorsa buna difüzyon ile taşınım denir. Kütle taşınımı için çözeltiyi karıştırma veya elektrodu döndürme gibi fiziksel bir hareketle taşınım sağlanıyorsa buna konveksiyon ile taşınım denir. Eğer, meydana gelen elektriksel alanın etkisi ile yüklü tanecikler, zıt yüklü kutba doğru çekiliyorsa, bu ise migrasyonla taşınım şeklinde adlandırılır [22]. Elektrot akımı ise bu taşınıma göre difüzyon akımı, konveksiyon akımı ve migrasyon akımı olarak adlandırılır. Difüzyon akımı, çözelti içerisindeki elektroaktif tür miktarı ile ilişkiliyken, konveksiyon ve migrasyon akımları ile elektroaktif tür miktarı arasında herhangi bir ilişki yoktur. Çözeltinin karıştırılmadığı ve sıcaklık farkının olmadığı durumda konveksiyonla taşınım söz konusu değildir. Eğer çözelti içine elektroaktif türün miktarından çok yüksek miktarda başka bir çözelti katılırsa, elektriksel alanda zıt kutba doğru bu iyonlar hareket edeceğinden elektroaktif türün migrasyonla taşınımı söz konusu olamaz.

2.1.2. Voltametri cihazı ve elektrotlar

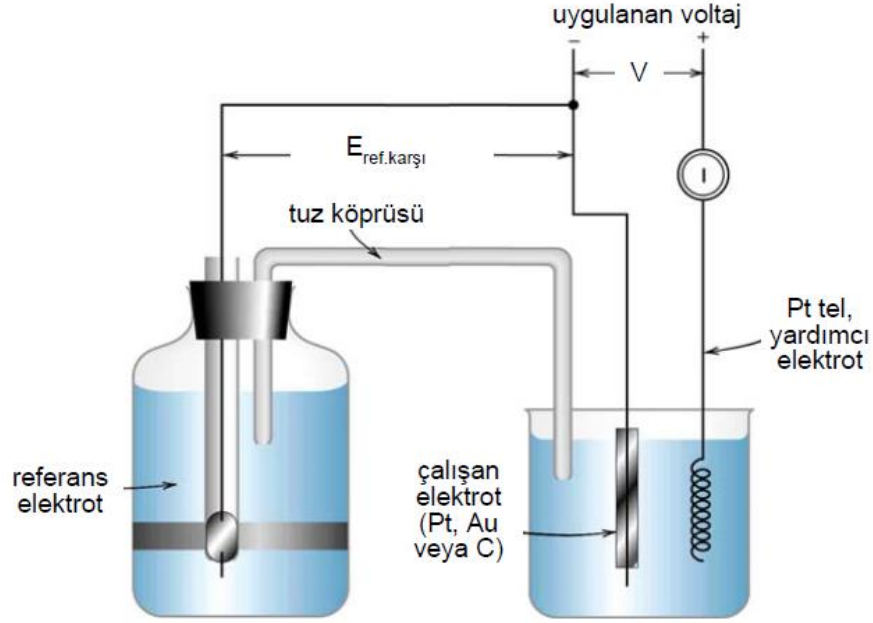
Voltametri işlemi, bir elektrokimyasal hücre içerisinde, polarlanan bir çalışma (indikatör) elektrotu ile polarlanmayan karşılaştırma (referans) elektrot arasında potansiyel uygulanması temeline dayanır. Uygulanan potansiyelin değerinin zamanla değişmesi sonucunda, üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile yardımcı (karşıt) elektrot arasındaki akım ölçülürken, iki elektrotlu hücrelerde ise çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasındaki akım ölçülmektedir [20, 24].

Voltametrik İşlemler kuartz, cam veya teflon hücrelerde yapılır. Hücrelerin yapıldığı malzemeler özellikle kirlenme ve yüzeye adsorpsiyon riskinin en az olduğu malzemelerden seçilmelidir.

Destek Elektrolit iyonik göçün tamamını üstlenebilen elektrolittir. Voltametrik işlem sırasında elde edilen akımın yalnızca difüzyon kontrollü olmasını sağlamak için ortama destek elektrolit eklenebilir. Bu amaçla ortama, KCl, KNO₃ gibi bir inorganik tuz, bir mineral asidi veya baz katılabilir. Sitrik asit/sitrat veya asetik asit/asetat gibi tampon sistemleri de pH kontrolünün gerektiği konularda destek elektrolit olarak kullanılabilir [25].

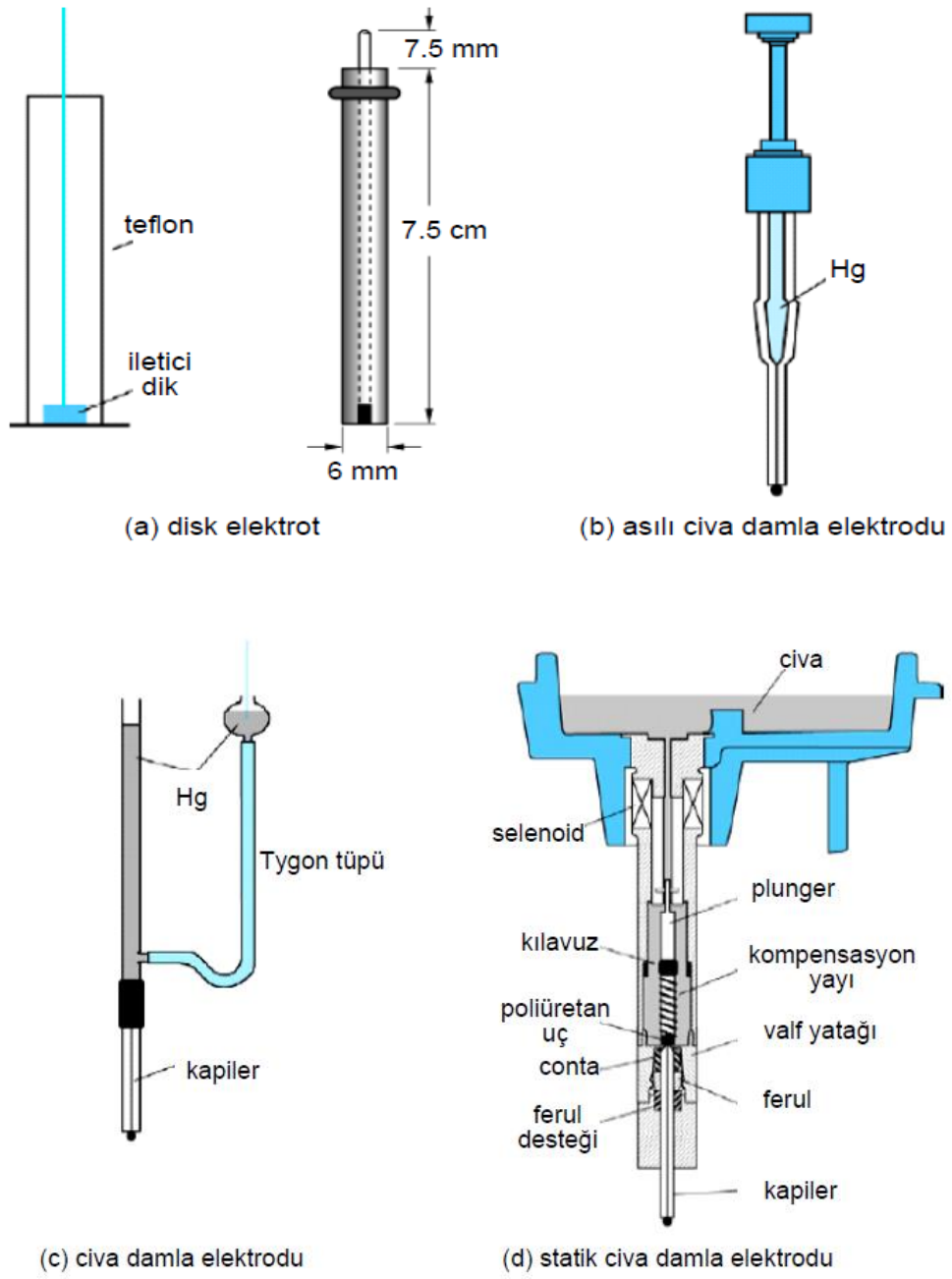
Aşağıda tipik bir voltametre hücresi ve voltametrik ölçme sistemi görülmektedir (Şekil 2.1). Sistemde bir mikro çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir yardımcı

(karşıt) elektrot bulunur (Şekil 2.2). Çalışma ve referans (karşılaştırma) elektrotlar arasındaki voltaj değiştirilirken, çalışma ve yardımcı (karşıt) elektrotlar arasından geçen, akım ölçülür.

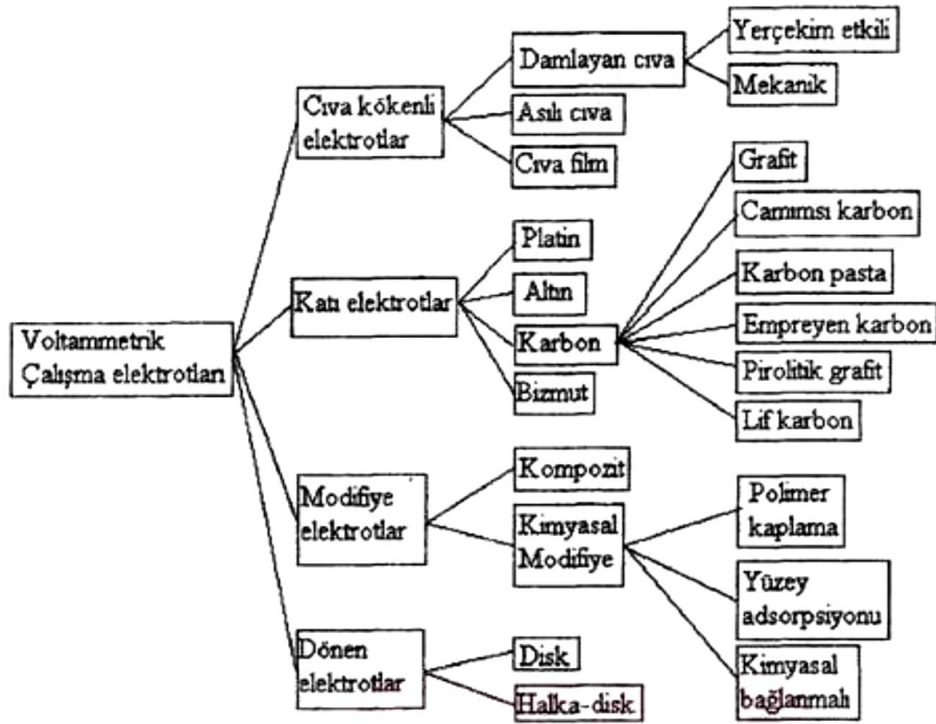


Şekil 2.1. Voltametre hücresi ve voltametrik ölçme sistemi [26]

Voltametrizde çalışma elektrotu olarak; altın, civa, platin, , grafit, bizmut, camimsi karbon, lif karbon, pirolitik karbon ve modifiye elektrotlar kullanılmaktadır. Voltametrizde kullanılan elektrot türlerinin sınıflandırılması aşağıda görülmektedir (Şekil 2.3). Polarlanmanın sağlanabilmesi için, voltametrik işlemlerde seçilen çalışma elektrotları küçük yüzey alanına sahip olması gerekmektedir. Küçük yüzey alanına sahip bu elektrotlara mikro elektrotlar denir. Mikro elektrotların kullanılması sonucunda örnekteki elektroaktif türlerin çok küçük bir miktarı elektrokimyasal tepkimeye girer. Böylece örneğin bileşimi hemen hemen aynı kalır. Bunun sonucunda aynı örneğin defalarca voltamogramı alınabilir.



Şekil 2.2. Bazı voltametrik mikroeletrot tipleri: (a) disk elektrot (b) asılı civa damla elektrot (c) civa damla elektrot (d) statik civa damla elektrot [19]



Şekil 2.3. Voltammetride kullanılan elektrotlarının sınıflandırılması [27]

2.1.2.1. Cıva kökenli elektrotlar

Cıva kökenli elektrotların kullanılmasının birçok avantajı vardır. Bu avantajlar; cıva elektrodunun negatif potansiyellerde ve çok geniş potansiyel aralığında kullanılabilmesi, önceki çalışmalardan cıva yüzeyinde kalan safsızlıkların sürekli yeni bir yüzey oluşturabilmesiyle giderilmesi, tekrarlanabilir cıva damlalarının oluşması sonucu tekrarlanabilir akımların elde edilmesi ve birçok metalin cıva yüzeyinde indirgenerek cıva ile amalgam oluşturabilmesi olarak sıralanabilir. Bu nedenle elektrot olarak genellikle cıva kökenli elektrotlar tercih edilmektedir. Bu elektrotların dezavantajları ise, cıvanın kolayca yükseltgenmesinden dolayı anodik sınırın küçük olması ve cıva film elektrodu dışında cıvanın sağlık üzerine olan etkisidir. Asılı cıva damla elektrodu, damlayan cıva elektrodu, durgun cıva damla elektrodu ve cıva film elektrot gibi çeşitleri vardır [27].

2.1.2.1.1. Damlayan cıva elektrodu (DME)

Cıvanın analiz süresince cıva haznesinden akması ile çalışan bir elektrottur. Cıva akış hızı, cıva haznesinin yüksekliğini değiştirerek yer çekimi etkisi ile veya manyetik etki ile kontrol edilen bir iğne aracılığıyla mekanik olarak ayarlanır. Akış hızı mekanik

olarak kontrol edildiğinde civa damlasının düşürülmesi mekanik bir çekiç aracılığıyla yapılır. Damlayan civa elektrodunda akım, civa damlasının büyümesinden düşmesine kadar sürekli olarak ölçülür [27].

2.1.2.1.2. Durgun civa damla elektrodu (SDME)

Bu elektrotlar, bir vida düzeneği ya da bir iğne yardımıyla, civa haznesine bağlı bir kapilerden akan civa damlasının, kapilerin ucunda belirli bir süre tutulduğu elektrottur. Her yeni damlada bir kez civa damlasının durgun olarak tutulduğu anda ölçüm alınarak polarogramlar elde edilir [27].

2.1.2.1.3. Asılı civa damla elektrodu (HDME)

HDME elektrotlar, voltametri düzeneğindeki civa haznesine bağlanan bir kapiler kılcal borudan çözeltiye inen civa damlasının bir vida sistemi veya bir iğne yardımı ile kapilerin ucunda asılı bir şekilde tutulu kaldığı elektrotlara verilen isimdir. Bu elektrotlarda tüm işlem tek bir civa damlası kullanılarak tamamlanmaktadır. Böylece civa yüzeyi, daha önceki çalışmalarda civa yüzeyine adsorplanan maddelerden ve diğer elektrot kirliliklerinden arındırılmış olur.

2.1.2.1.4. Civa film elektrot (MFE)

Camımsı karbon, platin, grafit, gümüş, altın gibi inert malzemeden oluşan disk veya tel şeklindeki destek üzerine 1-100 µm kalınlığında ince bir civa film kaplanmasıyla meydana getirilen elektrolitlerdir. Civa film elektrot iki şekilde oluşturulur.

Elektro kaplama ile civa filminin oluşturulması

Farklı derişimlerde çözünen civa (II) tuzlarından çıkılarak elektrokaplama yapılarak hazırlanır. Öncelikle elektrot yüzeyi Al_2O_3 ile parlatılır. Daha sonra saf su ile yıkanır. Ortam dışı çalışmalarda 25-50 mg/L civa (II) içeren asitli çözeltilerde, doymuş kalomel elektroda (DKE) karşı basamaklı olarak -0,5 volttan başlanarak -0,6, -0,7, -0,8 ve -0,9 V'da otuzar saniye, -1 V'ta 120 saniye elektroliz yapılarak kaplama yapılır. Ortam içi çalışmalarda ise 1-5 mg/L arasında derişime sahip civa (II) tuzu ile DKE'a karşı -0,9 V'da 120 saniye süreyle elektroliz yapılarak kaplama gerçekleştirilir.

Amalgam yoluyla civa filminin oluşturulması

Civa ile amalgam oluşturabilen bir inert maddenin civaya daldırılmasıyla oluşturulur. Elektroaktif tür damlayan civa elektrodunda damlanın iç kısmına difüzlenerik piklerin yayvanlaşmasına neden olurken, civa film elektrotta ise bu olay olmadığı için pikler daha güzel ayrılmıştır ve daha keskin pikler elde edilir. Ayrıca çalışılırken meydana gelebilecek kazalardan dolayı, civanın etrafa saçılması gibi bir durum da söz konusu değildir. Civa filminin yüzeyin düzgün olarak elde edilememesi ve aynı kalınlıkta oluşturulamaması gibi dezavantajları vardır. Oldukça ince civa filmi için filmdeki difüzyon ihmal edilir ve pik akımı doğrudan potansiyel tarama hızı ile orantılı olur. Yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmasından dolayı bu elektrotta asılı civa damla elektrotuna göre daha fazla duyarlılık sağlamaktadır.

2.1.2.2. Katı elektrotlar

Katı elektrotlar; metalden oluşan elektrotlar (platin, altın); bir katı elektrot üzerine kaplanmış film elektrotlar veya karbon kökenli (bor karbür, grafit, camımsı karbon, gömme karbon, pirolitik grafit ve karbon pasta) elektrotlardır.

Platin ve altın elektrotlar yüksek saflıktaki metallerinden yapılır. Platin ve altın elektrot doğrudan kullanıldığı gibi, yüzeyi değişik kimyasal işlemlerden geçirilerek (modifiye edilerek) de kullanılır.

Karbon elektrotlar oldukça iyi tekrarlanabilir yüzey yapısına sahiptirler. Ayrıca tercih edilmelerinin nedenleri düşük elektriksel dirence, düşük artık akıma, geniş bir anodik potansiyel aralığına sahip olması olarak sıralanabilir. Bazı polimerler ortalama 1800°C’de ısı olarak bozundurulur camımsı karbon elektrotlar elde edilir. Bu elektrotların yüzey temizliği ve yapımları kolaydır. Düşük zemin akımına sahiptirler. Yapıları serttir bu sayede her çalışma öncesi yüzeyi parlatılabilir

Karbon pasta elektrot, toz grafit ile nujol gibi bir organik sıvının belli oranlarda oldukça iyi bir şekilde karıştırılması ile elde edilir. Oluşan ürün bir pasta şeklindedir. Bu pasta platin veya bakırdan cam boru içerisine hava kalmayacak şekilde doldurulur, böylelikle elektriksel bağlantıyı oluşturması sağlanır. Bu elektrotlar geniş potansiyel aralığında çalışmaya olanak sağlarlar. Bu elektrotlar daha çok modifiye edilerek kullanılmaktadırlar [27].

2.1.2.2.1. *Platin elektrot*

Direkt kullanıldıkları gibi yüzeyleri farklı kimyasal işlemlerden geçirilerek (modifiye edilerek) de elde edilebilen platin elektrotlar, voltametrik tekniklerde katı elektrot olarak en fazla kullanılan elektrotlardır [27].

2.1.2.2.2. *Altın elektrot*

Altın elektrot bazı çalışmalar için, belirli bir derişime kadar, oksijeni emmediğinden kimi çalışmalarda platine göre daha iyi bir elektrot malzemesidir. Ayrıca yüzeyi modifiye edilerek de kullanılmaktadır. Yüksek akım değerlerinde, 1 mol L⁻¹ HClO₄ çözeltisinde altın elektrodun anodik sınırı +1,5 V iken; düşük akım değerlerinde bu sınır +0,8 V' dur. Elektrotun anodik sınırı +0,8 V olduğunda elektrot yüzeyinde altın oksit meydana gelmektedir. Altın oksit oluşumu az da olsa bir akım meydana getirir. Bu nedenle küçük akım şartlarında göz ardı edilmemesi gerekir. Ortamda klorür olması durumunda ise, altın klorür ile kararlı kompleksler oluşturabilir ve bu nedenle anodik sınır +0,6 V değerine doğru kayar.

2.1.2.2.3. *Karbon elektrotlar*

Karbon elektrotlar ile hem indirgenme hem de yükseltgenme tepkimelerinde geniş bir potansiyel çalışma aralığında çalışılabilir (sulu ortamlarda ~ -1,8 V - +1,8 V). Yani bu elektrotla geniş bir çalışma aralığında çalışmak mümkündür. Düşük elektriksel direnç, düşük artık akıma, geniş bir anodik potansiyel aralığına ve tekrarlanabilir yüzey yapısına sahip olması gibi pek çok avantajı vardır. [27, 28]. Elektrokimyasal analizlerde, karbon pasta, karbon lif (fiber), karbon film ve camımsı karbon gibi farklı türlerde elektrotlar kullanılabilir.

Elmas

Elektrik akımını iletmez. Elektrokimya alanındaki kullanımı da metal yüzeylerin temizlenmesinde toz olarak kullanılmasıyla sınırlıdır.

Grafit elektrot

Bu elektrotlar doğal olarak oluşmaktadırlar. Elektrokimyasal işlemlerde oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Grafit, gözenekli ve yumuşak yapıda bir malzeme olduğundan adsorbsiyon kapasitesi oldukça yüksektir. Bu elektrotta; grafitin gözenekleri,

grafit çubuğun sıvılaştırılmış vaksa daldırılması ile doldurulur [18]. İlk olarak 1896 yılında, Achenson tarafından bulunan bir yöntem olan kimyasal temizleme yöntemi ile hazırlanır. Grafit elektrotun %5 - %20 arasında değişen kül içeriği, onun elektrokimyasal işlemlerdeki uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle çalışmalarda daha çok bu grafiti saflaştırıp kullanmaktanda yapay grafitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır.

Karbon pasta elektrot

Karbon pasta elektrotlar toz grafitin, nujol gibi organik bir sıvı ile karıştırılması yoluyla hazırlanmaktadır. Hazırlanan pasta daha sonra bir tüp (örneğin teflon tüp) içine sıkıştırılarak doldurulur. Elektriksel bağlantı için platin veya bakır bir tel kullanılır. Karbon pasta elektrotlar oldukça geniş bir potansiyel aralığına sahiptirler.

Bu elektrotların zemin akımları oldukça düşüktür. Yapımları ve yenilenmeleri kısa sürede alır. Çalışmalarda ön elektroliz işlemi uygulanarak, karbon pasta elektrot üzerinde absorplanan oksijen varsa giderilmelidir. Çünkü bu oksijenin indirgenmesi ile önemli miktarda bir artık akım oluşur [27].

Camsı karbon elektrot

Camsı karbon elektrot, 1962 yılında ilk defa inert bir gaz içerisinde fenol formaldehit reçinesinin çok dikkatli bir şekilde ısıtılması sonucu, Yamada ve Sato tarafından bulunan bir yöntemle hazırlanmıştır. Bu elektrotun yapısı diğer karbon yapılarından farklı fiziksel özellikler taşımaktadır. Camsı karbonun yapısının, gelişigüzel ve karışık şekilde yerleşmiş aromatik şerit moleküllerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Diğer karbon türlerine göre yüzeyinde daha ufak gözenekler bulunduğu için, daha çok tercih edilmektedir.

Diğer katı elektrotlarda olduğu gibi camsı karbon elektrotta da, elektrot aktivasyonunu sağlamak ve tekraredilebilir sonuçları elde edebilmek için parlatma, radyofrekans, düşük basınç altında sıcaklık uygulaması, kimyasal ve elektrokimyasal işlemler, vakum-sıcaklık uygulaması, metal oksit filmlerinin elektrot yüzeyinde kaplanması, lazer ışını ile uyarılma gibi ön işlemler yapılmalıdır. Aktivasyon işlemi incelenecek maddeye ve kullanılan çözeltiliye göre değiştiği için bu elektrotlarda henüz standart bir aktivasyon işlemi bulunmamıştır.

Empreyene karbon elektrotlar

Empreyene karbon, grafitin ile parafinin veya grafit ile uygun reçinelerin karıştırıldıktan sonra eritilmesi ve homojen hale getirilmesi ve bu işlemten sonra iletken metalik madde içeren bir tüpe doldurulmasıyla elde edilir.

Pirolitik grafit elektrot

Pirolitik grafit, metan gibi bir hidrokarbon içeren maddelerin 1200 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda ısı bozundurulması yani piroliz işlemi ile elde edilmektedir. Bu elektrodun asitli ortamda doygun kalomel elektroduna karşı çalışma potansiyel aralığı +1,00 V ile -0,80 V' dir. Mikro Karbon (Lif) Elektrotlar; daha çok mikroelektrot olarak kullanılan, yakın zamanda kullanılmaya başlanan elektrotlardır. Çapları 5-10 µm düzeyinde olan lif şeklindeki karbon telciklerdir. Daha çok kare dalga voltametrisinde kullanılır.

2.1.2.2.4. Bizmut elektrot

Civa elektrotu göre uçucu ve zehirli olmaması bakımından üstünlükleri vardır. Bizmut katodik bölgede de kullanılabilir. Çünkü hidrojen bizmut üzerinden çıkış potansiyeli yüksektir. Asetik asit/asetat tamponunda (pH= 4,7) -0,2 V ve -1,20 V potansiyel aralığına sahiptir [27].

2.1.2.3. Modifiye elektrotlar

Voltametriye kullanılan elektrotların çalışma koşullarının sınırlı olmasından dolayı elektrotların kimyasal ya da elektrokimyasal nitelikleri değiştirilerek modifiye elektrotlar geliştirilmiştir. Bu işlemler, elektrot yüzeyinde ön deriştirme sağlayan kimyasal maddelerle işlem ya da elektrot yüzeyinin elektron aktarma niteliğini değiştiren işlem (elektrokataliz) olarak sınıflandırılabilir.

Modifiye elektrotlar iki şekilde kullanılabilir. Birincisinde, analizi yapılacak bileşen ve destek elektrolitin bulunduğu hücre içinde önce biriktirme işlemi yapıldıktan sonra voltametrik analizin yapılır. İkicisinde ise, analizi yapılacak bileşene ön deriştirme yapıldıktan sonra, elektrot saf su ile yıkanıp, ayrı bir destek elektrolit ortamına aktarılır ve voltametrik analizin yapılır [27].

2.1.2.4. *Dönen disk ve halka disk elektrotlar*

Bu elektrotlar camsı karbon veya platinden üretilmiş olup, dönme hızları bir motor sistemi kontrol edilmektedir. Kimi zaman diğer katı elektrotlar doğrudan veya civa ile kaplanarak da kullanılabilir.

Bu bu tür elektrotlarla yapılan analizlerde duyarlık daha fazladır. Çünkü bu elektrotlarda elektroda madde taşınması konvektif difüzyonla gerçekleşmektedir ve böylelikle durgun elektrotlara göre daha büyük bir akım yoğunluğu sağlarlar. Halka-disk elektrotlar ise ortadaki diske belli bir mesafede ikinci bir elektrot içerirler: Bu elektrot ortadaki diskten elektriksel olarak yalıtılmıştır. Bu elektrot ikilisi ile disk elektrotta oluşan elektroaktif tür, elektrodun dönme hareketiyle halka elektroda doğru iletilir ve analiz gerçekleştirilir.

2.1.2.5. *Karşılaştırma (referans) elektrodu*

Voltametriye kullanılan bu elektrotların en önemli özelliği küçük akım şiddetlerinde polarlarize olmamalarıdır. Karşılaştırma (referans) elektrot olarak daha çok ikinci sınıf olan metal- metal iyonu elektrotları kullanılmaktadır. Günümüzde de en çok tercih edilen referans elektrotlar kalomel ve Ag/AgCl elektrotlardır. Akım şiddeti artınca ideal konumlarından saparlar. Bu elektrotların üzerinden anodik akım geçtiğinde metaller yükseltgenirler ve ortamdaki aşırı klorürle çökelirler. Bu sayede elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez böylelikle potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Bu elektrotların üzerinden katodik akım geçtiğinde ise, çözünürlükten gelen metal iyonları indirgenirler, elektrot yüzeyinde çökelek ayrılarak tekrar aynı denge düzeyinde metal iyonunu meydana getirir. Bu sayede elektrot potansiyeli yine aynı kalır. Asetonitril gibi sudan farklı çözücülerde çalışıldığında ise, uygun olabilecek Ag/Ag⁺ (Ag/AgNO₃) gibi farklı karşılaştırma elektrotları seçilmelidir.

2.1.2.6. *Yardımcı (karşıt) elektrot*

İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda polarlanır. Ayrıca çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel (IR) önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli hatalı okunabilir. Bunun sonucu olarak $I = f(E)$ eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan sonra pikler kaybolur. Bu sorun, sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot

ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir. Bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır. Bu elektrotların alanı çalışma elektrodu alanının en az 50 katı olmalıdır. Ayrıca çok küçük hacimlerle çalışıldığında yardımcı elektrotta oluşan ürünlerin, çalışma elektrodunda girişim yapmayacağı elektrot türü seçilmelidir.

2.1.2.7. Destek elektrolit

Çalışma ortamına ilave edilen destek elektrolitler elektroetkin olmayan elektrolitlerdir. Derişimi elektroetkin türün derişiminin 50 -100 katı olacak şekilde ortama ilave edilirler. Ortamda bulunan destek elektrolit kütle aktarımını büyük oranda üstlenir. Böylelikle de elektroetkin iyonun göç akımı yok sayılacak seviyeye düşürülebilir. Bu durum destek elektrolitin en önemli görevidir. Aynı zamanda destek elektrolit elektrokimyasal pilin iletkenliğini de sağlamaktadır. Direnci düşürür ve bu sayede ohmik düşmeden kaynaklanan sorunları minimuma indirir. Destek elektrolit oldukça saf olmalıdır. Aksi taktirde içeriğinde bulunabilecek elektroetkin safsızlıklardan dolayı artık akımı arttırma gibi bir dezavantajı olabilir. İçerebileceği safsızlıklar MnO_2 gibi adsorplayıcı katılarla veya ön elektroliz işlemleriyle azaltılabilir.

2.2. Polarografi

Polarografi, voltametrimin ilk bulunan ve kullanılan tipidir. 1920'lerin başında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından geliştirilmiştir ve bu buluşu nedeniyle 1959 yılında kimyada Nobel ödülü kazanmıştır. Geçmişte normal polarografi; biyolojik ve biyokimyasal önemi olan birçok madde de dahil olmak üzere çok sayıda inorganik ve organik türün kantitatif tayininde kullanılıyordu. Ancak 1960'larda spektroskopik yöntemlerin ortaya çıkması bu tekniğin geliştirilmesi zorunluluğunu getirmiştir. Yapılan birkaç temel gelişme sayesinde bu yöntemin duyarlılığı ve seçiciliği büyük oranda arttırılmıştır. Polarografi tekniği ile nitel ve nicel analizlerin yanı sıra, kinetik çalışmalar da yapılabilmektedir.

Polarografi tekniği voltametrik metotların özel bir tipidir. Voltametri bir indikatör ya da çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektroanalitik yöntemlere verilen isimdir. Genellikle polarizasyonu sağlamak için voltametrde çalışma elektrotları yüzey alanı pek

çok uygulamada birkaç milimetre kare ve bazılarında ise birkaç mikrometre olan mikroelettrotlardır. Polarografinin diğ er voltametrik tekniklerden en büyük farkı çalışma mikro elektrodu olarak damlayan civa elektrodun kullanılmasıdır.

Polarografide   l  elektrot sistemi kullanılır:

- Çalışma elektrodu olarak; damlayan civa elektrot (DCE)
- Referans elektrot olarak; doymuş kalomel elektrot (DKE) veya Ag /AgCl elektrot
- Karşıt elektrot olarak; platin elektrot

  l  elektrot sisteminde; potansiyel çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanır, akım ise çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında     l r. Böylece  alışma ile referans elektrot arasında akım     l mez. Çünkü referans elektrodun potansiyeli küçük akımlarda sabittir ancak akım arttığında potansiyel sabit kalmaz.   l  elektrot sisteminin kullanılması ile aynı sistemde hem gerilim uygulanabilir hem de oluşan akım     lebilir.

Polarografik yöntemlerle normalde her element tayin edilebilir. Yöntem ayrıca birkaç organik fonksiyonel grubun tayininde de kullanılabilir. Maddeler için polarografik davranışları ayırd edici özellikleri olduğu için, polarografik yöntemler seçiciliğin gerektiği analizlerde kullanılabilir. Polarografik analizlerin çoğu sulu çözeltelerde yapılır ancak bazı durumlarda çözelti karışımları da kullanılabilir. Miktar tayinlerinde tespit edilebilecek konsantrasyon aralığı 10^{-2} - 10^{-4} M'd r. Fakat daha düşük konsantrasyon seviyeleri (ppb)'de destek elektrolitinde yani çözeltide yapılacak bazı değişiklikler ile tespit edilebilir. Bir analizi 1-2 ml, hatta bir damla çözelti ile yapmak mümkündür. Bu nedenle polarograf miligramdan mikrograma kadar seviyelerdeki maddelerin analizine olanak verir.

Yapılan polarografik çalışmalara bakıldığında elde edilen bağlı hataların %2-3 civarında olduğu görülmektedir.

Polarografik veriler de akımın özel bir elektrolitik hücreye uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak     l mesiyle elde edilmektedir. Elde edilen akım-voltaj eğrilerine "polarogramlar" denir. Elde edilen polarogramlar anaizi yapılacak yani elektrotların daldırıldığı çözeltinin kalitatif ve kantitatif özelliklerini belirlerler.

Polarografide kullanılan damlayan civa elektrodunun üstünlükleri ve sakıncalarından kısaca bahsedelim. Eskiden, voltametrik yöntemlerde kullanılan damlayan civa elektrot birçok özelliğinden dolayı en çok tercih edilen elektrot özelliği taşımaktadır. Birinci  zellik hidrojen iyonunun indirgenmesine karşı civada görülen yüksek aşırı gerilimdir. Bunun sonucunda, hidrojen gazı oluşmadan çinko ve kadmiyum

gibi metaller asidik çözeltilerden kolaylıkla elektrot üzerinde birikebilmektedir. Diğer bir özellik, her bir civa damlasında yeni bir metal yüzeyi oluşmasıdır. Böylece, her yeni damla ile elektrotta meydana gelen olaylar bir öncekinden bağımsız bir şekilde gerçekleşir. Katı metal elektrotlarında ise, yüzeyine adsorplanana ya da biriken safsızlıklardan ötürü oldukça düzensizdirler. Üçüncü önemli üstünlüğü ise, yüksek ya da düşük potansiyellerden geline her hangi bir potansiyelde hemen tekrarlanabilir ortalama akım değerleri meydana getirebilmesidir.

Damlayan civa elektrodun en önemli dezavantajı ise, civanın kolaylıkla yükseltgenemesidir. Bu nedenle, anot olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça azdır. Civa (I) oluşumu ortalama +0,4 V'dan daha yüksek potansiyellerde ortamda bulunan ve bu potansiyelde yükseltgenebilecek diğer bileşenlerin piklerini kapatan büyük pik verir. Bu durum ortamda civa (I) ile kompleks veya çökelti oluşturabilecek iyonlar varsa, daha düşük potansiyellerde de gözlemlenebilir.

Damlayan civa elektrodun diğer bir dezavantajı 10^{-5} M'dan daha düşük konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda artık akımın difüzyon akımını aşabilmesidir. Bu nedenle de difüzyon akımı doğru bir şekilde ölçülmeyebilir. Ayrıca bu elektrotun kullanımı diğerlerine göre biraz daha zordur. Sık sık tıkanmalar meydana gelebilir. Bütün bunların yanısıra civanın zehirli olduğu da düşünüldüğünde, katı elektrotların civa elektroda göre neden tercih edildiği anlaşılabilir.

Son günlerde yapılan çalışmalarda geliştirilen yöntemlerle tespit sınırları 10-100 kat arttırılmıştır.

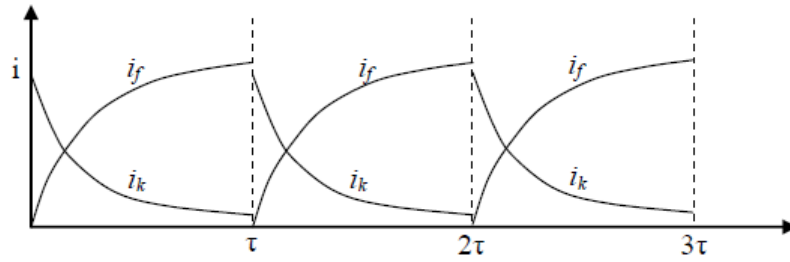
Polarografide elde edilen akım-voltaj eğrilerinde, maksimum adı verilen bazı pikler görülebilir. Tam olarak açıklanamamakla beraber, bu maksimumların büyüyen civa damlasının etrafında oluşturduğu konveksiyondan oluştuğu düşünülmektedir. Ortama katılan jelatin veya Triton X-100 gibi yüzey aktif maddeler sayesinde oluşan maksimum pikler kaybolur. Bu yüzey aktif maddelere maksimum baskılayıcılar denir. Bunlar aşırı kullanıldıklarında viskoziteyi değiştirirerek difüzyon akımının düşmesine neden olabilirler. [19].

2.2.1. Voltametrik teknikler

2.2.1.1. Normal puls polarografisi

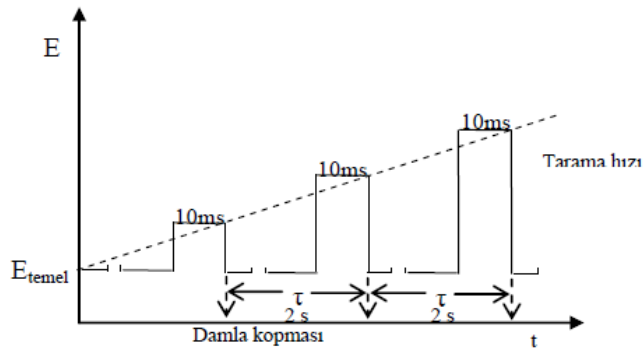
Polarografide yöntemin duyarlılığı artık akıma bağlı olduğundan bu akımı giderici değişik teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan biri puls şeklindeki gerilimlerin uygulandığı normal puls polarografisidir.

Artık akım faradaylık ve sığasal (kapasitif) bileşenlerden oluşur. Bu akımların zamana bağlı bileşimleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2.4). Pulsun sonunda her bir akım türünün toplam akım içindeki payı farklıdır.



Şekil 2.4. Damla ömrü süresince Faradaik ve kapasitif akım değişimi [29]

Toplam akım içindeki kapasitif akım oranı, akım ölçümlerinin damla kopmadan çok kısa süre önce yapıldığı teknikle en aza indirilmiş olur. Bu tekniğe Tast veya Sampled DC adı verilir. Teknikte belirli bir boyuta ulaşan damla ile akım ölçüldüğü için polarogram çizgi şeklinde elde edilir ve duyarlılık artırılmış olur. Yöntemin duyarlılığı 10^{-6} - 10^{-7} M seviyelerinde olur. Normal Puls Polarografisinde sabit bir doğru akım potansiyeline giderek artan genlikli pulslar bindirilir (Şekil 2.5). Bu yöntemde pulslar damlama zamanının sonuna doğru uygulanır. Akımın ölçümü ise puls bitimine yakın olmaktadır. Puls ömrü genellikle 5-100 ms olup pulslar arası süre 1-4 s arasındadır [26].

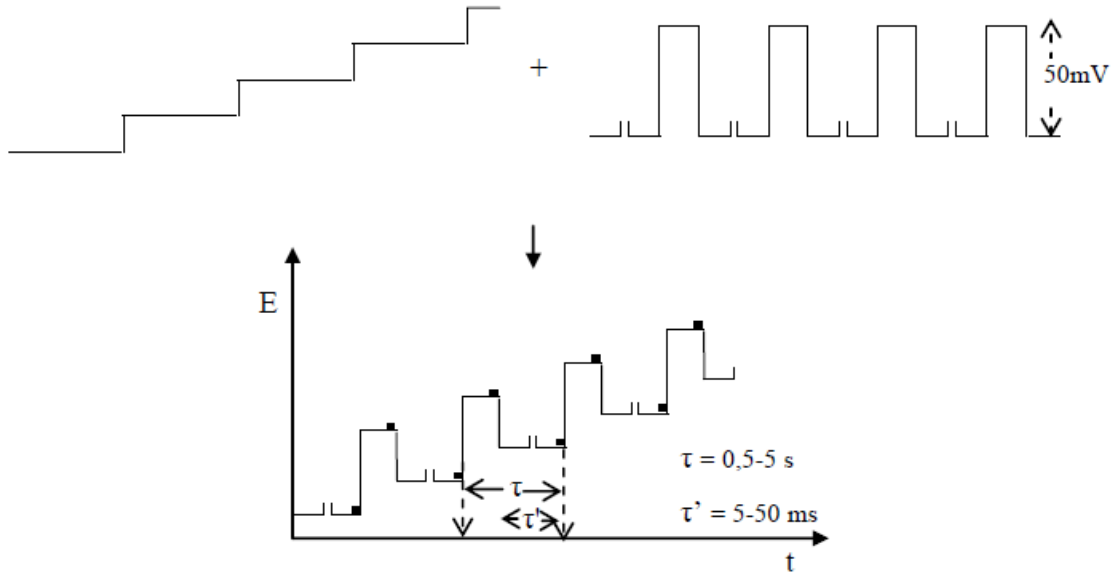


Şekil 2.5. Normal puls polarografisinde potansiyelin zamanla değişimi [27]

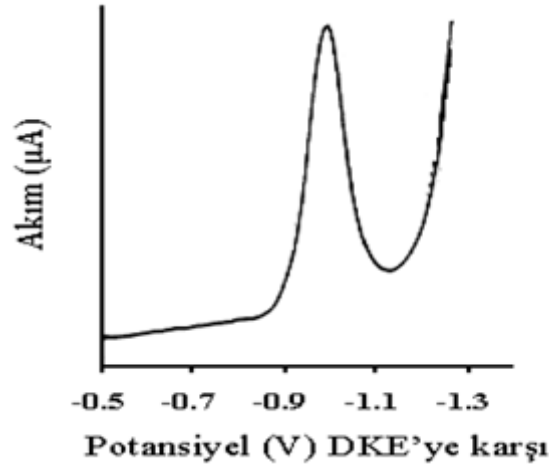
2.2.1.2. Diferansiyel puls polarografisi (DPP)

Normal Puls Polarografisinde pulsun sonunda saptanan akım az da olsa sığasal bileşen içermektedir. Bu bileşenin tespit edilen akım içindeki oranını iyice azaltmak ve seçimliliği arttırmak için, pulsun başındaki ve sonundaki akımlar ölçülerek farkları alınır. Bu yöntemle diferansiyel puls polarografisi adı verilmiştir (Şekil 2.6, Şekil 2.7). DPP’ de doğrusal olarak artan bir doğru akım potansiyelinde sabit genlikli pulslar uygulanır. Genelde DPP’nin tespit limiti 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır Bu değer, klasik polarografinin tespit limitlerinden 100-1000 kat daha düşüktür. DPP deki kısa puls sürelerinin kullanılmasında kapasitif akım bileşeni artmaktadır.

Diferansiyel tip polarogramın bir üstünlüğü, yarı dalga potansiyelleri farkı 0,04 ile 0,05 V kadar olan maddeler için bile ayrı pik maksimumları elde edilebilmesidir. Buna karşılık, klasik ve normal puls polarografisi için, yarı- dalga potansiyel farkı en az yaklaşık 0,2 V olmalıdır [19].



Şekil 2.6. Diferansiyel puls polarografisinde potansiyelin zamanla değişimi [29]

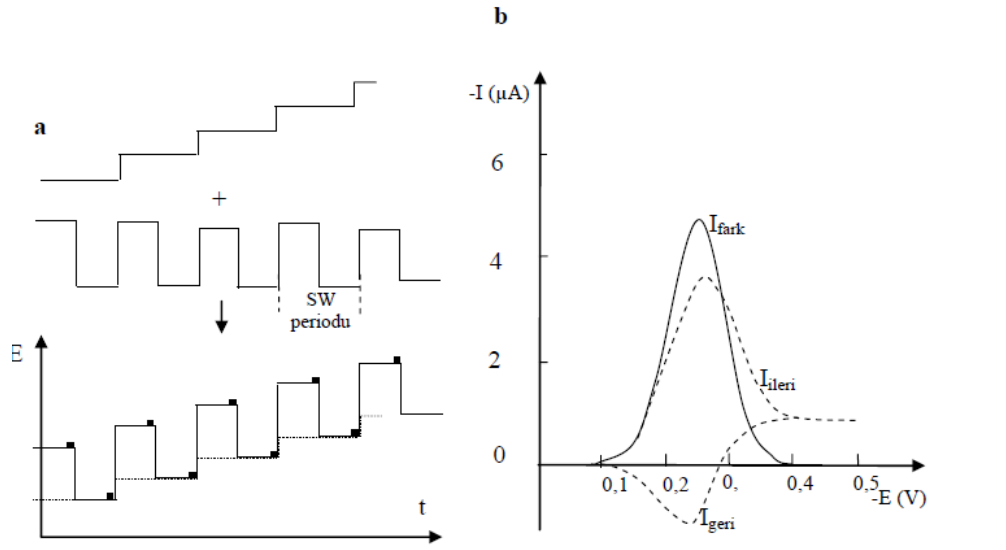


Şekil 2.7. Diferansiyel puls polarografisinde akım-potansiyel eğrisi [19]

2.2.1.3. Kare dalga voltametrisi (SWV)

Kare dalga voltametrisi, potansiyelle ve zamanla değişen artık akımın en önemli bileşeni olan kapasitif akımın, simetrik akım ölçümleriyle elimine edilmesinde özel konuma sahip bir tekniktir. SWV’de çalışma elektroduna doğrusal olarak artan potansiyele ek olarak kare dalga şeklinde pulsar uygulanmaktadır. Voltamogram ileri ve geri yöndeki pulsların sonuna doğru ölçülen akımların farkının potansiyele karşı çizilmesiyle oluşturulur. Aşağıda elektrotta uygulanan potansiyelin zamanla değişimi ile elde edilen voltamogram gösterilmiştir (Şekil 2.8).

Tarama hızları, NPP ve DPP yöntemlerinde 1-10 mV/s aralığında iken, SWV yönteminde 1000 mV/s’ye kadar yüksek çalışılabilmektedir. Bu özellik bu yöntemle çalışıldığında çok kısa sürede çalışmanın tamamlanmasına izin verir. Ayrıca kinetik çalışmalar için de uygundur. Puls yüksekliği genelde 5 ile 100 mV arasında uygulanır. Büyük potansiyel değerlerinde daha yüksek pik akımları elde edilir ancak Faradaik piklerin genişlediği için ayırım gücü azalmaktadır. Kare dalgada puls yüksekliği kare dalganın yarı yüksekliğidir. Frekansın seçimi SWV’de oldukça önemlidir. Yüksek frekanslarda, olduğu gibi SWV’ de çok yüksek frekanslarda çalışıldığında kapasitif akım bileşeni artmaktadır.



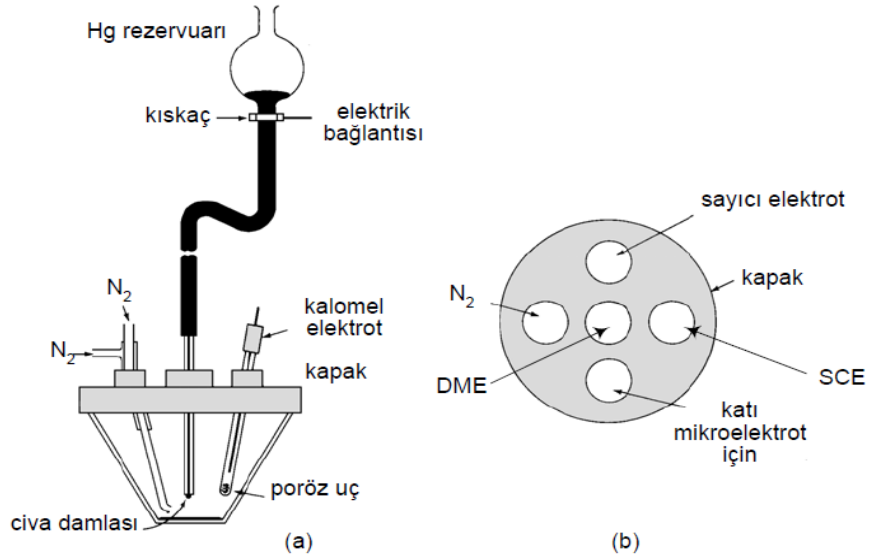
Şekil 2.8. Kare dalga voltametrisi a) Potansiyelin zamanla değişimi b) Akım farkları ve katodik, anodik bileşenleri [29]

Kare dalga yöntemleri temel olarak Barker, Osteryoung ve Kalousek yöntemleri olarak üç tanedir. Kare dalga yönteminin en basit şekli, Barker Kare Dalga Voltametrisi/Polarografisidir. Barker’de dalga bir rampa ya da merdiven şeklinde olup simetrik bir kare dalga ile sinüzoidal alternatif akım voltametrisinin uygulanmasından meydana gelmiştir. Kalousek kare dalga voltametrisi/polarografisi (Heyrovsky tarafından isimlendirilmiştir) kare dalganın sadece ters yarı devirlerindeki akımın ölçülmesiyle elde edilen daha küçük frekanslı (5 Hz) yöntemleri için uygulanmaktadır. En çok kullanılan kare dalga yöntemi ise Osteryoung’tır.

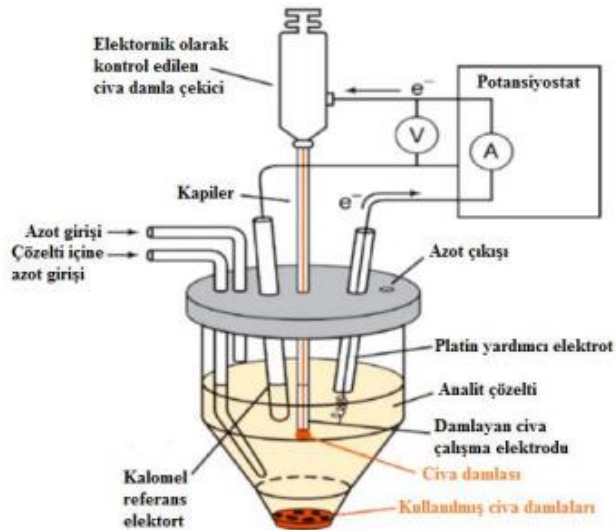
2.2.1.4. Voltametrik hücreler

Voltametrik bir hücrede analiz edilecek çözelti ve bu çözeltiye daldırılmış, kolaylıkla polarize olabilen küçük bir çalışma elektrotu (mikroelektrot), polarize olmayan büyük bir elektrot bulunmaktadır. Yükseltgenme indirgenme reaksiyonunun gerçekleştiği mikroelektrot bir kaç mm alanında bir civa yüzeyinden oluşur. Civa damlalı elektrot özellikle, voltametrik çalışmalarda kullanılmaktadır. Voltametrde metal (civa) kendi ağırlığı ile çok ince bir kapilerden, 0,5-1 mm çapında birbirine eşit damlalar halinde sürekli akmaktadır. Bir damlanın yaşam süresi 2-6 saniye kadardır. (Şekil 2.9).

Voltametrik bir hücredeki referans elektrot çalışma elektrotuna göre ağır ve büyüktür. Küçük akımlar geçtiğinde referans elektrotun davranışı değişmez ve analiz süresince polarize olmaz. Referans elektrot olarak en çok doygun bir kalomel elektrot veya bir gümüş/gümüş klorür elektrot kullanılabilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.9. Civa damlalı elektrot ve hücreler [26]



Şekil 2.10. Tipik bir voltametri hücresi [26]

2.2.1.5. *Polarogramlar*

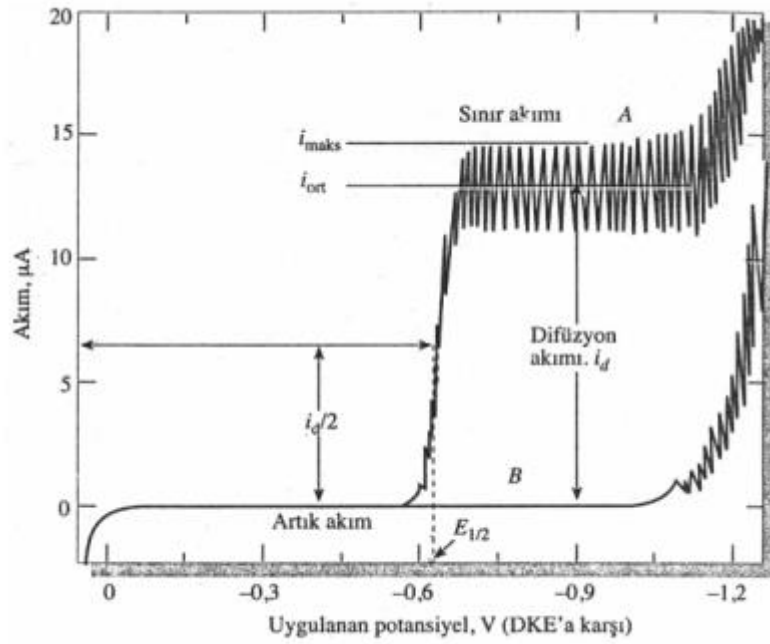
Bir polarogram, akım eğrisinin polarografik bir hücreye uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak çizilmesiyle elde edilir(Şekil 2.11) . Mikroelektrot enerji kaynağının negatif ucuna bağlanır böylece negatif potansiyel uygulanmış olur. Bu elektrodun katot görevi yapması durumunda akım da pozitif işaretlidir. Bunlardan birisi (A eğrisi) HCl yönünden 1,0 M ve kadmiyum iyonu yönünden 5×10^{-4} M olan bir çözeltiye, ikincisi ise (B eğrisi) sadece 1 M HCl çözeltisine aittir. Bunun sonucu elde edilen akım-voltaj eğrisine "polarografik dalga" adı verilir. Bu durum aşağıdaki reaksiyonun bir sonucudur (Denklem 2.3).



Burada Cd (Hg), bir amalgam oluşturacak şekilde cıvada çözünmüş elementel kadmiyumu gösterir. Potasyum iyonunun potasyum amalgamı şekline dönüşmesinden dolayı iki eğride de -1 V civarında keskin artış görülmektedir. Polarografik bir dalganın oluşması için destek elektrolit gereklidir. Bu örnekte destek elektrolit potasyum klorürdür. Ortamdan kadmiyum iyonları bulunmadığı durumda, destek elektrolitinin tek başına verdiği polarogram incelendiğinde, hücreden küçük bir akım geçtiği görülür. Bu akım artık akım olarak adlandırılır.

Polarografik bir dalganın en önemli özelliği, uygulanan potansiyele rağmen, akım aniden yükseldikten sonra sabit kaldığı bölgedir. Akımın sabit olduğu bu akıma "sınır akımı" denir. Mikroelektrot yüzeyinde reaksiyon veren maddenin taşınma hızı sınırlandığı için akım sabit kalmakta ve sınır akımı oluşmaktadır.

Difüzyon-kontrollü bir sınır akımına "difüzyon akımı"denir ve id sembolü ile gösterilir. Difüzyon akımı reaktif maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği için analizlerde en önemli bir parametredir. Difüzyon akımı, sınır akımı ile artık (kalıntı) akımlar arasındaki farktır (Şekil 2.11). Bu grafikden elde edilen bir diğer önemli veri de, akımın, difüzyon akımının yarısına eşit olduğu değerdir. Bu değere "yarı dalga potansiyeli" denir. Yarı dalga potansiyeli maddenin kantitatif tayininde kullanılır ve $E_{1/2}$ sembolü ile gösterilir [19].



Şekil 2.11. Kadmiyum iyonunun polarogramı [19]

3. AKRİLAMİD İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

1950’li yıllarda endüstriye girişinden itibaren akrilamidin miktar tayinini konu alan birçok çalışma yapılmıştır. Yayınların sayıca çok ve detaylı olması nedeniyle temelde birkaç gruba ayrılarak ele alınması daha kolay ve verimlidir. Kullanılan yöntemleri kullanım sıklığına göre gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi ve bunların dışındaki teknikleri içeren diğer analitik yöntemler olarak üç ana gruba ayırmak mümkündür. Ağırlıklı olarak GC-MS ve LC-MS/MS tekniklerinin kullanıldığı çalışmalarda araştırmacılar yeni yöntemler geliştirmek yerine genellikle daha önceden yayınlanmış olan yöntemlerin farklı uygulamaları üzerine yoğunlaşmışlardır. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar, gıdalarda oluşan akrilamid miktarını düşürmek için uygulanabilecek işlemleri araştırmak üzere yapılmıştır.

Wang, Lee, Shuang ve Choi Çine özgül yağ da kızartılmış un ürünlerinde akrilamid analizleri için katı faz ekstraksiyonu ardından sıvı kromatografisi kullanmışlardır [5]. Numuneler Oasis HLB ve Bond Elut katı faz kolonlarının kullanıldığı basit bir saflaştırma işlemini takiben 0 °C de 15 dakika süre ile 14500 rpm de santrifüj edilerek yağ ayırımı gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %4 asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. Akrilamid, 210 nm ve 255 nm dalga boylarında tespit edildi. 1 g lık test numuneleri alındığında 8

gıda numunesi için akrilamid sonuçları > %78 geri kazanım ile 27–198 ng/g arasındadır. Akrilamid sonuçları %2,1 - %10,9 oranında kesindir (n=3) [5].

Liu ve arkadaşları Quechers metodu ile çayda akrilamid analizi yapmışlardır. Akrilamid 25 °C de 10 mL su, 10 mL asetonitril içerisinde 20 dakika da ekstrakte edilmiş, ekstrakta 4 g MgSO₄ ve 0,5 g NaCl eklenmiştir. Hassasiyeti arttırmak amacı ile asetonitril fazından 9 ml alınarak 0,5 ml ye konsantre edilmiştir. Saflaştırma amacı ile Oasis MCX katı faz ekstraksiyon kolonu kullanılmıştır. Analiz sonunda gözlenme limiti 1 ng/ml, tayin limiti 5ng/ml olarak tespit edilmiştir. Metodun geri kazanımları ise %74-79 aralığındadır [30].

Gökmen ve arkadaşları, patates kızartmalarında iç ve kabuk bölgelerde akrilamid oluşumu ile sıcaklık-zaman parametrelerindeki değişimlerin ilişkisi hakkındaki araştırmalarında 150, 170 ve 190 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilen kızartma işlemi sırasında patateslerin iç kısımlarındaki ve kabuklarındaki sıcaklık değişimlerini gözlemlemişlerdir. Kızartma sıcaklığından bağımsız olarak merkez sıcaklığının 9.dakikaya kadar 103-104°C tespit edilmiştir. Çalışma sonucu yüzey ve merkezdeki akrilamid seviyeleri arasında belirgin bir fark olduğu ortaya konulmuştur. Yüzeydeki akrilamid miktarları 9 dakika sonunda 150, 170 ve 190 °C sıcaklıkları için sırası ile 72, 2747, 6476 ng/g iken merkezde 150 ve 170 °C sıcaklıkları için akrilamid tespit edilememiş, 190 °C için ise 376 ng/g akrilamid bulunmuştur. 150 °C için 9 dakika içerisinde yüzey sıcaklığının 120 °C nin üzerine çıkamaması ve araştırma sonuçları göz önüne alınarak akrilamid oluşumunu engellemek veya en aza indirmek için kızartma sıcaklığının 120 °C yi geçmemesi önerilmiştir [31].

Erdoğan ve arkadaşları, patateslerin mikrodalgada ön pişirme ile patates kızartmalarında akrilamid oluşumunun azaltılması konulu araştırmasında 10, 20 ve 30 saniye süre ile 850W mikrodalgada ön pişirmeye tabii tutulan örneklerin 150, 170, 190 °C sıcaklıklarında belirli bir sürede kızartılmıştır. Kızartma işlemi suresince patateslerin merkez ye yüzey sıcaklıkları izlenmiştir. Sonuç olarak mikrodalga ile işlem görmüş patateslerin yüzeyinde akrilamid seviyelerinin belirgin miktarlarda düşük olduğu, buna karşılık merkezde oluşan akrilamidin mikrodalga ile işlem görmemiş olanlara kıyasla yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Patatesler bütün olarak düşünüldüğünde 150,170 ve 190 °C sıcaklıklarda kızartılan mikrodalga ile ön pişirilme işlemi uygulanmış numuneler kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında akrilamid miktarlarında sırası ile %36, %41 ve %60 lık düşüşler olduğu tespit edilmiştir [32].

Yapılan çalışmada depolama koşullarında da patatesin yapısında akrilamid oluşumunda önemli bir parametre olduğu tespit edilmiştir. Patatesler düşük sıcaklıkta depolandığında, patatesler donmamak için solunum hızlarını arttırmakta ve yapısındaki nişasta indirgen şekerlere dönüşmektedir. Yapılan çalışmada, patateslerin depolama şartlarının akrilamid oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek için, patatesler farklı farklı sıcaklıklarda depolanmıştır. Çalışmanın sonucunda patatesler 10 °C'nin altında depolandığında bu patateslerden yapılan kızarmış ürünlerde yüksek miktarlarda akrilamid oluştuğu saptanmıştır [33].

Yapılan çalışmada, kızartma işleminden önce patates dilimlerine uygulanan ön işlemlerin akrilamide etkisi araştırılmıştır. Ön işlem olarak haşlama, suda bekletme, asitli suda bekletme gibi işlemler uygulanmıştır. Patates önceen haşlandığında asparajin ve indirgen şeker içeriğinde ciddi bir azalma tespit edilmiştir. Patatesler suda bekletildiğinde (oda sıcaklığında) indirgen şeker miktarındaki azalmanın oldukça fazla olduğu görülmüşken, asparajin miktarındaki azalmanın çok fazla olmadığı görülmüştür. Bunun sonucunda patatesleri önceden haşlamanın, kızartma işleminde akrilamid oluşumunun azaltılmasında etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Patates dilimlerinin önceen farklı konsantrasyonlardaki sitrik asit çözeltilerinde bekletilmesinin ise asparajin ve indirgen şeker içeriğinin azalmasında etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Maillard tepkimesinin oluşması için koşullar bozulduğundan, pH'nın azaltılmasıyla akrilamid oluşumunun %70 oranında azaldığı tespit edilmiştir [34].

Bir diğer çalışmada, patates dilimlerine asparajinaz enzimi uygulanmıştır. Asparajinaz enzimi uygulanmasıyla asparajin, aspartik asit ve amonyağa dönüşmüştür. Bu durum asparajin miktarını %88 oranında azaltmıştır. Asparajinin azalması da patateslerde oluşan akrilamid miktarının %99 oranında azalmasını sağlamıştır [8].

Bir başka çalışmada da, dondurulmuş patates dilimi üretiminde patates dilimlerini haşlama basamağında asparajinaz enzimi ile muamele etmişlerdir. Bu patatesleri kızarttıktan sonra oluşan akrilamid miktarının azaldığı görülmüştür. Haşlama işlemi yapılmayan patateslere göre, patates dilimlerini 40 °C'de 20 dk 10.000 ASNU/l asparajinaz solüsyonunda beklettikten sonra, 175 °C'de 3 dk kızarttıklarında oluşan akrilamid miktarının %30 oranında azaldığını bulmuşlardır. Aynı şekilde enzim uygulaması yapıp 75 °C'de 10 dk haşlanan patates dilimleri kızartıldığında oluşan akrilamid miktarının direkt 75 °C'de 10 dk haşlanana göre %60 azaldığını tespit etmişlerdir [35].

Diğer bir çalışmada ise, patates dilimlerini asparajinden farklı amino asitler içeren çözeltilerde bekletmişlerdir. Böylece yarışçı bir ortam meydana getirmişlerdir. Böylelikle asparajinin tepkimeye girdiği indirgen şeker miktarı azalmış ve buna bağlı olarak da patateslerde oluşan akrilamid miktarında da önemli düzeyde düşme olduğu bulunmuştur [36].

Vakumlu pişirmenin, geleneksel ve vakum kombine pişirme deneyleri, sırasında ortalama yüzey sıcaklığının sürekli ölçülmesi ile çerezlerde akrilamid miktarının azalma mekanizması aydınlatılmıştır. Isı aktarım katsayısı atmosferik ve vakumlu pişirme koşullarında belirlenmiştir. Çerez hamuru örnekleri (0,3 cm kalınlık, 5 cm çap) 180 °C'de tamamen atmosferik basınç altında (101 kPa) veya atmosferik ve indirgenmiş basınç (61 ve 41 kPa) kombinasyonu altında pişirilmiştir. Pişirme süreleri, nem içeriği %3.0-3.5 arasında olan kurabiye numunelerine göre ayarlanmıştır. Yüzey ve iç sıcaklıklar sırasıyla bir termal kamera ve bir termokuple kullanılarak pişirme kaydedilmiştir. Termal yük derecesi (ürüne enerji girişi) daha sonra zaman - sıcaklık profillerinden ve bitmiş ürünlerdeki akrilamid seviyesine bağlı olarak toplam risk hesaplama yaklaşımını kullanarak hesaplanmıştır. Vakumlu kombine pişirme ile hazırlanan kurabiyelerin akrilamid konsantrasyonunun 300 ng / g olduğu ve geleneksel pişmiş numuneye (445 ng / g) kıyasla yaklaşık %30 daha düşük bir seviyede olduğu bulunmuştur. Basıncın düşürülmesi üzerine konvektif ısı transfer katsayısında hafif bir düşüş gözlemlenmiştir. Ani basınç düşürmesinin yarattığı buharlaşmalı soğutma etkisinin, sınırlı sıcaklık artışından ve dolayısıyla akrilamid miktarının azalmasından sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır [37].

Akrilamidin voltametrik yöntemle analizi konusunda ise çok fazla çalışma yoktur. Nötr bir sulu çözeltide doğrudan tespiti için yeni, basit ve hassas diferansiyel puls polarografik (DPP) metodu araştırılmıştır. 0,5 kg.cm⁻² azot gazı basıncında, -1,6 V ila -1.97 V potansiyel aralığında, saf sulu LiCl'de -1,84 V'da iyi tanımlanmış ve iyi çözölmüş bir akrilamid piki tespit edilmiştir. İncelenen çeşitli elektrolitler arasında, tetra metil amonyum iyodür, tetra metil amonyum hidroksit ve LiCl varlığında en iyi DPP tepkisini LiCl ile göstermiştir. Yüzeyinde güçlü adsorpsiyonlarından dolayı tetra butil amonyum hidroksit ve tetra butil amonyum bromür varlığında ise kötü tepki göstermiştir. LiCl konsantrasyonunun etkisi, sıklık voltametrik cevap ve civa bırakma süresi çalışmaları akrilamidin tersinmez bir elektrokimyasal davranış sergilediğini göstermiştir. Saf sulu ortamdaki iyi elektrokimyasal tepki, elektrot reaksiyonunu etkileyebilecek hidrojen bağlanmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Optimize edilmiş şartlar altında,

0.2 mg L⁻¹ ila 20 mg L⁻¹ arasındaki konsantrasyon aralığında korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9998$ olarak tespit edilmiştir. Yöntem için RSD %0.3 (n = 16) bulunmuştur. Tespit limiti (LOD) 27 µg L⁻¹. Yöntem, alkali metallere herhangi bir etkileşim etkisi olmaksızın gıda numunelerinde AA'nın miktarının belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır [4].

4. VOLTAMETRİK YÖNTEMLE YAPILAN DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Cihazlar

4.1.1. Elektrokimyasal analizör

Elektrokimyasal çalışmalar için BAS model (Bioanalytical Systems, Epsilon potentiostat/galvanostat, IN 47906, USA) elektrokimyasal analiz sistemi kullanılmıştır. Elektrokimyasal analizör cihazının ana kısımları aşağıda görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. BAS100 model elektrokimyasal analizör [38]

4.1.2. Elektrotlar

4.1.2.1. Referans elektrot

Dönüşümlü voltametri ve kare dalga sıyırma voltametrisi çalışmalarında referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl), kullanılmıştır. Elektrot cam hücre içerisinde bulunan analizi yapılacak çözeltiye değecek şekilde hücreye takılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Ag/AgCl (3M KCl) referans elektrot [39]*

4.1.2.2. *Karşıt elektrot*

Karşıt elektrot olarak ise, platin tel elektrot kullanılmıştır. Platin tel elektrot da cam hücre içerisinde bulunan çözeltiye degecek şekilde hücreye bağlanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Platin elektrot [40]*

4.1.3. *Çözeltilerin hazırlanması*

4.1.3.1. *Standart akrilamid çözeltisinin hazırlanışı*

Akrilamid standart stok çözeltisi, 7,1 mg standart madde tartılıp 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi 1×10^{-3} M (0,0071 mg.mL⁻¹ - 71 ppm) olarak hesaplanmıştır. Bu çözelti deneylerin yürütüldüğü çalışma aralığına bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir.

4.1.3.2. *LiCl çözeltisinin hazırlanışı*

LiCl çözeltisi 1,059 g LiCl tartılarak 50ml bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi 0,5 M olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.3. Britton-Robinson tampon çözeltisi (B-R tamponu)

Britton-Robinson tampon çözeltisinin hazırlanması için 2,7 mL %85'lik fosforik asit, 2,3 ml saf asetik asit, ve 2,5 g borik asit karıştırılmış ve distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan B-R tamponundan 100'ml lik kısımlar alınmış, pH'larının ayarlanması için, üzerilerine 2 M NaOH veya 2 M HCl çözeltisinden damla damla ilave edilmiştir. Bu yöntemle pH 2 ile pH 11 arasında B-R tampon çözeltileri hazırlanmıştır.

4.2. Analiz Parametreleri

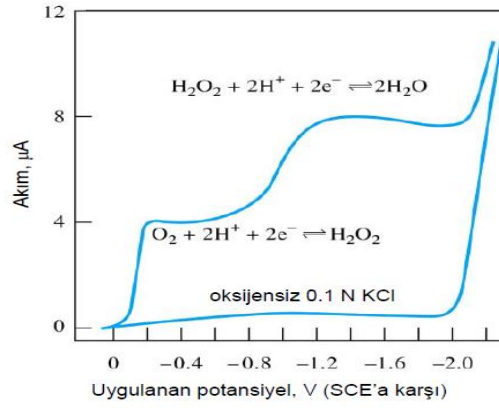
Polarografi cihazı ile yapılan deneysel çalışmalarda ilk olarak Dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak potansiyel tarama hızı çalışmaları ile elektrot reaksiyonun adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü olup olmadığı araştırılmıştır. Akrilamidin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi amacıyla referans elektrot olarak Ag/AgCl olarak seçilerek civa damla elektrot üzerinde dönüşümlü voltametri çalışmaları yapılmıştır.

Daha sonra, Osteryoung Kare Dalga Voltametrisi (OSWV) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılarak yapılan voltametrik çalışmalarla gıdalarda akrilamid tayini için optimum parametrelerin araştırılması amaçlanmıştır. Kare dalga voltametrisi ile en uygun destek elektrolit Ag/AgCl olarak seçilip, pH taraması yapıldıktan sonra, daha düşük derişimlerdeki akrilamid miktarlarının tayini edilebilmesi için çalışmalar yürütülmüştür.

4.3. Deneysel Çalışmalar ile Elde Edilen Sonuçlar

4.3.1. Voltametrik çalışmalar

Normal şartlarda havayla dengede bulunan bir çözeltideki oksijen derişimi 2×10^{-4} molardır. Bu derişimdeki oksijen oldukça belirgin bir polarogram verir. Oksijence doymuş 0,1 M KCl çözeltisinin polarogramı aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4)



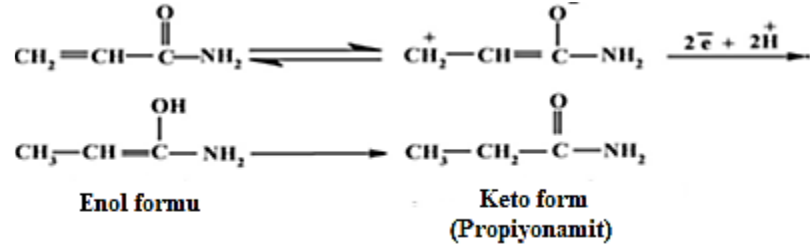
Şekil 4.4. Oksijence doymuş 0,1 M KCl çözeltisinin polarogramı, oksijenin peroksit ve oksit basamağına indirgenmesini gösterir [19]

Şekil 4.4'te oksijenin indirgenmesi sırasında oluşan dalgalardan görülmektedir. Bu nedenle, ortamda çözünmüş olan oksijenin, bir maddenin polarogramı alınmadan önce, ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla çözeltilerden 5 dk. süresince 0,5 kg cm⁻² basınçta azot gazı geçirilmiştir.

Bu çalışmada akrilamidin öncelikle dönüşümlü voltametri çalışmaları yapılmış, daha sonrasında da akrilamidin Osteryoung Kare Dalga Voltametrisi çalışmaları ile akrilamidin indirgenme reaksiyonu sonucu madde miktarının tespiti çalışmaları yürütülmüştür.

Aşağıda akrilamidin elektrot reaksiyonu verilmiştir. Reaksiyonda, iki protonun ve iki elektronun eklenmesiyle çift bağın doymuş hale geldiği görülmektedir. Oluşan yapıdaki çift bağ ve amid grubunun elektronik konjugasyonunun, karbonil oksijene doğru bir mezomerik elektron kayması yarattığı ve propionamide indirgemeye izin veren bir keto-enol yeniden düzenlemesi oluşturduğu ileri sürülebilir. Daha sonra oluşan yapıda ne çift bağın ne de amid grubunun indirgenemez

Reaksiyonda denge, bağ enerjilerinin toplamının enol formundan daha yüksek olmasından dolayı, keto formunu desteklemektedir (Şekil 4.5). Enolizasyonun, enol formunu karbonil ile hidrojen bağı ile azaltan ve böylece iç hidrojen bağlanma eğilimini azaltan su tarafından büyük ölçüde etkilendiği de tarif edilmiştir. Sonuç olarak, tüm bu sonuçlardan saf sulu solüsyonda, elektron reaksiyon ürününün hidrojen bağlanması yoluyla büyük ölçüde stabilize edilmesiyle AA'nın elektron proton transfer kinetiğinin daha kolay gerçekleştiği sonucuna varılmıştır [4].



Şekil 4.5. Akrilamid elektrot reaksiyonu

4.3.2. Dönüşümlü voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri yönteminde potansiyel tarama hızı çalışmaları ile elektrot reaksiyonun adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü olup olmadığı incelenebilmektedir. Akrilamidin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi amacıyla referans elektrot olarak Ag/AgCl olarak seçilerek civa damla elektro üzerinde dönüşümlü voltametri çalışmaları yapılmıştır.

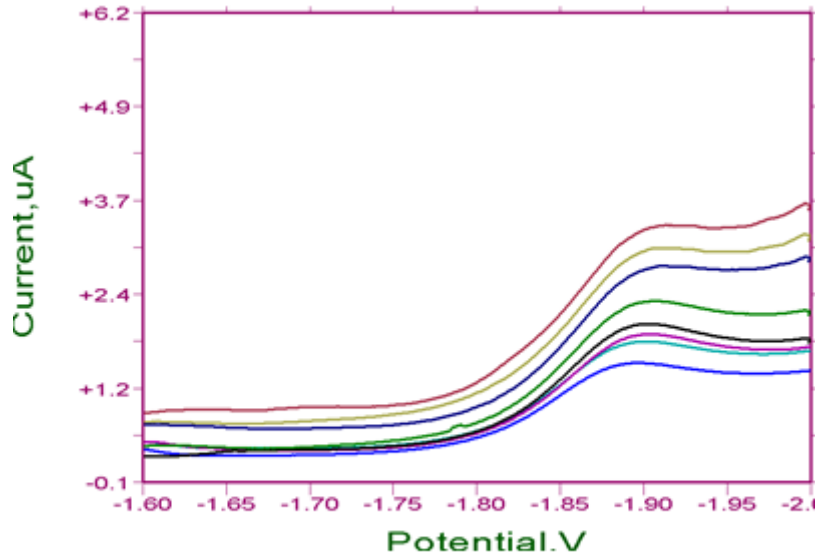
Akrilamidin asılı civa elektrot üzerindeki dönüşümlü voltamogramları 2×10^{-4} M akrilamid ve 0,5 M LiCl içeren çözeltide -30 ile -2750 mV/s arasında farklı tarama hızlarında gerçekleştirilmiştir. Akrilamidin dönüşümlü voltamogramlarının alınabilmesi için -30mV/s'dan başlayarak -2750 mV/s'a kadar önce negatif yönde bir potansiyel taraması sonrasında pozitif yönde potansiyel taraması yapıldı. -2750 mV/s'den sonra pik akımlarının sabit kaldığı ve pik morfolojilerinin bozulduğu görülmüştür.

Dönüşümlü voltametri çalışması sonucunda elde edilen voltamogramlar -30 ile -100 mV/s arasında Şekil 4.6 ve -100 ile -2750 mV/s arasında Şekil 4.7'de verilmiştir. Asılı civa kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda negatif yöndeki potansiyel taramasında -1880 V'da tek bir katodik pik gözlenirken, pozitif yöndeki potansiyel taramasında anodik pik gözlenmemiştir.

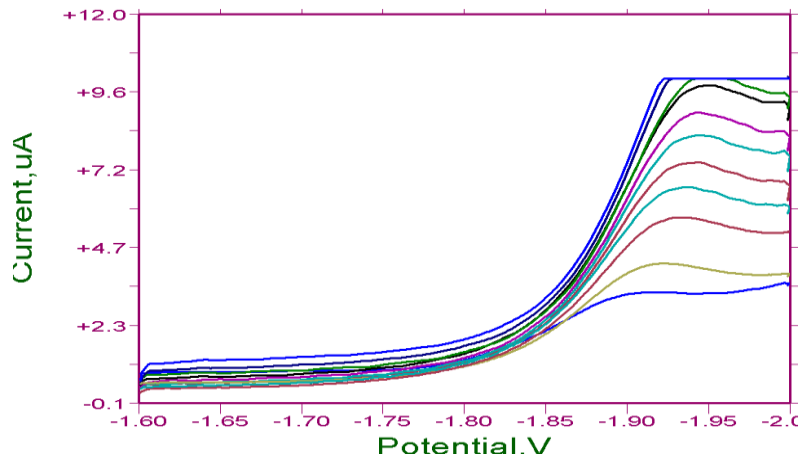
Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen veriler sonucunda tarama hızının kareköküne karşılık ($v^{1/2}$), pik akımı değerleri grafiğe geçirilmiştir ve grafiğin eğimi hesaplanmıştır. Doğruların eğimlerinin 1'den büyük olması yada korelasyon katsayılarının 1'den uzaklaşması elektrot reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Eğer doğruların eğimi 1'den küçükse difüzyon kontrollü olduğu anlaşılır.

Elektrot reaksiyonunun davranışının belirlenmesi için ayrıca tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritmasının değişimine de bakılmıştır. Elde edilen doğruların eğimlerinin 1'e yakın olması da reaksiyonun adsorpsiyona dayalı, eğimin 0,5'den küçük olması difüzyona dayalı olduğunu göstermektedir.

Dönüşümlü voltametri çalışmasında pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi de incelenmiştir. Tarama hızının pik potansiyeli ile kayması elektrot reaksiyonunun tersinmez olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 4.6. (-30 ile -100 mV/s) arasındaki potansiyel taraması



Şekil 4.7. (-100 ile -2750 mV/s) arasındaki potansiyel taraması

Akrilamid ile yapılan hız taraması sonucunda farklı tarama hızlarında elde edilen pik akımları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. CV çalışmasında tarama hızına karşı elde edilen akım değerleri

Tarama Hızı (mV/s)	İpik (µA)
30	1,493
40	1,788
50	1,886
60	2,034
70	2,296
80	2,772
90	3,313
100	3,292
250	4,228
500	5,648
750	6,584
1000	7,326
1250	8,456
1500	8,908
1750	9,715
2000	10,004
2500	10,004
2750	10,004

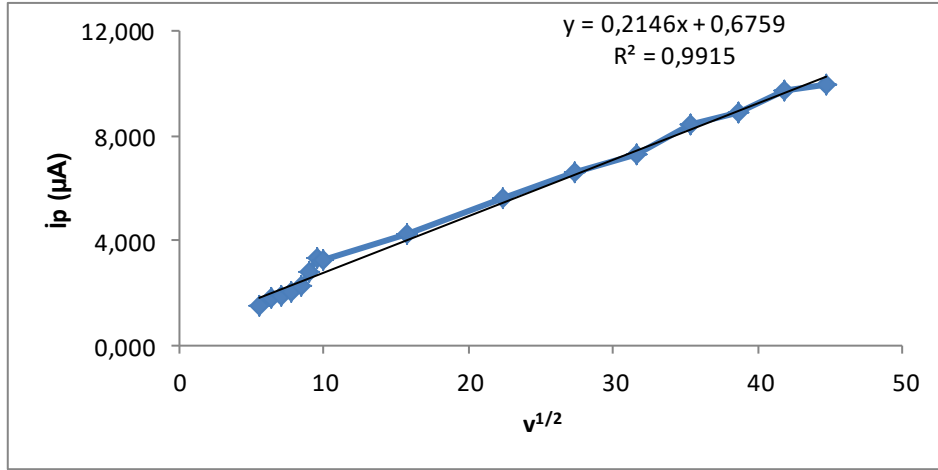
CV tekniği ile yapılan çalışmalarda, tarama hızının kareköküne karşı ($v^{1/2}$) pik akımı (I_p) ve $\log v$ 'ye karşı $\log I_p$ değerleri için yapılan hesaplamalar Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. $2 \times 10^{-4} M$ Akrilamid için Tarama hızı ile akım değişimi

v	$v^{1/2}$	$\log v$	$I_p(\mu A)$	$\log I_p$
30	5,48	1,48	1,493	0,17
40	6,32	1,60	1,788	0,25
50	7,07	1,69	1,886	0,28
60	7,75	1,78	2,034	0,31
70	8,37	1,85	2,296	0,36
80	8,94	1,90	2,772	0,44
90	9,49	1,95	3,313	0,520
100	10	2	3,292	0,517
250	15,81	2,40	4,228	0,626
500	22,36	2,70	5,648	0,75
750	27,39	2,88	6,584	0,81
1000	31,62	3	7,326	0,86
1250	35,35	3,09	8,456	0,93
1500	38,73	3,18	8,908	0,95
1750	41,83	3,24	9,715	0,99
2000	44,72	3,30	10,004	1,00
2500	50	3,40	10,004	1,00
2750	52	3,44	10,004	1,00

Farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen sonuçlara verilere göre tarama hızının kareköküne ($v^{1/2}$) karşı pik akımı (I_p) değerleri grafiğe geçirildiğinde aşağıdaki doğru denklemleri bulunmuştur (Denklem 4.1, Şekil 4.8).

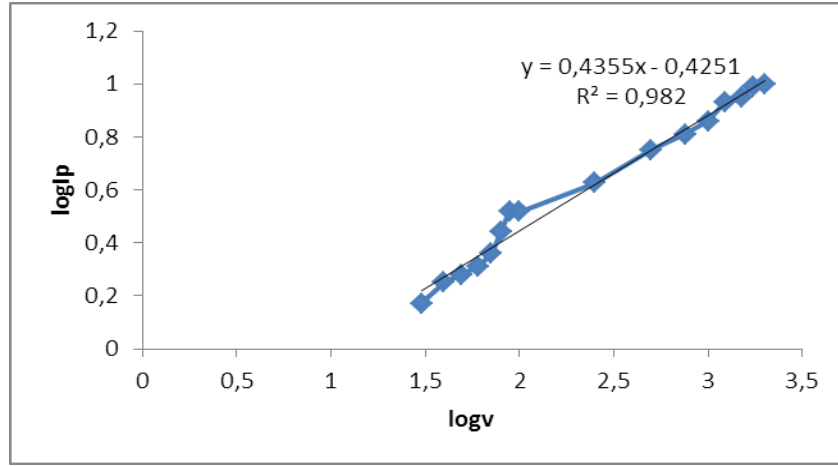
$$I_p(\mu A) = 0,2146 v^{1/2} (mV/s) + 0,676 \quad (R^2 = 0,992) \quad (4.1)$$



Şekil 4.8. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki $(v^{1/2}) - (I_p)$ grafiği

Doğrunun eğiminin 1'den küçük olması akımın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir [41].

Elektrot reaksiyonunun davranışının belirlemek için $\log v$ 'ye karşı $\log I_p$ değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.9)

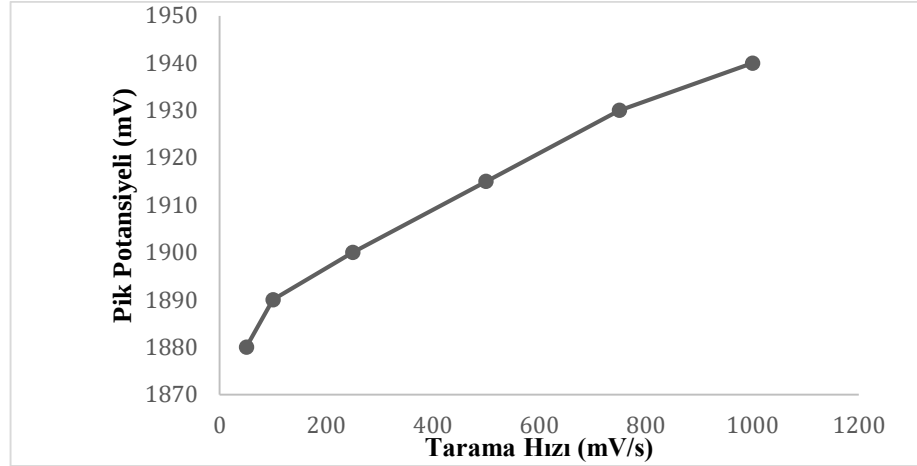


Şekil 4.9. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki $\log v - \log I_p$ grafiği

Şekil 4.9'da görülen grafik sonucunda aşağıdaki doğru denklemi elde edilmiştir (Denklem 4.2). Bu eşitlikte doğrunun eğiminin 0,5'den küçük olması (0,43) reaksiyonun yine difüzyon kontrollü olduğunu gösterir [42, 43].

$$\log I_p(\mu A) = 0,4355 \log v - 0,4251 \quad (R^2=0,98) \quad (4.2)$$

Pozitif yönde yapılan potansiyel taramasında herhangi bir anodik pikin gözlenmemesi ve tarama hızı arttıkça pik potansiyelinin daha negatif değerlere kayması akrilamidin indirgenme reaksiyonunun tersinmez olduğunun göstergesidir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. 2×10^{-4} M akrilamidin 5M LiCl çözeltisindeki tarama hızına karşı pik potansiyeli grafiği

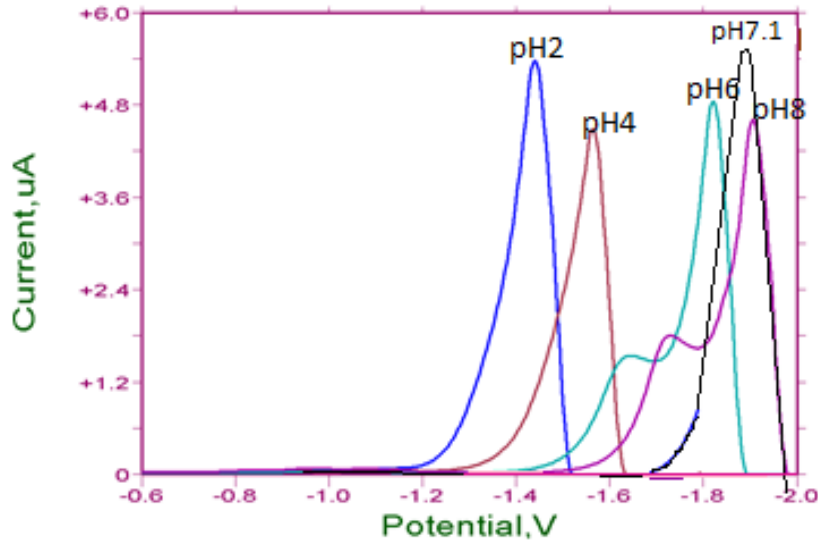
Dönüşümlü voltametri çalışmalarının sonuçları; reaksiyonun tersinmez ve difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

4.3.3. Kare dalga voltametrisi ile yapılan çalışmalar

Akrilamid ile yapılacak voltametrik çalışmalarda öncelikle analiz koşullarının belirlenmesi amacıyla pH taraması, başlangıç potansiyeli taraması yapılmış, uygun destek elektrolit seçilmiştir. Seçilen destek elektrolitin derişimine karar verilmiştir.

4.3.3.1. PH taraması

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda pH tamponlarının etkisini oldukça önemli bir parametredir. pH etkisini gözlemlemek amacıyla pH 1 ve pH 12 aralığında hazırlanan Britton Robinson çözeltileri kullanılmıştır. Bu amaçla 10ml'lik voltametre hücresine, 1×10^{-3} M stok çözeltiden 1 ml, pH tamponundan 1ml ve distile sudan 8 ml alınarak sırasıyla her bir pH 2, pH 4, pH 6, pH 8, pH 10 ve pH 12 tampon çözeltileri için voltamogramlar alınmıştır. Elde edilen voltamogramlar aşağıda görülmektedir (Şekil 4.11).



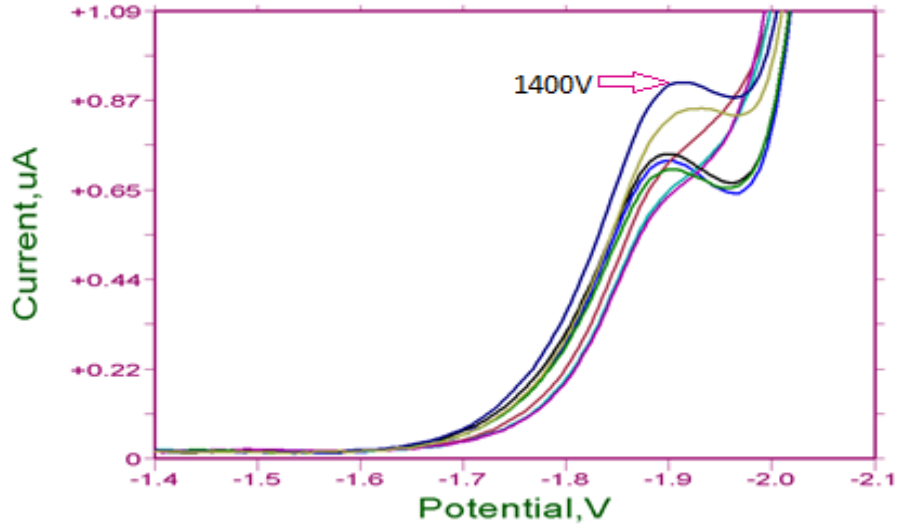
Şekil 4.11. $5.10^{-5} M$ için pH taraması

pH taramasında elde edilen sonuçlara bakıldığında, pH 6 ve pH 8’de kuyruklanma gözlenmiştir. pH 10 ve pH 12’de ise çökme olmuştur. PH 7 civarında keskin ve düzgün pikler elde edilmiştir. PH 7,1’de çalışılmasına karar verilmiştir. Çalışmalarda akrilamid derişimine bağlı olarak difüzyon akımının doğrusal olarak artması bu molekülün tayininin kare dalga voltametri ile yapılabileceğini göstermektedir.

4.3.3.2. Başlangıç potansiyeli taraması

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda başlangıç potansiyelinin tespit edilmesi bir diğer önemli parametredir. Bu amaçla başlangıç potansiyeli olarak sırasıyla 0 mV, 200 mV, 400 mV, 600 mV, 800 mV, 1000 mV, 1200 mV ve 1400 mV seçilerek 2100 mV’ a kadar voltamogramlar elde edilmiştir. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.12’de görülmektedir.

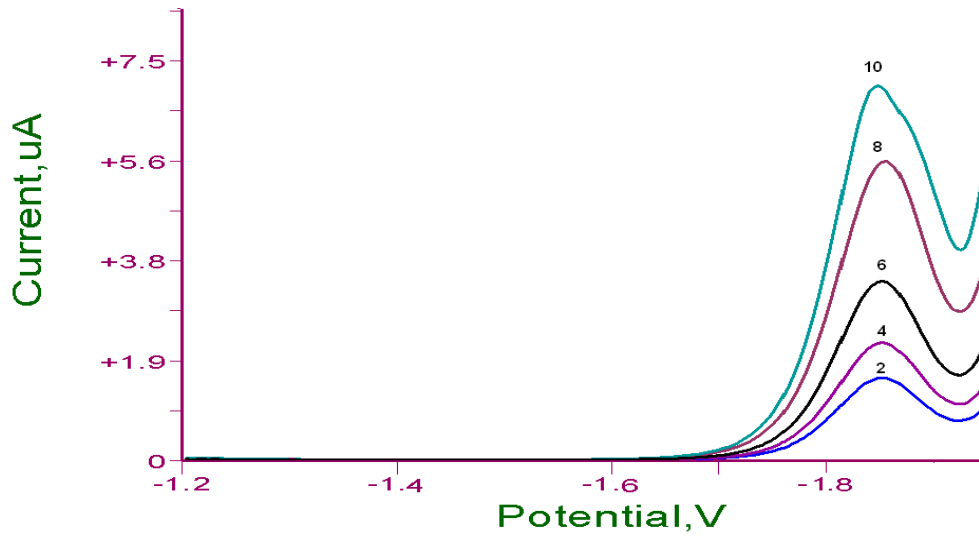
Başlangıç potansiyeli taramasında potansiyel arttıkça piklerin yayvanlaştığı ve pik keskinliklerinin azaldığı saptanmıştır. En uygun başlangıç potansiyelinin 1400 mV olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.12. $3 \times 10^{-5} M$ AA için başlangıç potansiyeli taraması

4.3.3.3. Civa damlası büyüklüğü seçimi

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda bir diğer önemli parametre de civa damlasının büyüklüğüdür. Bu amaçlar farklı damla büyüklükleri seçilerek çalışmalar yapılmıştır. 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 civa büyüklükleri seçilerek sırasıyla voltamogramları alınmıştır. Civa büyüklüğü 12 (120 ms)'nin üzerine çıktığında pik morfolojilerinin bozulduğu görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. $5 \times 10^{-5} M$ AA için civa büyüklüğü taraması

Sonuç itibariyle, en yüksek sinyal şiddeti 10 birim (100 ms) civa büyüklüğü seçildiğinde gözlenmiştir. Ancak bu değerde pik morfolojisi bozulduğu için 80 ms'ye tekabül eden değer analitik açıdan en kaliteli veriyi sağlayan civa büyüklüğünü verdiği karar verilmiştir.

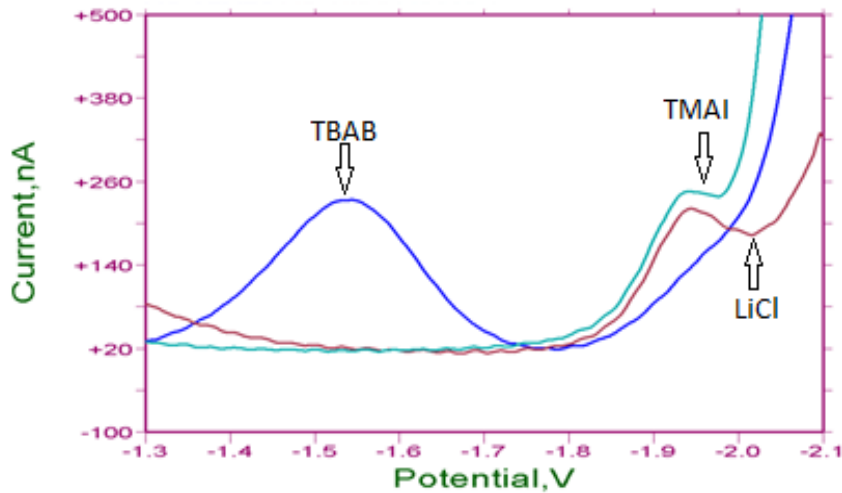
4.3.3.4. Destek elektrolit seçimi

Akrilamidin farklı destek elektrolitleri içerisindeki davranışlarının incelenmesi amacıyla, seçilen destek elektrolitleri için -1,4 ile -2,1 V aralığında OSWV yöntemi ile voltamogramları alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm destek elektrolitlerin derişimleri 0,025mol/L olarak seçilmiştir.

Elde edilen voltamogramlara bakıldığında, destek elektrolit olarak tetra butil amonyum bromür kullanıldığında -1,5 V ve -1,97 V'da iki polarografik pik gözlenmiştir. Tetra metil amonyum iyodür ve LiCl ile alınan voltamogramlarda ise LiCl ile elde edilen pikin daha düzgün olduğu saptanmıştır.

Akrilamid analizinde, LiCl'ün küçük partükül boyutu sayesinde elektrot yüzeyine daha düşük adsorplanma özelliğinden dolayı LiCl çözeltisi ile çalışıldığında, düşük negatif potansiyellerde çok daha yüksek duyarlılık göstermektedir (Şekil 4.14). Bu nedenle destek elektrolit olarak LiCl kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen sonuç literatüre uygun bulunmuştur [4].



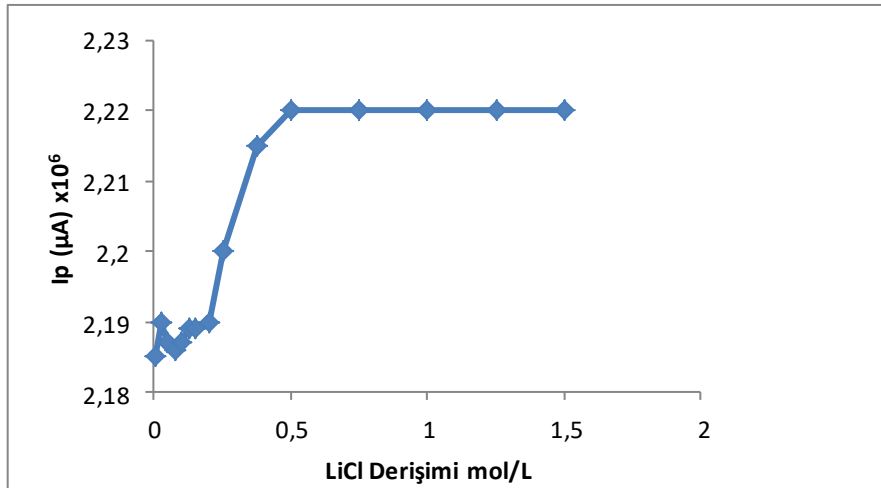
Şekil 4.14. 3×10^{-5} M AA için destek elektrolit seçimi çalışması

Bu sonuç aynı zamanda, destek elektrolit içindeki katyonun daha kuvvetli absorbe olabilen bir destek elektrolit varlığında, bu güçlü elektrot ile yer değiştirilebileceğini ve bunun da katyonik akrilamid ingirgenme reaksiyonunun pik potansiyelinin daha negatif değere doğru kaymasına, pik akımının azalması hatta sıfırlanmasına neden olabileceğini göstermektedir. Akrilamid düşük negatif potansiyellerde en yüksek duyarlılığı destek elektrolit olarak LiCl seçildiğinde göstermektedir. Çünkü LiCl küçük partikül boyutu nedeniyle elektrot yüzeyine en az absorbe olmaktadır.

Akrilamidin pik akımındaki azalmanın, elektrot çözeltisinin arayüzeyindeki çift tabaka yapısındaki değişimden ötürü LiCl derişimi ile doğrudan ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

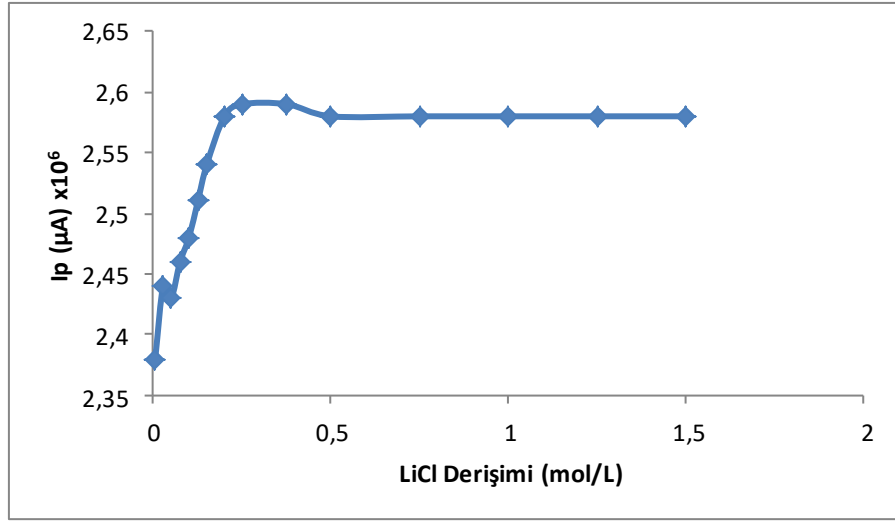
4.3.3.5. *LiCl derişiminin etkisi*

Destek elektrolit olarak seçilen LiCl'ün derişiminin pik akımlarına etkisini araştırmak amacıyla deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, analiz hücrelerine 0,005 mol/L'den başlayarak ve 1,75 mol/L'ye kadar farklı derişimlerde LiCl içerecek şekilde numuneler hazırlanmış ve voltamogramları alınmıştır. Bu deneysel çalışma 2 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen voltamogramlar için LiCl derişimlerine karşılık pik akımları grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'daki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.15. *LiCl derişiminin pik akımına etkisi (1. Deneysel çalışma)*

Yukarıda yapılan çalışma ile ilgili tekrar deneyi yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışma tekrar hem literatüre hem de önceki çalışmamıza uygun olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16. *LiCl derişiminin pik akımına etkisi (2. Deneyssel çalışma)*

LiCl derişiminin pik akımı üzerine etkisinin incelendiği her iki çalışma sonucunda da elde edilen grafiklere bakıldığında LiCl derişiminin 0,005 molL⁻¹ ile 0,5 molL⁻¹ aralığında arttırılması ile pik akımlarının arttığı ve belli bir süre sonra neredeyse değişmediği görülmektedir. Bunun sonucunda pik akımının sabit kaldığı 0,5 M LiCl derişiminde çalışılmasına karar verilmiştir.

4.3.3.6. *Difüzyon katsayısının hesaplanması*

Akrilamid için difüzyon akım sabiti ve maksimum difüzyon katsayısı D ;Ilkoviç eşitliğine göre hesaplanmıştır (Denklem 4.3, Denklem 4.4, Denklem 4.5).

$$I = I_d / C_m^{2/3} t^{1/6} \quad (4.3)$$

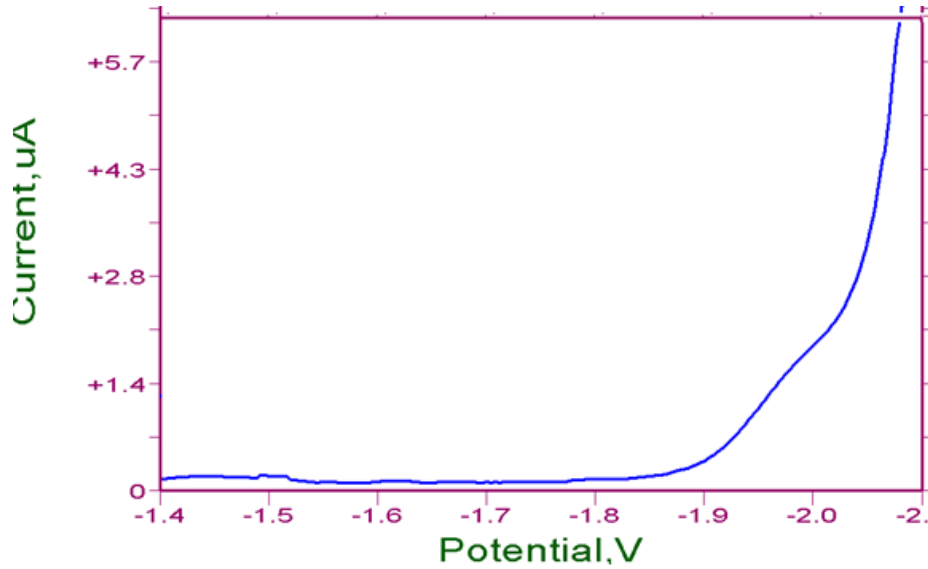
$$I_d = 708 n C D^{1/2} t^{1/6} m^{2/3} \quad (4.4)$$

$$I_d = 0,732 n F C D^{1/2} t^{1/6} m^{2/3} \quad (4.5)$$

C : konsantrasyon (mol/cm^3)
D : difüzyon katsayısı (cm^2/s)
F : Faraday sabiti(C/eq)
id : maksimum difüzyon akımı (μA)
n : aktarılan elektron sayısı (mol,e)
m : cıvanın akış hızı (g/s)
t : damla ömrü(s)

Id ortalama difüzyon akımı olarak ölçülürse, 708 değeri yerine 607 almak gerekir. Denklem 4.5'te ise 0,627 almak gerekir.

Difüzyon sabitinin bulunması için ilk olarak m ve t değerleri bulundu. Bunun için 3×10^{-5} M çözeltinin analizinde, 50 cıva damlası sayılarak süre kaydedildi ve buradan tek bir cıva damlasının ömrü belirlendi. Ayrıca boş iken ve 50 cıva damlası ile dolu iken hücre tartılarak m belirlendi. Kapiler özellik olarak kabul edilen $m^{2/3} t^{1/6}$ değeri 0,157 $\text{mg}^{2/3}\text{s}^{-1/2}$ olarak hesaplandı. Difüzyon akımı Şekil 4.17'de elde edilen DPP polarogramından 1,947 μA olarak tespit edilmiştir. Tüm bu değerler Ilkoviç eşitliğinde yerine konulduğunda D difüzyon katsayısı $8,52 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplanmıştır.



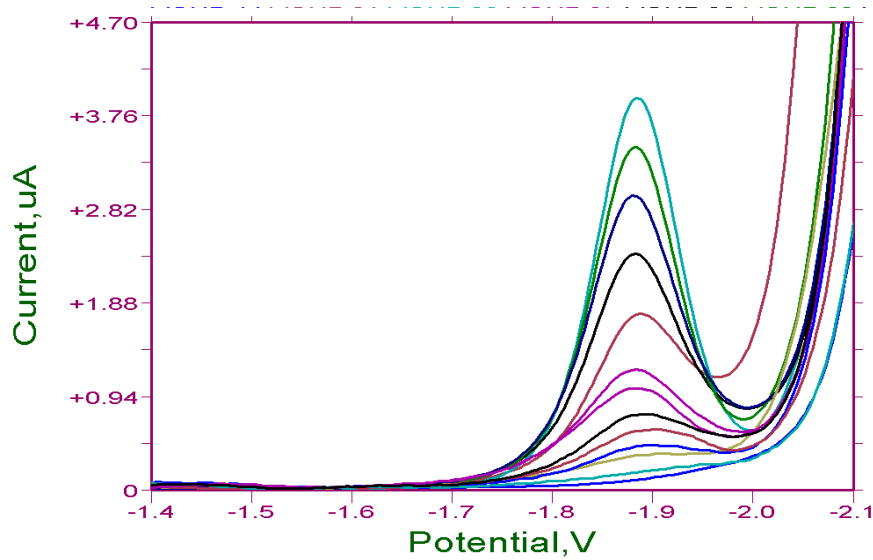
Şekil 4.17. 3×10^{-5} m akrilamidin normal pulse polarogramı

4.3.3.7. Kalibrasyon çalışması

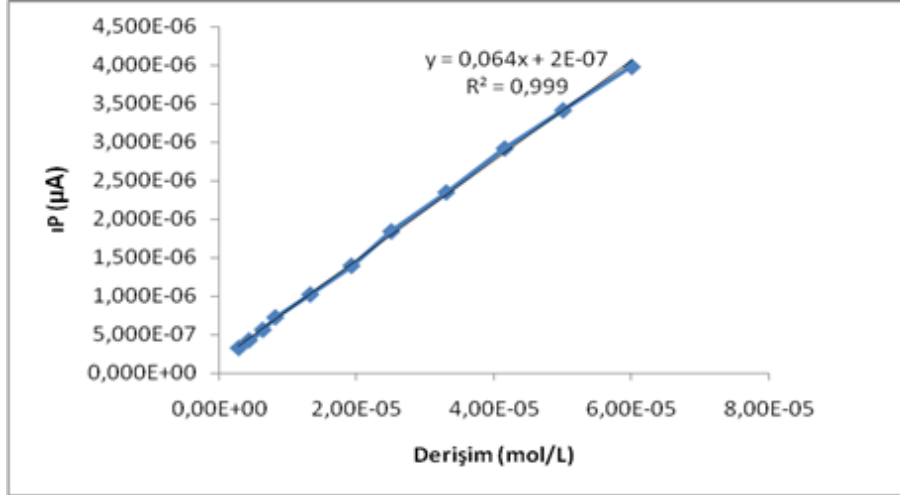
Bundan sonraki çalışmalarda akrilamidin her bir konsantrasyon için 10 ml'lik polaragrafik hücreye farklı derişimlerde çözeltiler konularak üzerlerine 1ml 0,5 M LiCl çözeltisi ve distile su ilave edilerek analiz çözeltileri hazırlanmıştır.

Daha önceki raporda belirtilen derişimlerden daha düşük derişimlere inebilmek için çalışmalar yapılmıştır. Polarografi hücresine 10 ml hacmindeki destek elektrolit çözeltisi konulduktan sonra çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika süreyle %99,99 saflıkta, ortalama gaz basıncı 0,5 kg/cm² olacak şekilde azot gazı geçirilmiştir.

Hazırlanan çözeltiler için 2.8×10^{-6} – 6×10^{-5} M (0,2 ppm-4,26 ppm) lık konsantrasyon aralığında OSWV tekniği ile elde edilen voltamogramlar ve kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.18, Şekil 4.19).



Şekil 4.18. 2.8×10^{-6} – 6×10^{-5} M konsantrasyon aralığında OSWV tekniği ile elden edilen voltamogram (Potansiyel aralığı -1,4V-2,1V, civa büyüklüğü 8)



Şekil 4.19. $2.8 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği

4.3.4. Kare dalga voltametrisi ile gıdalarda akrilamid analizi

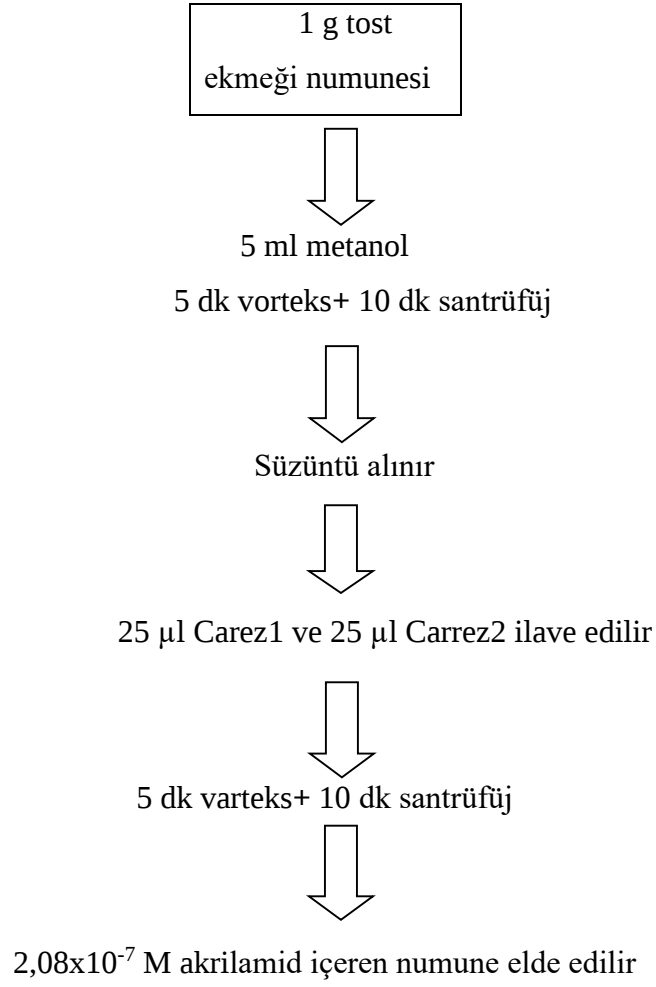
Gıdalarda bulunan akrilamid miktarının voltametrik olarak tayininin araştırılması amacıyla European Reference Materials'dan elde edilen, içerdiği akrilamid miktarı belli olan sertifikası ekte verilen toz halindeki rusk (fırında kızartılmış ekmek dilimi) numunesi kullanılmıştır.

4.3.4.1. Standart akrilamid numunesinin hazırlanması

Akrilamid standart stok çözeltisi 7,1 mg standart madde tartılıp, 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi 1×10^{-3} M (0,071 mg.mL⁻¹ 71 ppm) olarak hesaplanmıştır. Bu çözelti deneylerin yürütüldüğü çalışma aralığına bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir.

4.3.4.2. Standart tost ekmeği (galeta-rusk) numunesinin hazırlanması

Sertifikasında belirtildiği üzere tost ekmeği numunesi 74 µg/kg akrilamid içermektedir. Bu numuneden 1 g. tartılarak 10ml.lik cam santrifüj tüpüne konulmuş ve üzerine 5ml. metanolde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süzöntü alınarak üzerine 25 µl Carez1 ve 25 µl Carez2 çözeltileri eklenmiştir. Son olarak 5 dk. daha santrifüj edilmiş ve böylelikle $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid içeren çözelti elde edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Ekstraksiyon şeması

4.3.4.3. Tost ekmeği numunesi üzerine geri kazanım çalışmaları

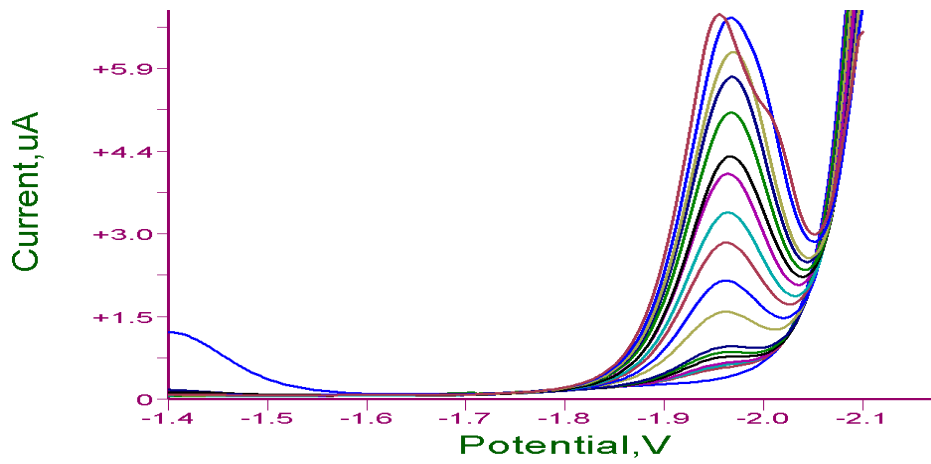
Geri kazanım çalışması, hazırlanmış olan 2,08x10⁻⁷ M akrilamid içeren tost ekmeği numunesi çözeltisi üzerine 1x10⁻³ M'lık standarttan Tablo 4.3'te belirtilen miktarlarda eklenerek yapılmıştır.

Her bir hücre üzerine 1 ml LiCl ve son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ilave edilerek örnekler hazırlanmıştır.

Tablo 4.3. $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid çözeltisi üzerine eklenen akrilamid, LiCl ve distile su miktarları

Tost Ekmeği ($2,08 \times 10^{-7}$ M)'dan eklenen (ml)	1×10^{-3} M'lık standarttan eklenen (ml)	5 M LiCl'den eklenen (ml)	Distile sudan eklenen (ml)
1	0,05	1	7,95
1	0,06	1	7,94
1	0,07	1	7,93
1	0,08	1	7,92
1	0,09	1	7,91
1	0,1	1	7,90
1	0,2	1	7,80
1	0,3	1	7,70
1	0,4	1	7,60
1	0,5	1	7,50
1	0,6	1	7,40
1	0,7	1	7,30
1	0,8	1	7,20
1	0,9	1	7,10
1	1	1	7,00
1	1,1	1	6,90
1	1,2	1	6,80

Standart ilavesi ile elde edilen voltamogramlar aşağıda görülmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid çözeltisi üzerine 1×10^{-3} M'lık standarttan eklenmesi sonucu elde edilen voltamogramlar

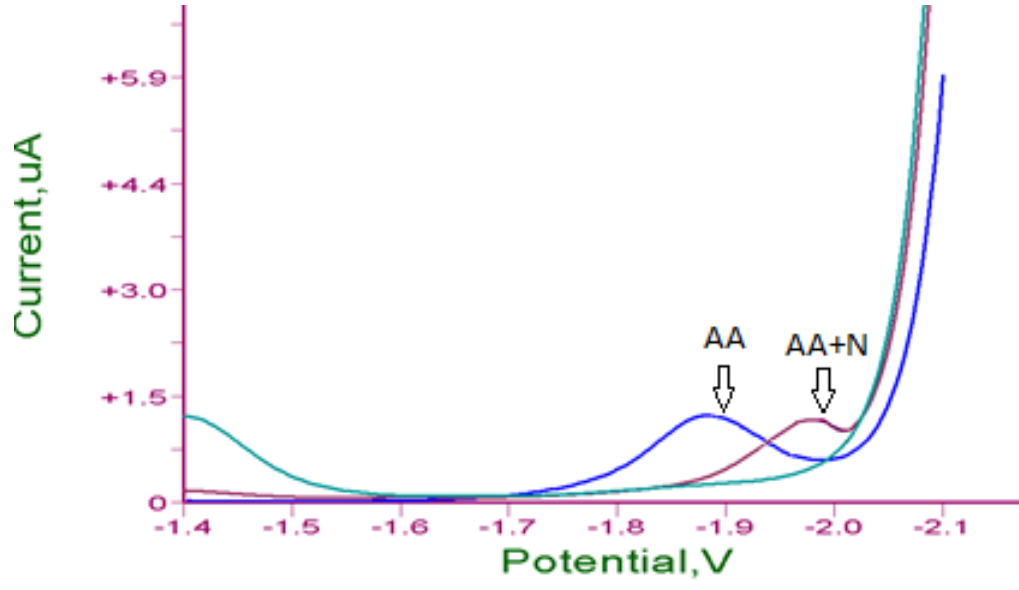
Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde, 10ml’lik hücre içerisinde toplam akrilamid miktarının 5×10^{-6} M’den düşük olduğu durumlarda elde edilen voltamogramların taşıyıcı elektrolitin voltamogramına çok yakın olduğu, derişimin 1×10^{-4} M’ı geçtiği andan itibaren ise pik morfolojilerinin bozulduğu saptanmıştır.

Buna göre yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda elde eklenen akrilamid miktarlarına karşılık ve bulunan akrilamid miktarları ile geri kazanım yüzdeleri aşağıdaki Tablo 4.4’te verilmiştir.

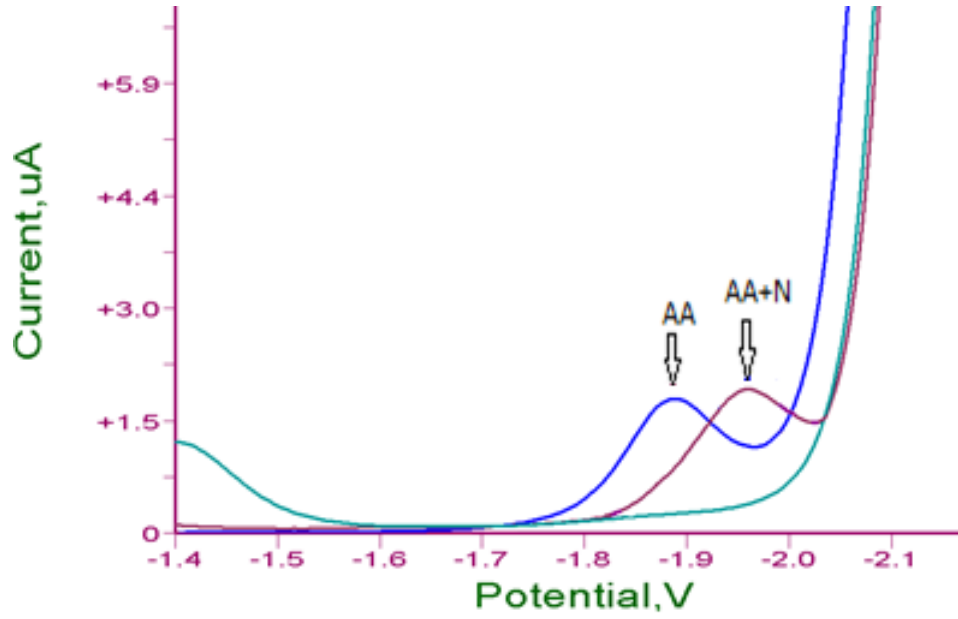
Elde edilen sonuçlar aşağıda görülen voltamogramlara göre hesaplanmıştır. Buna göre önceki kalibrasyon çalışmalarında 1×10^{-5} M ve 6×10^{-5} M aralığındaki konsantrasyonlarda elde edilen voltamogramların yükseklikleri ile $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid içeren tost ekmeği numunesi (N), üzerine eklenen akrilamid çözeltileri sonucunda elde edilen voltamogramların yükseklikleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen voltamogramlar aşağıda sıralanmıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27).

Tablo 4.4. Eklenen akrilamid miktarlarına karşılık ve bulunan akrilamid miktarları ile geri kazanım yüzdeleri

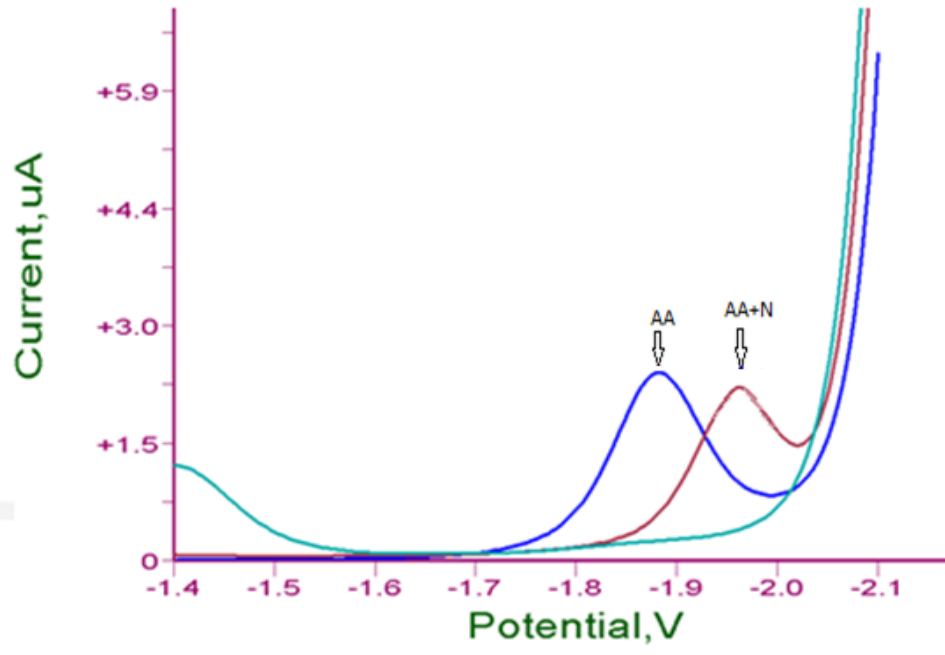
Akrilamid miktarı (M)	Bulunan akrilamid miktarı (M)	Geri Kazanım (%)
1×10^{-5}	$0,98 \times 10^{-5}$	98,0
2×10^{-5}	$2,03 \times 10^{-5}$	101,5
3×10^{-5}	$2,96 \times 10^{-5}$	98,7
4×10^{-5}	$3,97 \times 10^{-5}$	99,3
5×10^{-5}	$4,96 \times 10^{-5}$	98,2
6×10^{-5}	$6,02 \times 10^{-5}$	100,3
	Ortalama	99,3
	Standart Sapma	1,23
	Bağıl Standart Sapma	1,24



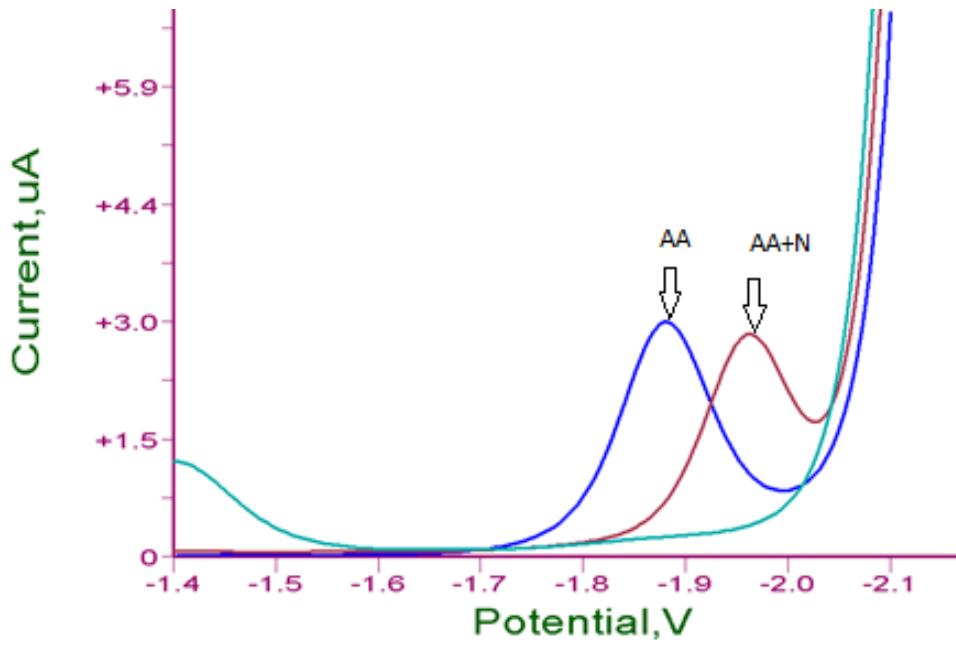
Şekil 4.22. 1×10^{-5} M AA ve 1×10^{-5} M AA + numune voltamogramları



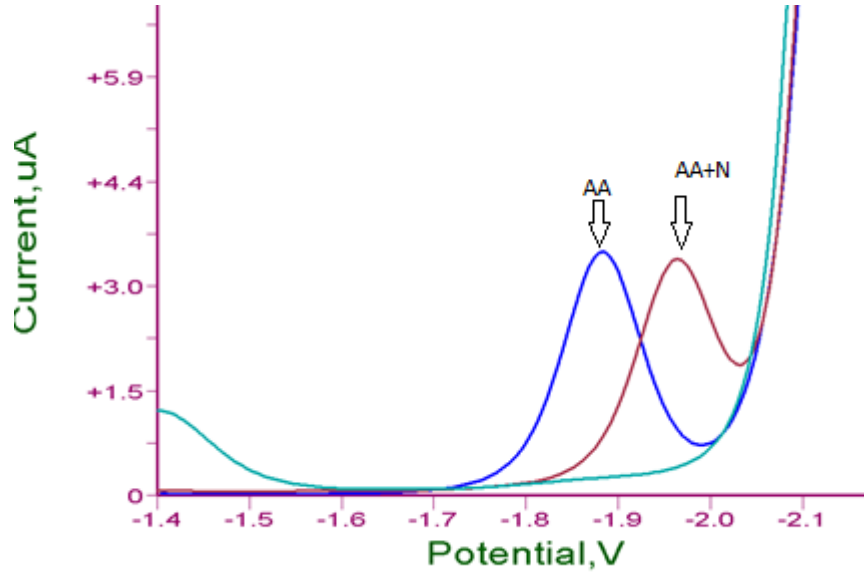
Şekil 4.23. 2×10^{-5} M AA ve 2×10^{-5} M AA + numune voltamogramlar



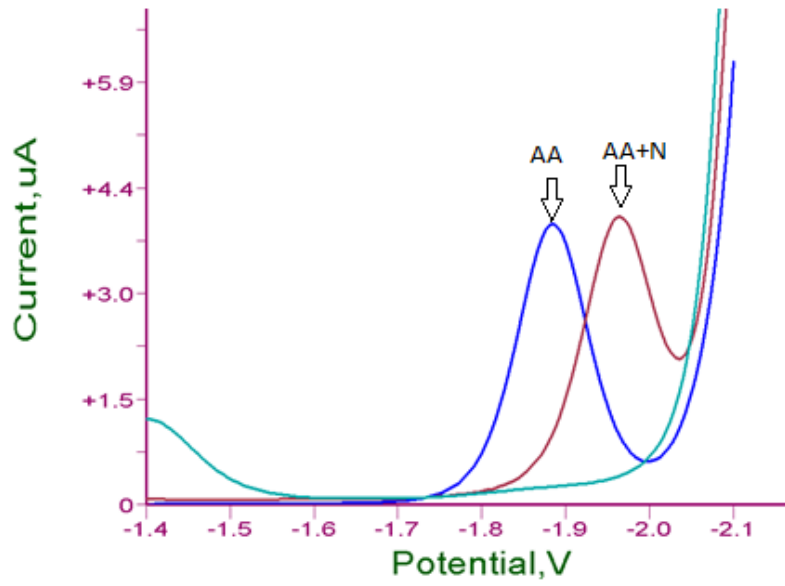
Şekil 4.24. 3×10^{-5} M AA ve 3×10^{-5} M AA + numune voltamogramları



Şekil 4.25. 4×10^{-5} M AA ve 4×10^{-5} M AA + numune voltamogramları



Şekil 4.26. $5 \times 10^{-5} M$ AA ve $5 \times 10^{-5} M$ AA + numune voltamogramları



Şekil 4.27. $6 \times 10^{-5} M$ AA ve $6 \times 10^{-5} M$ AA + numune voltamogramları

Geri kazanımdaki yüzdelere bakıldığında ortalama % 99,3 geri kazanım sağlandığı görülmektedir. Ayrıca geri kazanımdaki bağıl hatalar %2'nin altında kalmıştır.

4.3.4.4. *LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi ve tekrarlanabilirlik – tekrar üretilebilirlik çalışmaları*

Polarografik yöntemle yürütülen çalışmalarda LOD ve LOQ değerleri daha önce yapılmış olan kalibrasyon çalışmasındaki en alt limite göre tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca tekraredilebilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılarak üzerinde durulan yöntemin analitik olarak ne kadar verimli olduğu araştırılmıştır.

Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir. Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman (kısa ve uzun zaman aralığı), kalibrasyon (aynı ekipmanda dahi ölçümler arasında yeniden kalibrasyon yapıp yapılmadığı), operatör (aynı veya değişik operatörler) ve ekipman (ölçümlerde aynı veya farklı ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır.

4.3.4.5. *Tanımlama limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ)*

Tanımlama limiti, örnekte sinyal olarak okunabilen, fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük konsantrasyondur. Tanımlama limiti (LOD) değeri yani analitin, bir “boş”örnektekinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük konsantrasyon düzeyinin, EURACHEM rehberine göre belirlenmesi için kullanılabilecek yöntemler aşağıda verilmiştir [44].

a) 10 tekrar olacak şekilde blank analiz edilir; standart sapması(s) hesaplanır.
 $LOD = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + 3s$

b) 10 tekrar olacak şekilde, mümkün olan en düşük konsantrasyonda spike edilmiş blank analiz edilir (örn: 10 ppb spike); standart sapması (s) hesaplanır. $LOD = 0 + 3s$

c) 10 tekrar olacak şekilde, blank ve mümkün olan en düşük konsantrasyonda spike edilmiş blank analiz edilir (örn: 10 ppb spike); standart sapması (s) hesaplanır.

$LOD = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + 4.65s$ (hipotez testleri ile elde edilen değer)

EURACHEM rehberine göre, tayin limiti (LOQ) belirlenmesi için kullanılabilecek yöntemler ise şunlardır:

a) 10 tekrar olacak şekilde blank analiz edilir, standart sapması(s) hesaplanır.

$LOQ = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + 5s$ ya da,

$LOQ = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + 6s$ ya da,

$LOQ = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + 10s$

b) 10 tekrar olacak şekilde, LOD'ye yakın farklı konsantrasyonlarda spike edilmiş blank analiz edilir, her bir konsantrasyon için standart sapma (s) hesaplanır. s değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir ve grafik incelenerek LOQ için bir değer atanır. Kabul edilebilir düzeyde belirsizlikle tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonunu LOQ olarak belirlenir. IUPAC Orange Book Bölüm 18.4 3.17'de, tayin limiti (LOQ), %10 RSD değerine sahip sonuçlar veren analit miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{s}{ortalama} \cdot 100 \\ 10 &= \frac{s}{LOQ} \cdot 100 \\ 0.1 &= \frac{s}{LOQ} \\ LOQ &= 10s\end{aligned}\tag{4.6}$$

Denklem 4.6'da görüldüğü üzere; tayin limiti (LOQ)=10s formülüne ulaşılmaktadır. Bu durumda, tayin limiti (LOQ) tespiti için; aynı tespit limiti (LOD) belirlenmesinde izlenen yol kullanılarak, standart sapma (s) değeri üzerinden tayin limiti (LOQ) hesabı yapılabilir.

4.3.4.6. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, "r" harfi ile ifade edilmekte olup, tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları ISO 5725-1 'de aynı metot ile eşdeğer örneklerde aynı laboratuvar, aynı ekipman ve aynı analist tarafından kısa zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçları elde edilmesi olarak tanımlanmıştır.

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değer, tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin tipine dayanır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağıl standart sapma %1 den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabilirken, biyolojik örnek için %15' den fazla ve diğer konsantrasyon seviyelerinde %10 bağıl standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. Çevresel ve besin örneklerinde kesinlik, daha çok örnek matrisine dayanır. Ayrıca kesinlik, analit konsantrasyonuna, analiz tekniğine bağlı olup bağıl standart sapma %2 ve %20 den fazlaya kadar çeşitlilik gösterebilir.

Ölçülmüş standart farklılığı üç kategoriye ayrılabilir; tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekraryapılabilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir. Tekrarlanabilirlik bir laboratuvarında bir analizci ve bir cihaz kullanılarak kısa bir zaman diliminde sağlanır.

İlgili standarda göre, iki test sonucunun alındığı durumlarda (iki paralel çalışıldığında) tekrarlanabilirlik limiti (r), şu şekilde hesaplanmaktadır (Denklem 4.7).

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} \sigma_r = 2.8 \sigma_r \quad (4.7)$$

t_{∞} : 1.96 (t tablosunda, %95 güven aralığı, ∞ serbestlik derecesi için elde edilen değer)

σ_r : Tekrarlanabilirlik şartları altında elde edilen iki deney sonucunun standart sapmasıdır.

n tane test sonucunun alındığı durumlarda tekrarlanabilirlik limiti (r) Denklem 4.8’de verilmiştir.

$$r = CR_{0.95}(n) = f(n) \sigma_r \quad (4.8)$$

Burada;

$CR_{0.95}(n)$: n sayıda test sonucu için kritik aralık

$f(n)$: Kritik aralık faktörü

σ_r : Tekrarlanabilirlik şartları altında elde edilen n sayıdaki deney sonucunun standart sapmasıdır.

4.3.4.7. Tekrarüretilebilirlik

Tekrarüretilebilirlik yani uyarlılık ise “R” harfi ile ifade edilmektedir ve tekrarüretilebilirlik koşulları altında elde edilen kesinliktir. Tekrarüretilebilirlik koşulları standartta aynı metot ile eşdeğer örneklerde farklı laboratuvarında, farklı ekipman ve farklı analist tarafından uzun zaman aralığında elde edilen bağımsız test sonuçlarının elde edilmesi olarak tanımlanmıştır. Eurachem rehberinde tekrarüretilebilirlik, laboratuvarlar

arası (inter-laboratory) tekrar üretilebilirlik ve laboratuvar içi (intra-laboratory) tekrarüretilebilirlik olarak ikiye ayrılmıştır.

Hem tekrarlanabilirlik hemde tekrarüretilebilirlik analit konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği için değişik konsantrasyonlarda (düşük, orta, yüksek gibi) tespit edilmelidir. Kesinliğin relatif standart sapma olarak ifadesi konsantrasyondan bağımsız hale getireceği için kullanımda tercih edilmektedir.

4.3.4.8. **Grubb testi**

Grubb testi ise, ormal dağılımda sapan verilerin tespit edilmesi için kullanılır. Sapma şüpesi olan en yüksek (x_p) ve en düşük (x_1) değerler aşağıdaki formülde yerlerine konularak Grubb testi uygulanır (Şekil 4.28).

$$G_p = \frac{(x_p - \bar{x})}{s}$$
$$G_1 = \frac{(\bar{x} - x_1)}{s}$$
$$\bar{x} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_i$$
$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}$$

Şekil 4.28. Grubb testi formül

Formüldeki değer Grubb test değerlendirme tablosundaki değer ile karşılaştırılır.

Sonuç kendi kritik değerinin %5'ine eşit veya bu değerden daha az ise, denenen madde doğru olarak kabul edilir.

Sonuç kendi kritik değerinin %5'inden büyük ve kendi kritik değerinin %1'inden küçük veya buna eşit ise, denenen madde uzakta kalan olarak adlandırılır ve tek bir yıldız işareti ile belirtilir.

Deney istatistiği kendi kritik değerinin %1'inden daha büyük ise, madde istatistiki açıdan değerlendirme dışı bırakılan olarak adlandırılır ve çift yıldız işareti ile belirtilir.

4.3.4.9. Horwitz oranı (HorRat)

Horwitz oranı (HorRat) veya değeri basit bir performans parametresi olup kimyasal metotların kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda bilgi verir (Şekil 4.29). Her ne kadar laboratuvarlar arası relatif standart sapma (RSDR) ile ilgili geliştirilmiş olsa da laboratuvar içi relatif standart sapma (RSDr) = $RSDR_{\text{öngörülen}}$ içinde uygulanabilmektedir. HorRat değeri 2’den daha küçük olmalıdır.

- HorRat $\leq 0,5$ ise metot tekrarüretilebilirliği çok düşüktür ve çalışmanın bağımsızlığında sorun vardır.
- $0,5 < \text{HorRat} \leq 1,5$ ise metot tekrarüretilebilirlik beklenen şekilde normaldir.
- HorRat $> 1,5$ ise metot tekrarüretilebilirliği beklenenden daha yüksektir.

Çalışmada gözden geçirme yapılması faydalı olacaktır.

- HorRat > 2 ise metot tekrarüretilebilirliğinde sorun vardır.

HorRat hesabı için aşağıdaki formüller kullanılır. Formülde yer alan "C" değeri konsantrasyon (mg/g, g/kg vb.) olup örneğin 100 g/100 g için 1, 1000 mg/kg için 0,001 ve 1 mg/kg için 0,000001 dir.

$$\text{HorRat} = \frac{RSD_{\text{elde edilen}}}{RSD_{\text{öngörülen}}}$$
$$RSD_{\text{öngörülen}} = 2^{(1-0,5 \text{Log} C)}$$

Şekil 4.29. Horrat formülü

4.3.4.10. Doğruluk parametrelerinin pratikte kullanımı

Tekrarlanabilirlik Limiti; Tekrarlanabilirlik şartları altında elde edilen iki analiz sonucu arasında %95 olasılıklar olması beklenen maksimum farktır. Tekrarlanabilirlik limiti "r" ile ifade edilir ve tekrarlanabilirlik standart sapmasının 2,8 ($1,96 \times \sqrt{2}$) ile çarpılmasından elde edilir (Denklem 4.9).

$$r = 2.8 \times sr \quad (4.9)$$

Tekrarüretilebilirlik Limiti; Tekrarüretilebilirlik şartları altında elde edilen iki analiz sonucu arasında %95 olasılıklar olması beklenen maksimum farktır. Tekrarlanabilirlik limiti "R" ile ifade edilir ve tekrarüretilebilirlik standart sapmasının 2,8 ile çarpılmasından elde edilir. İki test sonucu tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edildiğinde iki sonuç arasındaki mutlak fark tekrarlanabilirlik limiti ile karşılaştırılır.

4.3.4.11. LOD ve LOQ çalışmaları

Bu amaçla daha önce kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla belirlenen en düşük derişime göre akrilamid için alınan voltamogramlar için son derişim 0,2 ppm olacak şekilde $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid içeren galeta (rusk) numunesine eklenerek hazırlanan standart numunesinin 6'şar okuması yapılarak cihazın ölçüm yapması sağlanmış, elde edilen voltamogramlardaki piklerin akımlarından yola çıkılarak, kalibrasyon grafiğine göre konsantrasyonlarına geçilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara göre geri kazanımlar Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi t değerimiz 0,5951 olarak tespit edilmiştir. %95 güvenilirlik aralığı ve k=2 için tablo değeri 2,571 olarak okunmuştur. Buna göre $t < t(\text{kritik})$ olduğundan ölçüm sonuçlarımız analitik olarak uygundur. Ayrıca LOD ve LOQ değerlerimiz de sırasıyla 0,01 ppm ve 0,03 ppm olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5. LOD ve LOQ çalışmaları

Ölçüm no	Referans Değer (ppm)	Bulunan Değer (ppm)	Geri Kazanım oranı (%)
1	0,2	0,205	103
2	0,2	0,200	100
3	0,2	0,197	99
4	0,2	0,195	98
5	0,2	0,198	99
6	0,2	0,200	100
ORT		0,199	99,83
SD		0,003	1,72
%RSD		1,72	1,72
Decimal Ortalama		2,0E-07	2,0E-07
RSDr		10,197	10,197
Horrat		0,36	0,36
n		6	6
sd/karekök(n)			0,01504
t			0,5951
tcr			2,571
LOD		0,01	
LOQ		0,03	

AOAC Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals kaynağına göre farklı konsantrasyonlar için Performans Kriterleri Tablo 4.6.'da verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda yapılan geri kazanım çalışması sonucunda elde edilen akrilamid verileri bu tabloda tavsiye edilen değerler içinde kalmaktadır [45-47].

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlar için performans kriterleri

Konsantrasyon	Geri kazanım (%)	Hedef RSD (%)
100%	98-101	1
10%	95-102	1,5
1%	92-105	2
0.1%	90-108	3
0.01%	85-110	4
10 µg/g (ppm)	80-115	6
1 µg/g	75-120	8
10 µg/kg (ppb)	70-125	15

4.3.4.12. Tekraredilebilirlik çalışmaları

Tekraredilebilirlik çalışmaları için, farklı günlerde, farklı derişimlerde hazırlanan 10'ar adet örneğin ölçümleri alınmıştır. $2,08 \times 10^{-7}$ M akrilamid içeren tost ekmeği numunesi üzerine sırasıyla düşük orta ve yüksek derişimlerde standart akrilamid çözeltisi eklenmiş ve son derişimlerin sırasıyla 1×10^{-5} M, 3×10^{-5} M ve 6×10^{-5} M olması sağlanarak, voltamogramları alınmıştır. Elde edilen pik akımlarından yola çıkılarak derişimlere geçilmiş ve Excell'de hazırlanan verilere göre çalışmamız analitik açıdan değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.7'de görülmektedir.

Tablo 4.7.'de görülen sonuçlara göre tekrarlanabilirlik koşullarında yapılan ölçümlerde Horrat r değerinin tamamının 1,5'in altında olması dolayı ölçüm sonuçlarımızın kabul edilebilirliğini göstermektedir. Grups yüksek ve Grups düşük değerleri grups tablo değerinden küçük olması ve RSD'lerin %RSD'lerden büyük olması yapmış olduğumuz çalışmanın kabul edilir olduğunu göstermektedir [45-47].

Tablo 4.7. Tekraredilebilirlik sonuçları, galeta (rusk) numunesi ($2,08 \times 10^{-7}$ M)

	1E-5M	3E-5M	6E-5M
Tekrarlanabilirlik	(0,711ppm)	(2,133ppm)	(4,266ppm)
	0,72	2,15	4,30
	0,68	2,20	4,10
	0,70	2,00	4,25
	0,72	2,10	4,20
	0,68	1,98	4,30
	0,75	2,00	4,28
	0,68	2,10	4,15
	0,73	2,00	4,20
	0,70	2,10	4,35
	0,75	1,98	4,26
ORT	0,71	2,06	4,24
SD	0,027	0,074	0,076
Min	0,68	1,98	4,1
MAK	0,75	2,2	4,35
Grups düşük	1,137	1,025	1,824
Uygunluk	Ok	Ok	Ok
Grups Yüksek	1,430	1,943	1,456
Uygunluk	OK	OK	OK
Grup tablo değeri (n=10)	2,18	2,18	2,18
%RSD	3,835	3,605	1,798
RSDr	8,420	7,176	6,436
RSDR	16,839	14,352	12,871
(Min-Mak)	0,07	0,22	0,25
r	0,122	0,333	0,342
Horrat	0,23	0,22	0,14

RSDR=Tekrarüretilebilirlik koşulları altındaki relatif standart sapma

Horwitz eşitliğinden hesaplanan RSDR= $2^{(1-0,5 \log c)}$

RSDr= Tekrarlanabilirlik koşulları altındaki izin verilen relatif standart sapma

RSDr = 0,50* RSDR

Horrat r = RSDr (bulunan) / RSDR (%RSD / RSDR)

4.3.4.13. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları

Uygulamış olduğumuz analitik yöntemin kesinliğinin belirlenmesi amacıyla aynı laboratuvar ve aynı cihaz kullanılmak koşulu ile farklı tarihlerde hazırlanan düşük orta ve yüksek derişimlerdeki tost ekmeği numunelerinin aynı gün için A ve B setleri şeklinde 2'şerli okumaları yapılmıştır. Böylece farklı günlerde günler arası değişimlerin olup olmadığı incelenmeye çalışılmıştır. Farklı günlerde aynı derişim için toplamda 6 okuma yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tekrarüretilebilirlik çalışmaları için de, elde edilen voltamogramlardan yararlanılarak, aşağıdaki hesaplamalar için kullanılan akım değerleri okunmuş ve bu akım değerleri yardımıyla çözelti derişimine, oradan da akrilamid miktarına geçilerek aşağıdaki tablolar elde edilmiştir.

Tablo 4.8. Tekrarüretilebilirlik çalışmaları

Ürün:								
Tost								
Ekmeği	Tarih	A(ppm)	B(ppm)	ORTALAMA	A-B	$[(A-B)/ORT]^2$	r	Sonuç
1*10 ⁻⁵ M (0,711ppm)	1.hafta	0,72	0,75	0,74	0,03	0,00167	0,09	OK
	2.hafta	0,71	0,65	0,68	0,06	0,00779	0,09	OK
	3.hafta	0,68	0,63	0,66	0,05	0,00583	0,09	OK
	4.hafta	0,69	0,72	0,71	0,03	0,00181	0,09	OK
	5.hafta	0,73	0,77	0,75	0,04	0,00284	0,09	OK
	6.hafta	0,68	0,71	0,70	0,03	0,00186	0,09	OK
		ortalama		0,70				
		std		0,0344				
		%RSD		4,87				
		RSDR		16,87				
		RSDr		8,427				
		HorratR		0,29				

RSDR=Tekrarüretilebilirlik koşulları altındaki relatif standart sapma

Horwitz eşitliğinden hesaplanan RSDR= $2^{(1-0,5\log c)}$

RSDr= Tekrarlanabilirlik koşulları altındaki izin verilen relatif standart sapma

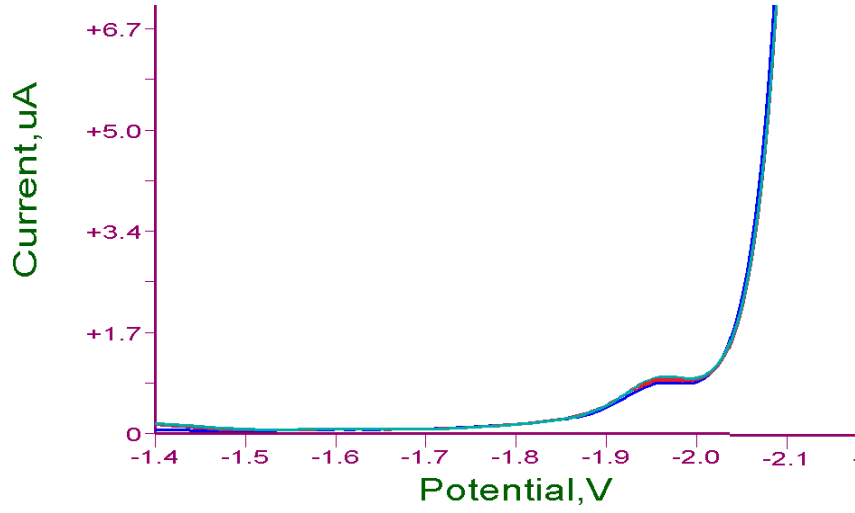
RSDr = 0,50* RSDR

Horrat r = RSDr (bulunan) / RSDR (%RSD / RSDR)

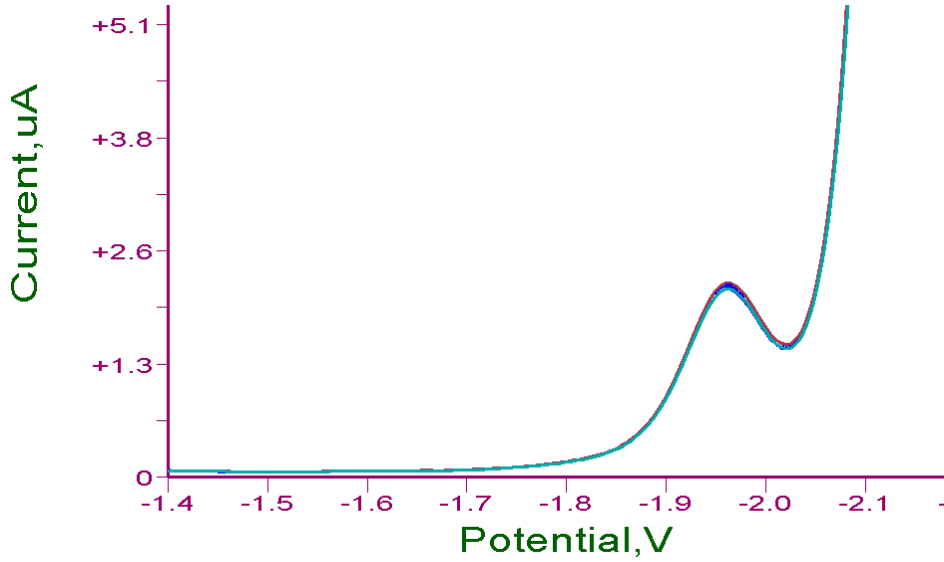
Tekrarüretilebilirlik çalışmalarına bakıldığında farklı tarihlerde rusk numunesi ile paralel çalışmalar yapılmıştır. Paraleller arasındaki farkın (A-B) tekrarlanabilirlik limiti (r)'den küçük olması, %RSD'lerin çalışma aralığı için tablo değerlerine uyması, Horrat

R değeri < 1,5 olması, ayrıca RSD'lerin %RSD'lerden büyük olması yapmış olduğumuz çalışmanın doğruluğunu göstermektedir.

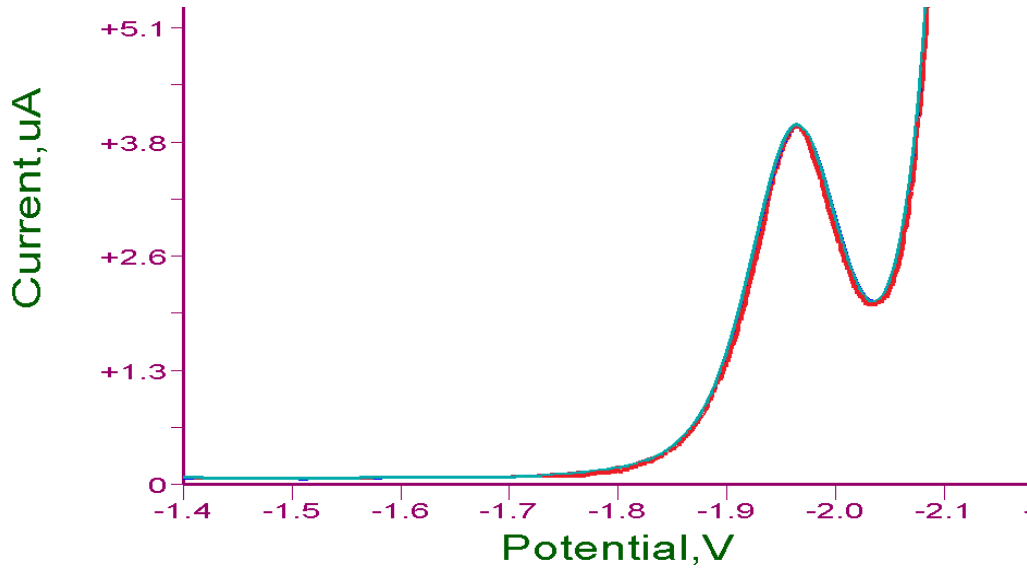
Bu çalışmalar için düşük, orta ve yüksek derişimlerde elde edilen akrilamid voltamogramları da aşağıda verilmiştir (Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32).



Şekil 4.30. 1×10^{-5} M (0,71ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları



Şekil 4.31. 3×10^{-5} M (2,13ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları



Şekil 4.32. $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (4,26ppm) akrilamid içeren çözeltilerin üst üste çakıştırılmış voltamogramları

Bu çalışmada yapılan analitik değerlendirmeler de excell çalışmaları için kaynak olarak “The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM”, “Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC) Technical Repor” ve “ VAm Project Development and Harmonisation of measurement Uncertainty Principles (LGC)” kullanılmıştır.

Voltametrik çalışmalardan elde edilen tüm sonuçlar farklı konsantrasyonlar için verilen performans kriterleri tablo değerlerine göre kıyaslanmış ve değerlendirilmiştir. [45-47].

5. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ ÇALIŞMALARI

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yüksek ayırma gücünün yanı sıra, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi analitik açıdan son derece önemli özelliklerinden dolayı hemen her çeşit numunenin analizinde kullanılabilen etkili bir ayırma tekniğidir. Miktar tayininin söz konusu olduğu tüm kalite kontrol laboratuvarlarında sıvı kromatografisi sistemleri vazgeçilemez bir yere ve üstünlüğe sahiptir. YPSK kullanımı sonucunda elde edilen sonuçlardaki istatistiksel uyum ve kesinlik, bu yönteme ait dezavantajlar olarak bilinen çözücü maliyeti, yüksek saflıkta çözücü kullanımı ve uzun analiz süresi gibi parametreleri önemsiz kılmaktadır. Genel olarak, kullanılan detektöre de bağlı olmak koşuluyla, çok düşük derişimlerdeki tayinlere olanak sağlaması da YPSK

için ayrıca bir üstünlüktür. YPSK tekniği ile yapılan çalışmaların ve yayınlanan makalelerin uluslararası saygın kurum, kuruluş ve basımevlerince öncelikli olarak kabul görmesi de kullanılan tekniğin geçerliliğini göstermektedir. Bu yöntem sayesinde bilim dünyasının son yıllarda üzerinde önemle durduğu ve geçerliliğini günden güne arttıran konulardan olan akrilamidin gıdalardaki analizi ve hangi grup besinlerde hangi miktarlarda bulunduğu saptanması da kolaylıkla ele alınabilir hale gelmiştir.

YPSK tekniği kullanarak gıdalardaki akrilamid içeriğinin saptanması çalışmalarına yöntem geliştirme aşaması ile başlanmıştır. Tayin için özgün bir analiz yönteminin geliştirilebilmesi için sabit ve hareketli faz seçimi, uygun analiz koşulların belirlenmesi ve yöntem geçerliliğinin araştırılması basamaklarından sonra geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulanması aşaması da tamamlanmış ve yürütülen çalışmalar sonucunda özgün değeri yüksek ve uygulamada pratik bir analiz gerçekleştirilmiştir. Akrilamidin ülkemizde üretilen gıdalardaki miktarının tayini için kullanılabilecek uygun bir analiz yönteminin geliştirilmesi çalışmalarına, evrensel bir yöntem olan UV-spektrofotometrisi ile akrilamidin UV ve görünür bölgedeki davranışlarının incelenmesi ile başlanmıştır.

5.1. Kullanılan Cihazlar

Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan LC-20AT model gradient pompa, CBM-20A model iletişim ünitesi, CTO-10ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model foto diyet dizisi detektörü ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

UV-spektrofotometrisi ile yapılan incelemelerde Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan UV-2401 PC model çift ışık yollu UV-spektrofotometresi kullanılmıştır. Veriler UV/PC Personal Spectroscopy Software Version 3,7 programı tarafından işlenmiştir.

Numunelerin ve çözeltilerin hazırlanmasında Heidolph (Almanya) marka Reax Top model vorteks, Bandelin (Almanya) marka RK 100H model ultrasonik banyo, Sigma (Almanya) marka 1-6 model santrifüj, Ohaus (İsviçre) marka 23 Explorer E12140 model analitik terazi, 100-1000 µL ve 10-200 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, 0,2 µm gözenek çapına sahip Orange Scientific (Belçika) marka 13 mm çaplı steril PVDF membran filtreler ve 0.2 µm gözenek çapına sahip Orange Scientific (Belçika) marka 35 mm çaplı steril selüloz asetat membran filtreler kullanılmıştır.

Numune analizlerinde akrilamide girişim yapması muhtemel maddelerin temizlenmesi için kullanılan ve 30 µm partikül çaplı 30 mg dolgu maddesi içeren 1 mL hacimli Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşları Waters (ABD) firmasından kullanılmıştır.

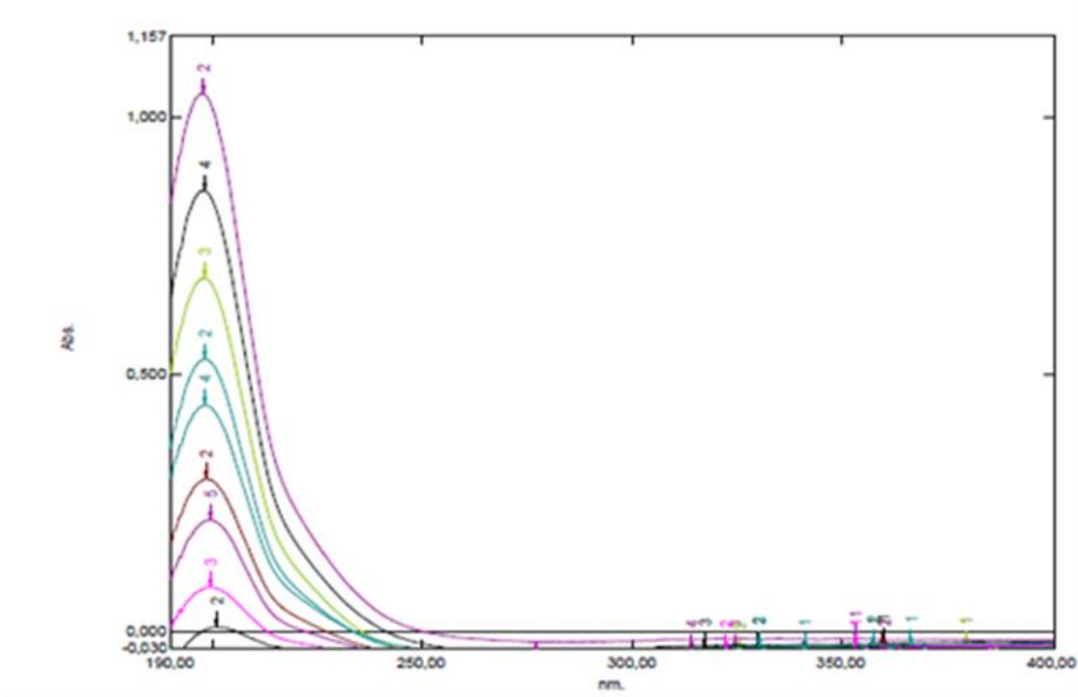
Ayırma ve miktar tayini işlemleri 3 µm çapında partikül içeren 150 x 4.6 mm. boyutlarındaki GL Science (Japonya) marka Inertsil ODS-3 ters faz kolonu kullanılarak yapılmıştır.

5.2. UV- Spektrofotometresi

Akrilamidin ülkemizde üretilen gıdalardaki miktarının tayini için kullanılabilecek uygun bir analiz yönteminin geliştirilmesi çalışmalarına, evrensel bir yöntem olan UV-spektrofotometrisi ile akrilamidin UV ve görünür bölgedeki davranışlarının incelenmesi ile başlanmıştır. Akrilamidin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle, çözücü olarak su kullanılarak 1×10^{-3} M (0,071 mg.mL-71 ppm) derişiminde akrilamid stok çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltiden bir seri seyreltme yapılarak maddenin UV-görünür bölgedeki absorpsiyonu incelenmiştir. Destekleyici bilgi sağlaması açısından akrilamidin kimyasal yapısı da değerlendirilmiş ve π elektronlarından kaynaklı sınırlı bir konjügasyona sahip olması nedeniyle UV bölgede tayin için kuvvetli kromofor gruplara sahip olmadığı ve floresans vermediği sonucuna varılmıştır. Yapılan ön denemelerde maddenin UV bölgedeki spektrumu alınmış ve beklendiği gibi özellikle uzun dalga boylarında absorpsiyona rastlanmamıştır (Şekil 5.1). Ancak yapılan deneylerde 200 nm yakınlarında belirgin absorbans sinyali gözlenmiş ve hazırlanan bir seri kalibrasyon çözeltisinin analizi ile akrilamidin belirtilen dalga boyunda Denklem 5.1'e uyan, derişime bağlı doğrusal yanıtlar verdiği tespit edilmiştir.

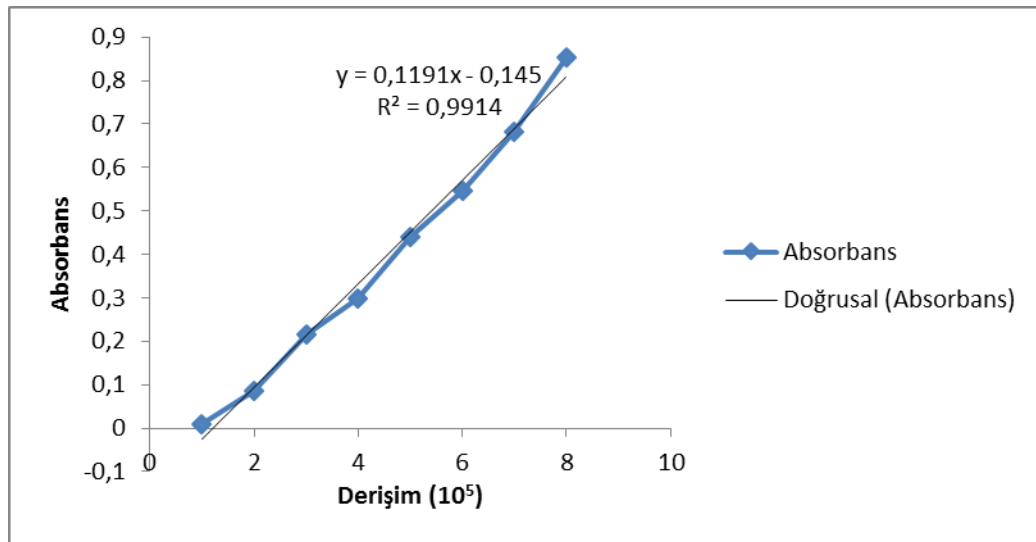
$$A = 0,1191 \times M - 0,145 \quad (r = 0.99) \quad (5.1)$$

Burada, A: absorbans; M: molarite'dir.



Şekil 5.1. Akrilamidin 190-400 nm aralığındaki UV-görünür bölgedeki spektrumu ($1 \times 10^{-5} M$ - $9 \times 10^{-5} M$)

Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak Derişim-Absorbans grafiğı oluşturulmuş ve korelasyon katsayısı (r) ve eğim bulunmuştur (Şekil 5.2, Tablo 5.1).



Şekil 5.2. Akrilamid çözeltisi ($1 \times 10^{-5} M$ - $9 \times 10^{-5} M$) için derişim-absorbans kalibrasyon grafiğı

Tablo 5.1. *Akrilamidin UV-spektrofotometrik analizine ilişkin veriler*

Parametre	Değer
Tarama Aralığı	190 nm – 400 nm
Tarama Modu	Hızlı
Aralık Genişliği	1,0
Ölçüm Aralığı	0,05
Derişim	$1,60 \times 10^{-4}$ M (11,4 ppm)
Dalgaboyu (nm.)	200
Absorbans	1,059

5.3. Yöntemler

5.3.1. Hareketli fazın hazırlanışı

Analizler boyunca isokratik sisteme dayalı bir hareketli faz akışı kullanılmıştır. Asetonitril: su (2: 98, *h/h*) bileşimindeki hareketli faz çözeltisi 250 mL’lik porsiyonlar halinde A kalite cam malzeme kullanılarak hazırlanmış, çözünmüş gazların uzaklaştırılması için 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiş ve devamında 0,2 µm gözenek çaplı steril selüloz asetat filtreden süzülerek kullanılmıştır.

5.3.2. Standart çözeltilerin hazırlanışı

Akrilamid standart stok çözeltisi, 7,1 mg standart madde tartılıp 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi $0,99 \times 10^{-3}$ M (0,071 mg.mL⁻¹ 71 ppm) olarak hesaplanmıştır. Bu çözelti deneylerin yürütüldüğü çalışma aralığına bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir.

5.3.3. Akrilamidin numunelerden ekstraksiyonu

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde çalışma koşulları belirlendikten sonra, LOD ve LOQ çalışmaları, geri kazanım çalışmaları, yöntemin doğruluk ve kesinlik parametreleri için tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, içerdikleri akrilamid miktarları belli olan, sertifikaları Ek1’ de verilen galeta (rusk) numunesi kullanılmıştır.

Daha sonra yine sertifikaları ekte verilen içerdği akrilamid miktarları belli olan, tost ekmeği (tosted bread) ve gevrek (crispbread) numuneleri analiz edilmiştir. Bu numunelerin sertifikaları Ek2 ve Ek3’ de verilmiştir.

Elimizde bulunan içerisindeki akrilamid miktarı belli olan tost ekmeği ve gevrek numunelerinden belirli derişimlerde çözeltiler hazırlanmış ve üzerlerine akrilamid standartı eklenerek, yöntemin doğruluğunun saptanması için geri kazanım, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için tüp içeriğine 10 mL bidistile su eklenmiş, içerik el ile 30 saniye çalkalandıktan sonra vorteks ile 90 saniye boyunca 2500 rpm devirde karıştırılmıştır.

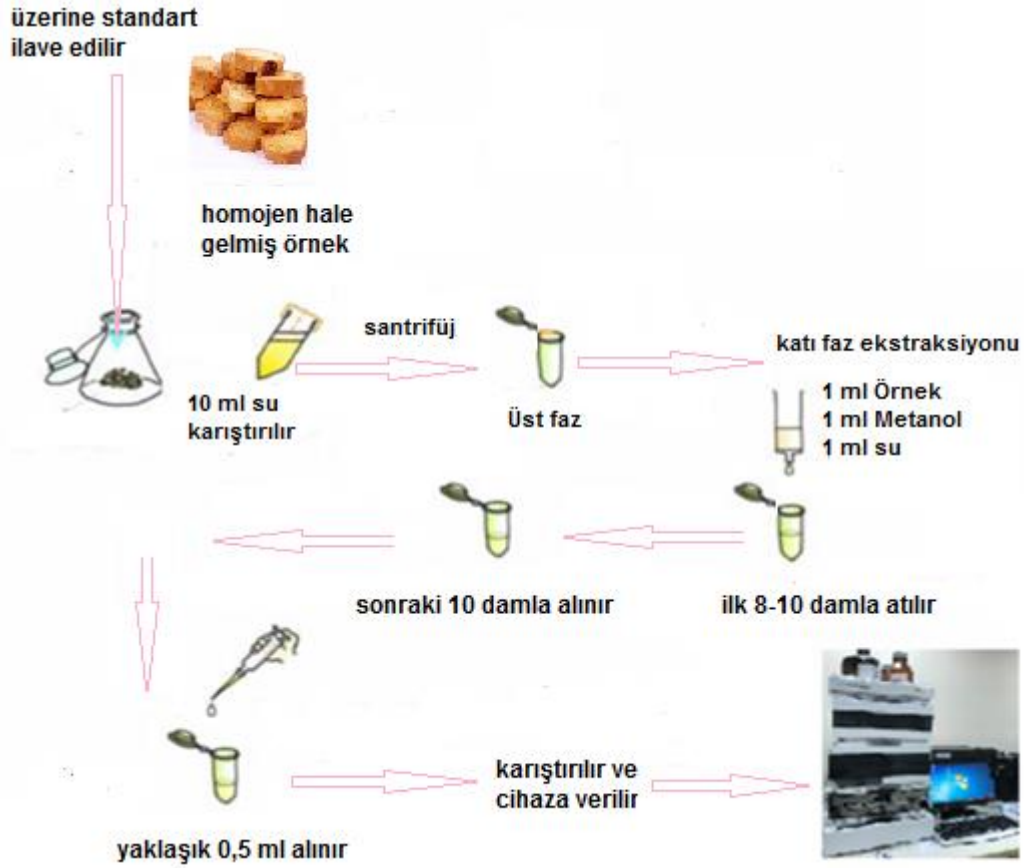
Karışım 5600 rpm (3000 x g) devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısımdan 2-3 mL alınmış ve 0,2 µm gözenek çaplı PVDF filtreden süzölmüştür. Ekstraksiyon işlemi bu şekilde tamamlandıktan sonra elde edilen çözelti katı faz ekstraksiyon kartuşu ile temizleme için kullanılmıştır.

5.3.4. Akrilamid ekstratelerının katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmesi

PVDF filtreden süzme işlemi sonrasında toplanan süzöntü katı faz ekstraksiyonu ile temizleme için kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu kartuşları, akrilamidin polar özellikli bir madde olması nedeniyle ters faz prensibine göre çalışan Oasis HLB SPE kartuşunun (Waters) kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu kartuşlardan sırasıyla 1 mL metanol ve 1 mL bidistile su geçirilerek kolon şartlandırılmış ve süzöntünün 1 mL'si önceden şartlandırılmış olan bu kartuşlardan geçirilerek temizlenmiştir. Temizleme işlemi sırasında kartuştan çıkan ilk 10-12 damla atılmış, sonrasındaki 10 damla (yaklaşık 0,5 mL) analiz işlemleri için kullanılmıştır [48].

Aşağıdaki şekilde ekstraksiyon ve temizleme işlemleri şematik olarak verilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil. 5.3. Ekstraksiyon ve temizleme işlemleri]

5.3.5. Analiz parametreleri

UV-spektrofotometrisi ile yapılan ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu tespit edebilmek amacıyla 200 – 400 nm dalga boyu aralığında 0.1 nm duyarlılıkta spektrum taraması yapılmıştır.

YPSK analizleri için asetonitril: su (2: 98, h/h) bileşiminde hazırlanan hareketli faz kolona 0.4 mL.dak-1 akış hızıyla gönderilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 25 °C olarak seçilmiştir. Analitlerin detektör yanıtları 200 nm dalga boyuna ayarlı foto diyot dizisi detektör ile ölçülmüş ve cihaza bağlı bilgisayara kaydedilmiştir.

Analizlerde katı faz ekstraksiyonu kartuşundan geçirilerek elde edilen temizlenmiş numuneye analizden hemen önce sabit derişimdeki metakrilamid çözeltisi katılmıştır. Analizlerde akrilamid ve metakrilamid sinyalleri sırasıyla 6.3 ± 0.1 dakikada gözlenmiş ve analizler 10. dakikada sonlandırılmıştır. Numunelerin katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmesi nedeniyle kolonun analiz dışı apolar maddelerden arındırılması için ek bir yıkama programı uygulanmamıştır.

Her 10 analiz sonrasında kolondan asetonitril: su (30: 70, *h/h*) çözeltisi geçirilmiş ve kolonun tekrar şartlanması sağlanmıştır.

5.3.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazında yapılan çalışmalar

YPSK analizleri için yöntem geliştirme çalışmalarına maddenin kromatografi kolonunda yeterli süre tutunabilmesi için uygun kolon (sabit faz) ve hareketli faz seçimi ile başlanmıştır. Akrilamidin çok yüksek polaritede (oktanol/su dağılım katsayısı $\log P = -0.78$) bir madde olması nedeniyle ters faz kolonlarda düşük tutunma gösterebileceği düşünülmüştür. Ters faz kromatografi kolonları üzerine geniş çaplı bir inceleme başlatılmış, bu noktada C8 ve C18 yapısında dolgu maddeleri ile doldurulmuş YPSK kolonları iç yüzey alanı, boyut, içerdiği silika yapısı gibi parametreler açısından incelenerek maddeyi tutabilecek güçte, yüksek verimliliğe sahip bir kolon araştırılmıştır. Yapılan incelemelerde C8 dolgu maddeli kolonların yeterli apolar yapıya sahip olmadıkları için akrilamidi alıkoymada yetersiz kalacağı düşüncesine varılmış ve seçenek dışı bırakılmıştır. C18 dolgu maddeli kolonlardan Supelco, Teknokroma, Phenomenex ve GL Sciences firmalarının üretimi olan ve Nucleosil, Hypersil ve Inertsil dolgu maddeleri ile doldurulmuş kolonlar incelenmiştir. Avantaj – dezavantaj ilişkilendirmesi yapılarak yürütülen incelemelerde tümü 4.6 mm çapında olan 100, 150 ve 250 mm uzunluklarındaki kolonlardan 250 mm uzunluğundakilerin akrilamidi fazlaca tutabileceği, gereksiz çözücü sarfiyatına yol açacağı, analiz süresini ve maliyetini artırabileceği, 100 mm’lik kolonların ise diğerlerine kıyasla kısa olmaları nedeniyle maddelerin ayırım katsayısını düşürebileceği, dolayısıyla da yeterli kalitede bir ayırım yapılamayacağı düşünülmüştür. İncelemelerde oktadesil silan (ODS) yapısının kimyasal çeşitlenmeleri olan ODS, ODS–2 ve ODS–3 üzerinde de durulmuş, ODS–2 kolonların karbon yükünün fazla olmasına rağmen ODS–3 kolonların diğerlerine göre en az %50 daha fazla yüzey alanına sahip olduğu düşünülerek, kısa sürede yüksek çözünürlükle madde analizine olanak sağlaması bakımından ODS–3 kolonların kullanılmasına karar verilmiştir. Bir başka değişken olarak kolon dolgu maddelerinin çaplarının analize olası etkileri de değerlendirilmiştir. 3 ve 5 µm partikül çaplı kolonlara yönelik olarak yapılan değerlendirmede düşük partikül çaplı kolonların yüksek geri basınç oluşturmalarına karşılık, aynı uzunluktaki 5 µm çaplı partikül içeren kolonlara göre daha iyi ayırım sağladığı düşünülmüş bu nedenle çözünürlüğü artırmak için 3 µm partikül çaplı kolon kullanılmasının yararlı olacağına karar verilmiştir. Sonuçta, GL Sciences firmasının ürünü olan 3 µm partikül çaplı Inertsil

ODS-3 dolgu maddesi ile doldurulmuş olan 4,6 x 150 mm boyutlarındaki YPSK kolonun kullanılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara genel kullanıma sahip, görece ucuz YPSK çözücüler olan metanol, asetonitril ve su bileşimli hareketli fazların denenmesi ile başlanmıştır [48].

Bu çalışmalarda akrilamidin yüksek polariteye sahip olması dolayısıyla hareketli fazın apolarlığı son derece düşük tutulmaya çalışılmış, bu nedenle hareketli faz bileşimindeki organik çözücü oranları hacimce %5'in üzerine çıkarılmamıştır. Çalışmalarda akrilamidin kolonda kalmasını en fazla %100 sulu hareketli fazın sağladığı saptanmış ancak %100 sulu çözeltilerin kolon ömrünü azaltacağı ve uzun vadede kolona zarar verebileceği düşüncesiyle bu hareketli fazdan vazgeçilmiştir.

Metanol-su ve asetonitril-su bileşimine sahip hareketli fazlar üzerine yapılan değerlendirmede ise birbiri yerine kullanılmaya oldukça uygun olan bu çözeltilerden asetonitril-su çözeltisi daha düşük viskozite ve daha yüksek ayırma verimi sağladığı için uygulamada tercih edilmiştir. İncelemelerde, asetonitrili %2 (*h/h*) oranında içeren sulu hareketli fazın akrilamidin uygun değerde tutunmasını sağladığı görülmüş ve bu hareketli fazın çalışma boyunca kullanılmasına karar verilmiştir [48].

Akış hızının akrilamidin tutunmasına ve sinyal büyüklüklerine yaptığı etkinin incelenebilmesi için bir seri deney yürütülmüştür. Çalışmalarda akrilamid ($1,25 \times 10^{-7}$ M, 9,02 ng.mL-9,02 ppb) içeren standart çözelti, daha önce tespit edilen hareketli faz ve kolon şartlarında, akış hızı 0.2 – 1,0 mL.dak⁻¹ aralığında değiştirilerek analiz edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Deneyler sonucunda akış hızı düştükçe akrilamidin kolondan çıkış sürelerinin uzadığı, pik alanlarının büyüdüğü, pik tabanlarının genişlediği ve pik morfolojilerinin simetrisini kaybederek kötüleştiği; akış hızı artırıldığında ise geliş zamanlarının azaldığı, pik tabanlarının daraldığı, sinyal alanlarının azaldığı ve pik morfolojilerinin düzeldiği tespit edilmiştir.

Akrilamidin tutunma zamanının ve sinyal şiddetinin akış hızına bağlı değişimleri Denklem 5.2 ve Denklem 5.3'te verilmiştir.

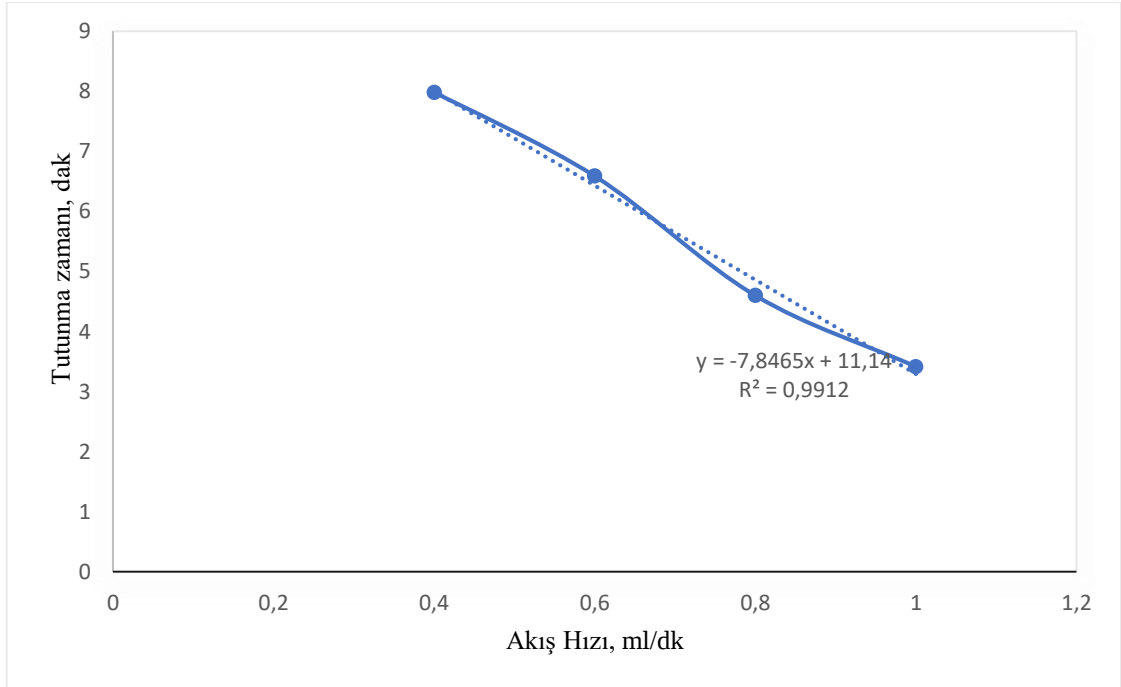
$$T_R = -7.8465 \times FR + 11.14 \quad (r = -0.99123) \quad (5.2)$$

Burada, TR: tutunma zamanı; FR: akış hızı; r: korelasyon katsayısı'dır.

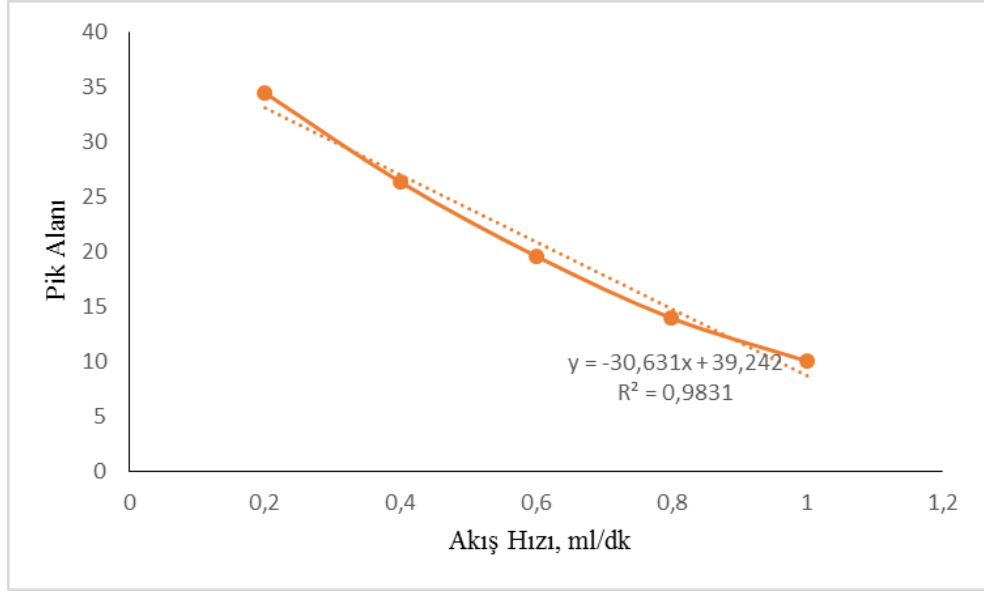
$$A = -30,631 \times F_R + 39,242 \quad (r = -0.9831) \quad (5.3)$$

Burada, A: alan; FR: akış hızı; r: korelasyon katsayısı'dır.

Olumsuz bir etken olarak, akış hızının artışıyla birlikte kolon basıncının çok yüksek değerlere ulaştığı (yaklaşık 170 bar) tespit edilmiş, dolayısıyla yüksek basıncı ve pik morfolojilerinin bozulmasını engellemek için ortalama bir değer olan 0,4 mL.dak-1 değeri akış hızı olarak seçilmiştir. Akış hızı-tutunma zamanı ve akış hızı-akrilamid sinyali grafikleri sırasıyla Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.'te verilmiştir.



Şekil 5.4. F_R - T_R grafiği



Şekil 5.5. F_R -A grafiği

Kolon sıcaklığının akrilamid analizlerine etkisini inceleyebilmek için yürütülen çalışmalarda kolon sıcaklığı 15 – 55 °C aralığında değiştirilerek akrilamid ve IS'nin geliş zamanları, sinyal alanları ve kolon basıncı gibi değişkenler incelenmiştir. Deneyler sonucunda sıcaklığın artmasıyla maddelerin geliş zamanlarının azaldığı, pik morfolojilerinin iyileştiği ve kolon basıncının düştüğü gözlenmiştir. Sıcaklık – kolon basıncı ve sıcaklık – tutunma zamanı ilişkileri Denklem 5.4 ve Denklem 5.5'te verilmiştir:

$$P = -0.7157 \times T + 79.757 \quad (r = -0.9902) \quad (5.4)$$

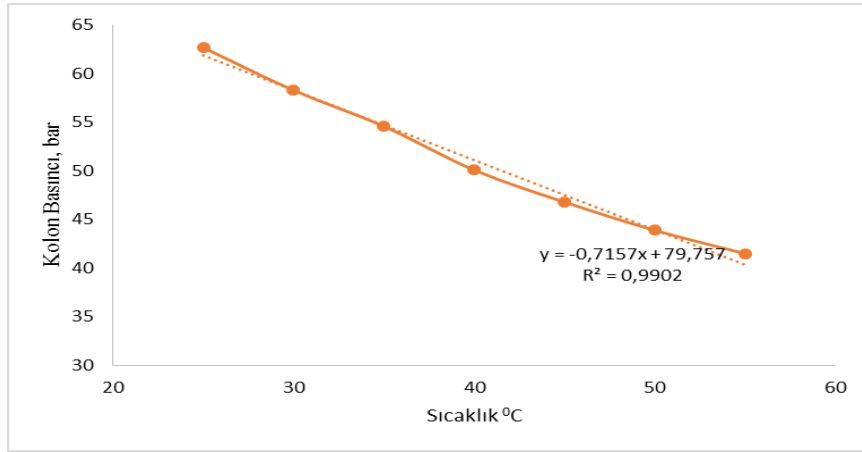
Burada, T: Kolon sıcaklığı; P: basınç; r: korelasyon katsayısı'dır.

$$TR = -0.0243 \times T + 8.758 \quad (r = -0.9951) \quad (5.5)$$

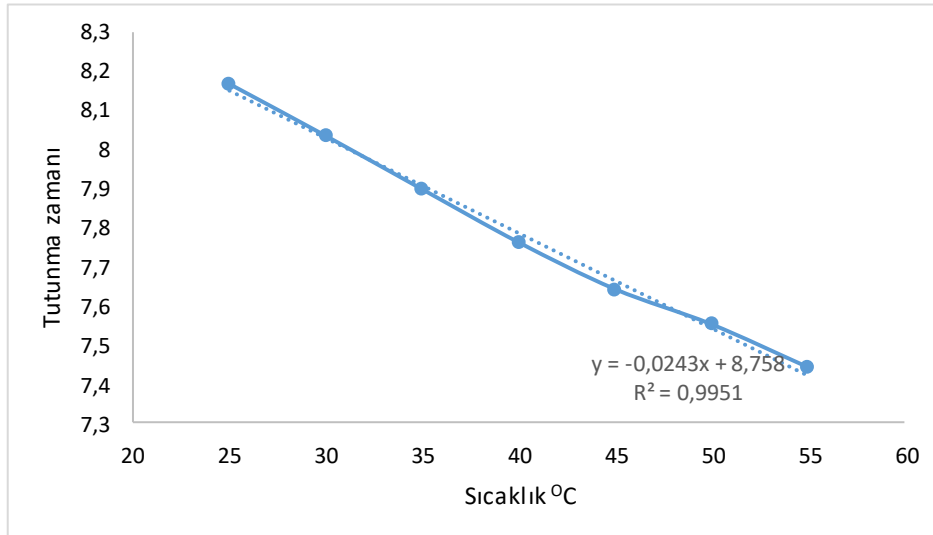
Burada, TR: tutunma zamanı; T: kolon sıcaklığı; r: korelasyon katsayısı'dır.

Sıcaklık artışının çözücü viskozitesini azalttığı için basıncı düşürdüğü ve moleküllerin kinetik enerjilerini artırdığı için maddelerin geliş zamanlarını kısalttığı sonucuna varılmıştır. Sıcaklık değişiminin akrilamidin sinyal şiddetine belirgin bir etkisine rastlanmamıştır. Çalışmalarda genel olarak tüm sıcaklıkların kullanılabilir olduğu görülmüş ancak yüksek sıcaklığın maddeler ve kolon kimyası üzerine bozucu etki göstermesi ihtimali de göz önünde tutulmuştur. Çünkü kısa vadede yüksek sıcaklığın

etkileri hissedilmese de uzun vadede aletsel ve analitik problemler yarattığı bilinmektedir. Yöntem geliştirmede amaçlananın hemen her laboratuarda kullanılabilecek genel bir analiz yöntemi geliştirmek olduğu göz önüne alınarak standart oda sıcaklığı olan 25 °C' nin çalışma sıcaklığı olarak seçilmesine karar verilmiştir. Sıcaklık – basınç ve sıcaklık - tutunma zamanı ilişkilerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.'de verilmiştir.



Şekil 5.6. T-P grafiği

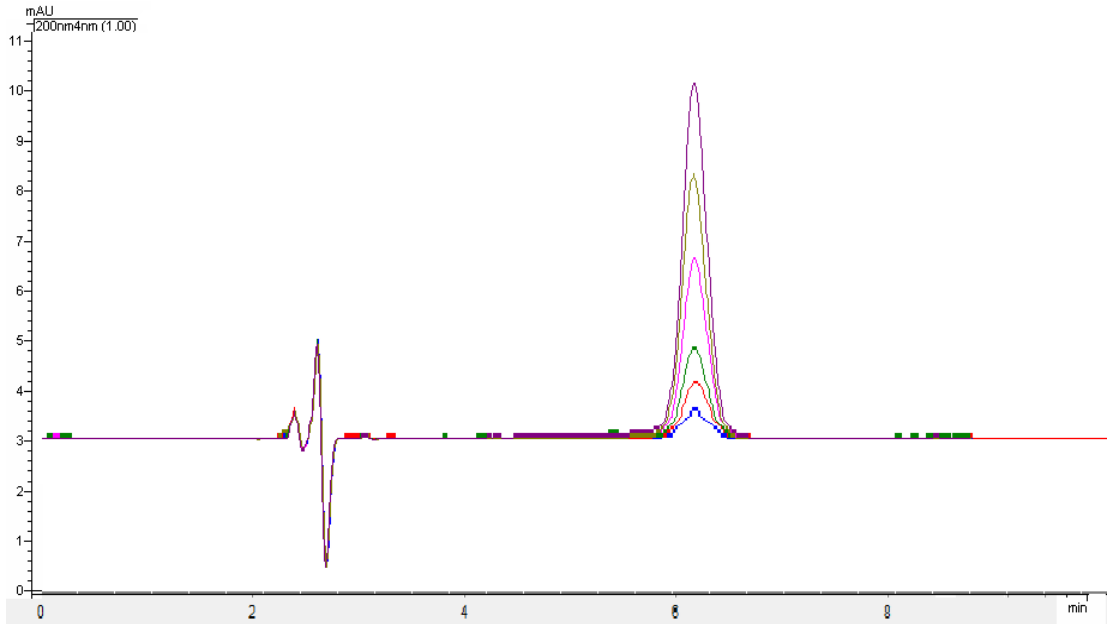


Şekil 5.7. T-Tr grafiği

Yukarıda belirtilen ön araştırmalar doğrultusunda yürütülen analizlerde, akrilamid içeren standart çözeltinin analizi yaklaşık 10 dakikada tamamlanmıştır. Geliş zamanı akrilamid için 6.3 ± 0.1 olarak detekte edilmiştir.

5.3.7. Kalibrasyon-lineer ölçüm aralığı

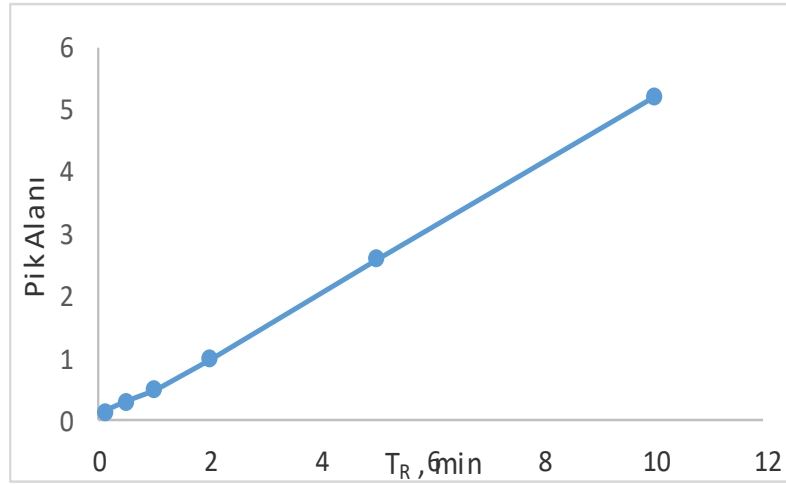
Akrilamid işlemlerinde metot validasyonu çalışmasında kalibrasyon için, alana karşı konsantrasyon grafiği çizilir. Sertifikalı Akrilamid standart çözeltisi kullanılarak aynı günde 5 konsantrasyondaki (2,85-14,2 ppb) standart çözeltiler 3'er enjeksiyon yapılarak kalibrasyon ve linearite çalışması gerçekleştirilmiştir. Buna bağlı olarak kalibrasyon alanları ve eğrileri cihaz çıktısı olarak aşağıda gösterilmiştir (Şekil 5.8.)



Şekil 5.8. Kalibrasyon alanları ve eğrileri cihaz çıktısı(2,85-14,2ppb AA)

Elde edilen kalibrasyona ait kalibrasyon doğrusu $T_R = 0,52A - 5,26e^{-3}$ olarak bulunmuştur. Buna göre hesaplanan korelasyon katsayısı (r)= 0,999 olarak tespit edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu aşağıda verilmiştir (Şekil 5.9, Denklem 5.6).

$$T_R = 0,52 A - 5,26 e^{-3} \quad (r = 0,999) \quad (5.6)$$



Şekil 5.9. Hesaplanan kalibrasyon doğrusu (2,85-14,2ppb AA)

5.3.8. LOQ-LOD çalışması

LOQ ve LOD çalışmaları için içindeki akrilamid miktarı bilinen galeta (rusk) matriksine akrilamid ilavesi çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Tablo 5.2). Yapılan çalışmalar sonucunda yöntemin tespit limitinin 3ppb olarak alınmasına karar verilmiştir.

Tablo 5.2. Akrilamid miktarı bilinen galeta (rusk) matriksine akrilamid ilavesi çalışması sonuçları

Eklenen akrilamid, 3ppb	
Bulunan Akrilamid Miktarı, ppb	3,3
	3,2
	2,5
	2,7
	3,2
	3,1
	2,8
	3,1
	3,2
	2,8
Toplam Ortalama	3,1
Toplam Standart Sapma	0,32
LOD(3SS)	0,98
LOQ(9SS)	2,95

5.3.9. Tekrarlanabilirlik

Analist tarafından 3 konsantrasyonda içinde akrilamid miktarı bilinen ($2,08 \times 10^{-7}$ M) galeta (rusk) örneğine spike edilerek tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında uyumun istatistiksel olarak değerlendirmesi aşağıda verilmiştir (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. *Akrilamid miktarı bilinen ($2,08 \times 10^{-7}$ M) galeta (rusk) örneğine spike edilerek tekrarlanabilirlik çalışması*

Eklenen Akrilamid	3ppb	5,0ppb	9,0ppb
1	3,03	4,94	9,10
2	3,02	5,29	8,97
3	2,97	5,27	9,05
4	3,01	4,96	9,22
5	3,13	5,03	8,95
6	3,06	5,29	9,13
7	2,9	5,21	8,93
8	3,03	5,20	8,94
9	3	5,29	9,10
10	2,89	5,27	9,24
ORT	3,00	5,176	9,064
SD	0,071	0,142	0,113
Min	2,89	4,939	8,930
Max	3,13	5,295	9,238
Grup Düşük	1,205	1,663	1,178
Uygunluk	OK	OK	OK
Grup Yüksek	2,134	0,833	1,542
Grup Tablo Değeri (n=8,10)	2,18	2,18	2,18
Uygunluk	OK	OK	OK
%RSD	2,36	2,75	1,25
RSDR	38,137	35,324	32,468
RSDr	19,068	17,662	16,234
Horrat r	0,206	0,078	0,038

RSDR=Tekrarüretilebilirlik koşulları altındaki bağıl standart sapma

Horwitz eşitliğinden hesaplanan RSDR= $2^{(1-0,5\log c)}$

RSDr= Tekrarlanabilirlik koşulları altındaki izin verilen bağıl standart sapma

RSDr = 0,50* RSDR

Horrat r = RSDr (bulunan) / RSDR (%RSD / RSDR)

Tekrarlanabilirlik koşullarında yapılan ölçümlerin istatistiksel hesaplama ile elde edilen %RSD değerlerinin, izin verilen maksimum RSDr değerlerinden küçük olduğu, tablo değerlerine uyduğu ve Horrat r değerlerinin tamamının 1,5'in altında olduğu Tablo 5.3'te görülmektedir.

5.3.10. Gerçeklik (geri alma)

Tekrarlanabilirlik için yapılan analiz sonuçları kullanılarak geri kazanım çalışmaları yapılmış ve geri alma oranları hesaplanmıştır (Tablo 5.4).

Tablo 5.4. Tekrarlanabilirlik için yapılan analiz sonuçları kullanılarak elde edilen geri alma oranları

	Eklenen Teorik	Eklenen Okunan	Geri Kazanım	Eklenen Teorik	Eklenen Okunan	Geri Kazanım	Eklenen Teorik	Eklenen Okunan	Geri Kazanım
1	3,0	3,03	1,10	5	4,94	0,99	9	9,10	1,01
2	3,0	3,02	1,08	5	5,29	1,06	9	8,97	1
3	3,0	2,97	0,97	5	5,27	1,05	9	9,05	1,01
4	3,0	3,01	1,01	5	4,96	0,99	9	9,22	1,02
5	3,0	3,13	1,06	5	5,03	1,01	9	8,95	0,99
6	3,0	3,06	1,03	5	5,29	1,06	9	9,13	1,01
7	3,0	2,9	0,94	5	5,21	1,04	9	8,93	0,99
8	3,0	3,03	1,02	5	5,20	1,04	9	8,94	0,99
9	3,0	3	1,03	5	5,29	1,06	9	9,10	1,01
10	3,0	2,89	0,94	5	5,27	1,05	9	9,24	1,03
ORT		3,00			5,18			9,06	
SD		0,071			0,1423			0,1132	
%									
RSD		2,36			2,75			1,25	
RSDR		38,137			12,490			11,480	
RSDr		19,068			6,245			5,740	
Horratr		0,206			0,220			0,109	

AOAC Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals kaynağına göre farklı konsantrasyonlar için Performans Kriterleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 5.5). Farklı konsantrasyonlarda yapılan geri kazanım çalışması ve tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen akrilamid verileri tabloda tavsiye edilen değerler ile kontrol edilmiştir. Sonuçların bu değerler içinde kaldığı görülmektedir.

Tablo 5.5. AOAC guidelines for dietary supplements and botanicals kaynağına göre farklı konsantrasyonlar için performans kriterleri

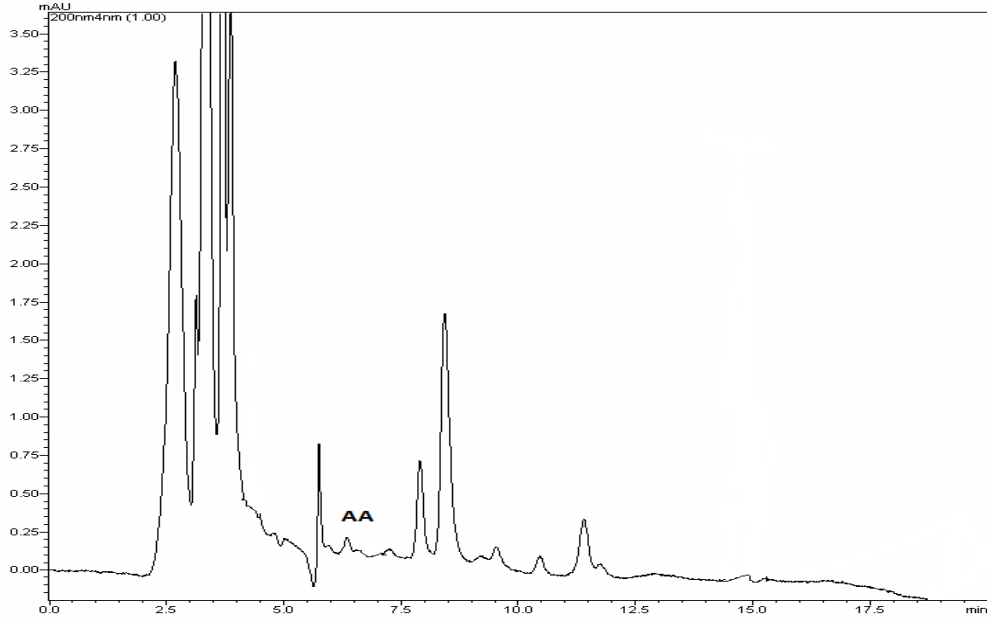
Konsantrasyon	Geri Kazanım I (%)	Hedef RSD (%)
100%	98-101	1
10%	95-102	1.5
1%	92-105	2
0.1%	90-108	3
0.01%	85-110	4
10 µg/g (ppm)	80-115	6
1 µg/g	75-120	8
10 µg/kg (ppb)	70-125	15

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, akrilamidin düşük derişimlerdeki miktarlarının YPSK yöntemi ile tayin edilebileceğini göstermektedir. Yöntemimizin doğruluğunu ispatlamak için içeriğı belli sertifikalı tost ekmeğı (tosted bread) ve gevrek (crispbread) örneklerinden 1 gram tartılarak 10 mL bidistile Su ile ekstrakte edilmiş, daha önce anlatılan ekstraksiyon işlemleri uygulandıktan sonra YPSK cihazına verilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda görölmektedir (Şekil 5.10, Şekil 5.11). Bu yöntemle analiz edilmiş, bulunan miktarların sertifika değerleriyle aynı olduğu görölmüştür (Tablo 5.6). Bu da YPSK için kullanılan bu yöntemin doğru ve kesin sonuçlar verdiğinin bir ispatı olmuştur.

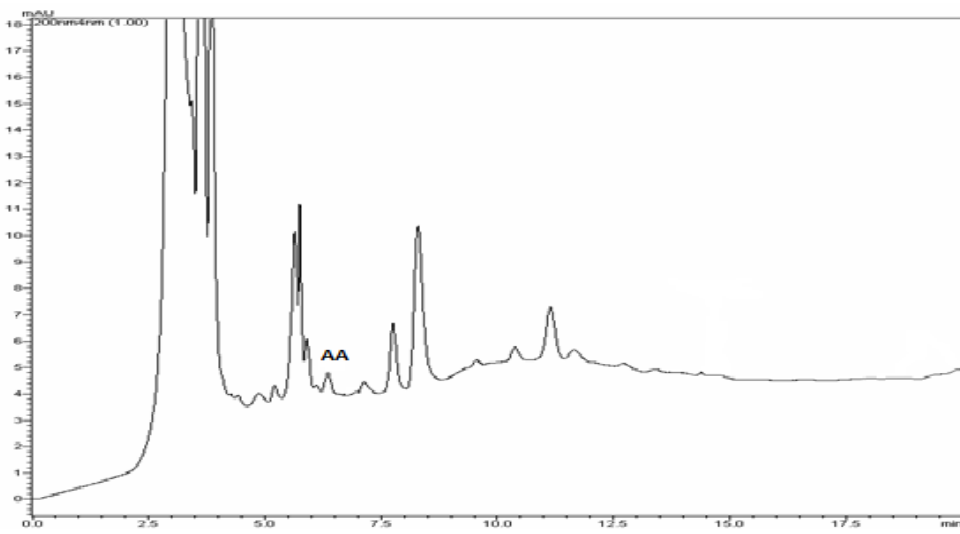
Tablo 5.6. Tost ekmeğı ve gevrek için sonuçlar

	Olması Gereken Akrilamid Değerleri, ppm	Bulunan Akrilamid Değerleri	Geri Kazanım
Crispbread (gevrek)	0,0425	0,0410	0,96
Tosted Bread (tost ekmeğı)	0,098	0,101	1,03

Yapılan çalışmalar sonucunda yöntemin geri kazanım % değerlerinin de olması gereken değerler içinde kaldığı görülmüştür. Voltametrik yöntemler ile analiz edilemeyen daha düşük derişimlerde akrilamid içeren karmaşık yapıdaki matrikslerin akrilamid miktarlarının, geliştirilmiş olan bu yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile tespit edilebileceği görülmektedir.



Şekil 5.10. Tost ekmeği numunesinin YPSK grafiği



Şekil 5.11. Gevrek (Crispbread) numunesinin YPSK grafiği

6. SONUÇLAR ve DEĞERLENDİRME

Voltametrik yöntemler ilaç ve gıda analizlerinde kromatografik ve fotometrik yöntemlere alternatif olarak nitelendirilse de bu yöntemleri tamamlayıcı niteliktedir. Ayrıca yöntemin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile birleştirilmesiyle, kompleks karışımların analizinde de başarıyla uygulanması sağlanmıştır. Polarografi ile saf etken maddenin yanında çok kompleks bir karışım olsa bile (çözünmeyen ilaç katkı maddeleri, serum ya da plazmada bulunan endojen maddeler v.b.) aktif maddelerin analizi duyarlılıkla ve herhangi bir girişim olmaksızın yapılabilmektedir. Pek çok ilaç etken maddesi ve vücutta bulunan fizyolojik aktif maddeler polarografik veya voltametrik yöntemlere cevap vermektedir.

Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesi ile bir sistemin hangi potansiyellerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutulmadıklarını kolayca anlamak mümkündür.

Yapmış olduğumuz dönüşümlü voltametri çalışmaları sonucunda pozitif yönde yapılan potansiyel taramasında, negatif yöndeki potansiyel taramasında -1880 V'da tek bir katodik pik gözlenirken, pozitif yöndeki potansiyel taramasında herhangi bir anodik pikin gözlenmemesi ve tarama hızı arttıkça pik potansiyelinin daha negatif değerlere kayması akrilamidin indirgenme reaksiyonunun tersinmez olduğunu göstermiştir.

Dönüşümlü voltametri çalışmaları sonucunda ayrıca, tarama hızının kareköküne karşılık ($v^{1/2}$), pik akımı değerleri grafiğe geçirilmiştir ve grafiğin eğimi hesaplanmıştır. Doğruların eğimlerinin 1'den büyük olması yada korelasyon katsayılarının 1'den uzaklaşması elektrot reaksiyonunun adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Eğer doğruların eğimi 1'den küçükse difüzyon kontrollü olduğu anlaşılır. Elektrot reaksiyonunun davranışının belirlenmesi için ayrıca tarama hızının logaritması ile pik akımının logaritmasının değişimine de bakılmıştır. Elde edilen doğruların eğimlerinin 1'e yakın olması da reaksiyonun adsorpsiyona dayalı, eğimin 0,5'den küçük olması da n reaksiyonudifüzyona dayalı olduğunu göstermektedir. Bütün bu çalışmalar reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermiştir

Difüzyon akımı edilen DPP polarogramından 1,947 μA olarak tespit edilmiştir. Tüm bu değerler Ilkoviç eşitliğinde yerine konulduğunda D difüzyon katsayısı $8,52 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplanmıştır.

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda pH tamponlarının etkisini oldukça önemli bir parametredir. pH etkisini gözlemlemek amacıyla OSWV tekniği ile pH1 ve pH12 aralığında hazırlanan Britton Robinson çözeltileri kullanılmıştır. pH 7,1’de çalışılmasına karar verilmiştir.

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda başlangıç potansiyelinin tespit edilmesi bir diğer önemli parametredir. Bu amaçla OSWV yöntemi kullanılarak başlangıç potansiyeli olarak sırasıyla 0V, -200 mV, -400 mV, -600 mV, -800 mV, -1000 mV, -1200 mV ve -1400 mV ve -2100mV’ a kadar voltamogramlar elde edilmiştir. En uygun başlangıç potansiyelinin -1400 mV olduğuna karar verilmiştir.

Polarografik ve voltametrik çalışmalarda bir diğer önemli parametre de civa damlasının büyüklüğüdür. Bu amaçla OSWV yöntemi ile farklı damla büyüklükleri seçilerek çalışmalar yapılmıştır. 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 (120 ms) civa büyüklükleri seçilerek sırasıyla voltamogramları alınmıştır. 80 ms’ye tekabül eden değerin analitik açıdan en kaliteli veriyi sağlayan civa büyüklüğünü verdiği karar verilmiştir.

Destek elektrolit seçimi için yapılan çalışmalarda; tetra butil amonyum bromür kullanıldığında -1,5 V ve -1,97 V’da iki polarografik pik gözlenmiştir. Tetra metil amonyum iyodür ve LiCl ile alınan voltamogramlarda ise LiCl ile elde edilen pikin daha düzgün olduğu saptanmıştır. LiCl daha geniş aralıkta çalışmaya olanak sağlar. Akrilamid düşük negatif potansiyellerde en yüksek duyarlılığı destek elektrolit olarak LiCl seçildiğinde göstermektedir. Çünkü LiCl küçük partikül boyutu nedeniyle elektrot yüzeyine en az absorbe olmaktadır. Bu nedenlerle destek elektroli olarak LiCl seçilmiştir.

Destek elektrolitin derişiminin ne olması gerektiğine karar vermek amacıyla deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, analiz hücrelerine 0,005 mol/L’den başlayarak ve 1,75 mol/L’ye kadar farklı derişimlerde LiCl içerecek şekilde numuneler hazırlanmış ve voltamogramları alınmıştır. Çalışmalar sonucunda, pik akımının sabit kaldığı 0,5 M LiCl derişiminde çalışılmasına karar verilmiştir.

OSWV Kare Dalga Voltametresi yöntemi için kullanılacak parametrelere karar verilerek yöntem optimizasyonu sağlandıktan sonra $2.8 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-5}$ M (0,2 ppm-4,26 ppm) derişim aralığında kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Standart ekleme yöntemi ile LOD ve LOQ değerlerimiz sırasıyla 0,01 ve 0,03 ppm bulunmuştur. %RSD değeri $1,72 < 2,0$ olarak tespit edilmiştir.

OSWV tekniği ile gıdalarda akrilamid tayini için geliştirilen bu yöntemin geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları da tost ekmeği gibi

matrikslerde bu yöntemin, doğruluk ve kesinlik bakımından sorunsuz olarak çalışabileceğini göstermektedir.

Voltametrik ve polarografik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere üstünlüğü; az miktarda maddenin analiz için yeterli olması, ucuz olmaları, kolay uygulanabilir olmaları, analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç olmaması, fazla çözücü gerektirmemeleri ve hassas birer yöntem olmalarıdır. Ancak gıda ve ilaç içerisinde çok az miktarda bulunan maddelerin analizinin voltametrik yöntemlerle gerçekleştirilmesi zordur. Ön deriştirme işlemi ve standart katma yöntemleriyle cevap alınabilmektedir.

Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda gıdalar içerisindeki akrilamidin voltametrik yöntemler kullanılarak da tayin edilebilirliği gösterilmiştir. Ancak çok düşük derişimlerde ve karşık yapılı matrikslerde yanıt alınamamaktadır. Bu da yöntemin dezavantajı olmaktadır.

Sonuç olarak akrilamidin gıdalardaki (özellikle ekmek ve benzeri tahıl ürünlerinde) tayini için hızlı, kolay, duyarlı, seçici ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan, bir voltametrik yöntem geliştirilmiştir.

Ayrıca akrilamid için YPSK çalışmaları yapılarak daha düşük derişimlerde akrilamid analizinin yapılabilmesi için geliştirilen metodun validasyon çalışmaları değerlendirilerek yöntemin geçerliliği incelenmiştir. YPSK çalışmaları sonucunda çok daha düşük derişimlerde akrilamid analizi için seçilen yöntemin tespit limiti 3 ppb olarak bulunmuştur. YPSK yöntemi için yapılan geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde YPSK yönteminin gıdalarda çok düşük seviyelerdeki akrilamid miktar tayini için doğru ve güvenilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosen, I., Bruze, M., Kautianen, A., Magnusson, A.L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A. (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ Health*, 27, 219–226.
- [2] Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. *J Cereal Sci*, 47, 118–133.
- [3] International Agency for Research on Cancer (IARC). (1997). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some Industrial-Chemicals*, Geneva, Switzerland, 60, 389–433.
- [4] Niaz, A., Sirajuddin, Shah, A., Bhanger, M. I., Saeed, M., Khan, M. J., Arain, M. B., (2008). A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. *Talanta*, 74, 1608–1614.
- [5] Wang, H., Lee, A.W.M., Shuang, S., Choi, M.M.F. (2008). SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchem. J.*, 89(2), 90–97.
- [6] Ayaz, A., ve Yurttagül, M., (Şubat 2008). Besinlerdeki Toksik Ögeler-1, Ankara.
- [7] Tornqvist, M., Bergmark, E., Ehrenberg, L. Granath, F. (1998). Riskbedömning av akrilamid. *Kemikalieinspektionen*, 7, 1–28.
- [8] Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi G. P., Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 4782–4787.

- [9] Granvogl, M., Koehler, P., Schieberle, P. (2005). Neue entwicklungen in der analytik von acrylamid-anwendungen zum nachweis von bildungsmechanismen. *Getreidetechnologie*, 59, 83–90.
- [10] Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W. (2003). Acrylamide in foods: occurrence, sources and modelling. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 802–808.
- [11] Buhlert, J., Carle, R., Majer, Z., Spitzner, D. (2006). Thermal degradation of peptides and formation of acrylamide. *Lett. Org. Chem*, 3, 356–357.
- [12] JECFA (2005). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting. JECFA/64/SC, World Health Organization WHO, Rome, Italy, 7–17.
- [13] Brill, K., A, Li S., J., Kwak A., H., Lin D., J. (2005). detection of acrylamide in patato chips via soxhlet extraction and GC/MS analysis. *DUJS*, 30–33.
- [14] Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Acrylamide: a cooking carcinogen? (2000). *Chem. Res. Toxicol*, 13 (6), 517–522.
- [15] Bergmark, E., Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. (1997). *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 78–84.
- [16] Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50(17), 4998–5006.
- [17] Ruden, C., Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate, (2004). *Food Chem. Toxicol.*, 42, 335–349.
- [18] Aycan, S. (1994). Polarografik ve Voltametrik Teknikler, *Yıldız Teknik Üniversitesi Yayını*, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, No: 293, p.1.

- [19] Skoog, D. A, West, D. M, Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007). *Analitik Kimya Temel İlkeler*. (Çev: Ed. Kılıç E, Yılmaz H), Ankara: Bilim Yayıncılık.
- [20] Yıldız, A, Genç, Ö. (1993). *Enstrümental Analiz*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları
- [21] Gündüz, T. (1990). *Enstrümental Analiz*, Ankara: Bilge Yayıncılık
- [22] Yenigül, B, Ertaş, F. N, Gökçe, İ. (2001). *Voltametrik Analiz Yöntemleri I. Eser Analiz Yaz Okulu Kitabı*, İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları
- [23] Yıldız, A, Genç, Ö, Bektaş, S. (1997). *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- [24] Bond, A. M. (1980). *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. N.Y.
- [25] Henden, E., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N. (2002). *Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu*. İzmir: Ege Üniversitesi.
- [26] http1: http://www.bayar.edu.tr/besergil/eak_4_1_voltam.pdf
(Erişim tarihi: 27.07.2018)
- [27] Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N. (2006). *Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler*, Bornava-İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları.
- [28] Tunçel, T., Bergisadi, M., Akın, L., Otuk, G., Kusu, I. (1996). In-vitro and in-vivo studies on micro capsules and tableted micro capsules cephradine. *Pharmazie*, 51, 168–171.

- [29] Şen, S. (2014). *Tetra Sodyum;3-[[4-[[4-[(6-Amino-1-Hidroksi-3-Sülfonato-2-Naftilazo)]-6-Sülfonato-1-Naftil]Azo]-1-Naftil]Azo] Naftalin-1,5 Disülfonat (Direct Blue 71) In Elektrokimyasal İndirgenme Davranışının Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Giresun: Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [30] Liu, L., Zhao, G., Yuan, Y., Chen, F., Hu, X. (2008). Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, 108, 760–767.
- [31] Gökmen, V., Şenyuva, H., Palazoğlu, T. K. (2006). Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of french fries, *J. Food Eng.*, 77, 972–976.
- [32] Erdoğdu, S. B., Palazoğlu, T. K., Gökmen, V., Şenyuva, H., Ekiz, İ. (2007). Reduction of acrylamide formation in french fries by microwave pre-cooking of potato strips. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 133–137.
- [33] Noti, A., Brem, S. B., Biedermann, M., Grob, K., Albisser, P., Realini, P. (2003). Storage of potatoes at low temperature should be avoided to prevent increased acrylamide formation during frying and roasting. *Mitt Lebensmittelunters Hyg*, 94, 167–180.
- [34] Pedreschi, F., Kaack, K., Grandby, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 37: 679–685.
- [35] Pedreschi, F., Kaack, K., Grandby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in french fries. *Food Chem.*, 109, 386–392.
- [36] Kim, T. C., Hwang, E., Lee, H. J. (2005). Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *Food Chem. Toxicol.*, 70, 354–358.
- [37] Yıldız, T. G. H., Palazoğlu, K., Miran, W., Kocadağlı, T., Gökmen, V. (2017). Evolution of surface temperature and its relationship with acrylamide formation during conventional and vacuum-combined baking of cookies. *J. Food Eng.*, 197, 17–23.

- [38] [http 2: https://www.basinc.com/products/ec/c3](https://www.basinc.com/products/ec/c3)
(Erişim tarihi: 05.09.2018)
- [39] [http3: http://www.electrochemistry.co.kr/mall1/m_mall_detail.php?ps_goid=1](http://www.electrochemistry.co.kr/mall1/m_mall_detail.php?ps_goid=1)
(Erişim tarihi: 05.09.2018)
- [40] <https://www.basinc.com/products/ec/auxele>
(Erişim tarihi: 05.09.2018)
- [41] Sturm, J. C., Canelo, H., Vergara, L. J., Sqella, J. A. (1997). Voltammetric study ofketerolac and its differantial pulse polarographic determination inpharmaceuticals. *Talanta*, 44, 931–937.
- [42] Uslu, B. and Özkan, S. A. (2004). Anodic voltammetry of abacavir and its determinationin pharmaceuticals and biological fluids, *Electrochimica Acta*, 49, 4321–4329.
- [43] Bard, A. J. and Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [44] The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998). EURACHEM Guide, First Internet Version, www.eurachem.de
- [45] AOAC (2008). *How to meet iso 17025 requirements for method verification*. USA: AOAC International.
- [46] AOAC (2013). *Guidelines For Dietary Supplements and Botanicals*. USA: AOAC Official methods of analysis.
- [47] AOAC (2016). *Appendix f: Guidelines for standard method performance requirements*. USA: AOAC Official methods of analysis.

- [48] Can, N. Ö. (2007). *Akrilamidin Gıda maddelerinde oluşumuna Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi ve Miktarının Tayini*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

EK-1




CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM[®]-BD274

Acrylamide in Rusk		
Compound	Certified value ¹⁾	Uncertainty ²⁾
	Mass fraction in µg/kg	
Acrylamide	74	± 7

¹⁾ Unweighted mean of accepted mean values, independently obtained by 8 laboratories using different analytical methods. The certified value is traceable to the SI.

²⁾ Estimated expanded uncertainty U with a coverage factor of $k = 2$, corresponding to a level of confidence of about 95 %, as defined in the Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), ISO, 1995. Uncertainty contributions arising from characterisation as well as from homogeneity and stability testing were taken into account.

The certified properties will be valid for 12 months beginning with the dispatch of the material from BAM; this validity may be extended as further evidence of stability becomes available.

The minimum sample intake is 4 g.

NOTE

European Reference Material ERM[®]-BD274 was produced and certified under the responsibility of Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials[®] co-operation agreement between BAM-LGC-IRMM. Information on these guidelines is available on the Internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM[®], Berlin, 2008-12-08

Berlin, 2008-12-08

Signed

BAM
Department I
Analytical Chemistry; Reference Materials
Berlin, Germany

BAM
Division I.2
Organic Chemical Analysis; Reference Materials
Berlin, Germany

Prof. Dr. U. Panne
(Head of Department)

Prof. Dr. I. Nehls
(Head of Division)

Certificate ERM[®]-BD274
Page 1 of 3



CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM® - BD273

TOASTED BREAD		
	Mass Fraction	
	Certified value ¹⁾ [ng/g]	Uncertainty ²⁾ [ng/g]
Acrylamide	425	29
1) Unweighted mean value of 11 accepted sets of data obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified value is traceable to the SI. 2) Expanded uncertainty with a coverage factor of $k = 2$, according to the Guide for the Expression of Uncertainty in Measurements, corresponding to a level of confidence of about 95 %.		

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 23, MAI 2011

The minimum amount of sample to be used is 1 g.

NOTE

European Reference Material ERM®-BD273 was produced and certified under the responsibility of the IRMM according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials® co-operation agreement between BAM-IRMM-LGC. Information on these guidelines is available on the internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM®, Geel, December 2006

Signed: _____

Prof. Dr. Hendrik Emons
Unit for Reference Materials
EC-JRC-IRMM
Retieseweg 111
2440 Geel, Belgium



Registration No. 268-TEST
ISO Guide 34 for the
production of reference materials

All following pages are an integral part of the certificate.

Page 1 of 2



CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM[®]-BD272

Acrylamide in Crispbread		
Compound	Certified value ¹⁾	Uncertainty ²⁾
	Mass fraction in mg/kg	
Acrylamide	0.98	± 0.09
¹⁾ Unweighted mean of accepted mean values, independently obtained by 15 laboratories using different analytical methods. The certified value is traceable to the SI. ²⁾ Estimated expanded uncertainty U with a coverage factor of $k = 2$, corresponding to a level of confidence of about 95 %, as defined in the Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), ISO, 1995. Uncertainty contributions arising from characterisation as well as from homogeneity and stability testing were taken into account.		

The certified properties will be valid for 12 months beginning with the dispatch of the material from BAM; this validity may be extended as further evidence of stability becomes available.

The minimum sample intake is 2 g.

NOTE

European Reference Material ERM[®]-BD272 was produced and certified under the responsibility of Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) according to the principles laid down in the technical guidelines of the European Reference Materials[®] co-operation agreement between BAM-LGC-IRMM. Information on these guidelines is available on the Internet (<http://www.erm-crm.org>).

Accepted as an ERM[®], Berlin, 2007-03-08

Berlin, 2007-03-08

Signed

BAM
Department I
Analytical Chemistry; Reference Materials
Berlin, Germany

BAM
Division I.2
Organic Chemical Analysis; Reference Materials
Berlin, Germany

Prof. Dr. U. Panne
(Head of Department)

Prof. Dr. I. Nehls
(Head of Division)

Certificate ERM[®]-BD272
Page 1 of 3