

**AKRİLAMİDİN GIDA MADDELERİNDE
OLUŞUMUNA ETKİ EDEN
FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ VE
MİKTARININ TAYİNİ**

Nafiz Öncü CAN

Doktora Tezi

**AKRİLAMİDİN GIDA MADDELERİNDE
OLUŞUMUNA ETKİ EDEN
FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ VE
MİKTARININ TAYİNİ**

Nafiz Öncü CAN

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

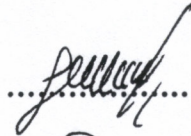
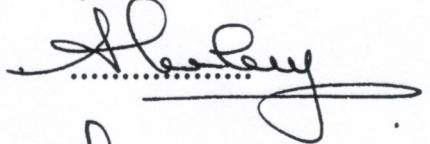
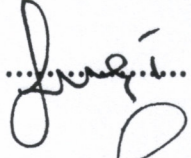
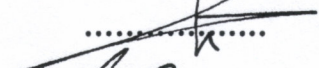
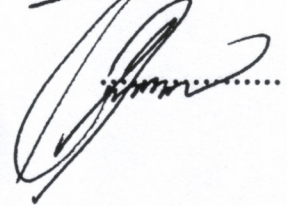
Eskişehir, Nisan 2007

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 050318).

Jüri ve Enstitü Onayı

Nafiz Öncü CAN'ın "Akrilamidin Gıda Maddelerinde Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi ve Miktarının Tayini" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 19 Nisan 2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

| | Adı-Soyadı | İmza |
|---------------------|--|---|
| Üye (Tez Danışmanı) | Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA Anadolu Üniversitesi |  |
| Üye | Prof. Dr. Asuman KARAKAYA Ankara Üniversitesi |  |
| Üye | Doç. Dr. Bengi USLU Ankara Üniversitesi |  |
| Üye | Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR Anadolu Üniversitesi |  |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN Anadolu Üniversitesi |  |

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..17.04.2007.. tarih ve13/1..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Prof. Dr. Yücel YAZAN
MÜDÜR

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Nafiz Öncü CAN
Doğum tarihi ve yeri : 1978, Ankara
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yunusemre
Kampusu, Eskişehir 26470.
Tel: 0 222 3350580 / 3770
Fax: 0 222 3350750
E-posta: nafizoc@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Namık Kemal İlkokulu, 02/06/1989
Ortaokul : Düzce Anadolu Lisesi, 02/06/1993
Lise : Düzce Arsal Anadolu Lisesi, 02/06/1996
Lisans : Anadolu Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi, 02/09/2000
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Analitik Kimya Anabilim Dalı, 05/09/2002
Yabancı dil : İngilizce

Mesleki Deneyim

2000 yılından beri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Avrupa Farmasötik Bilimler Federasyonu

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

Altıokka, G., Ergun, B., Can, N.O., Aboul-Enein, H.Y., Validated reversed-phase HPLC method for the analysis of food additive sodium benzoate in soft drinks and jam, J. Liq. Chromatogr. R. T., 30 (8), 1125-1136 (2007).

Can, N.O., Altiokka, G., Aboul-Enein, H.Y., Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta*, 576, 246-252 (2006).

Can, N.O., Altiokka, G., Determination of azapropazone in its pharmaceutical form by HPLC and flow injection analysis, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 28, 857-869 (2005).

Can, N.O., Tuncel, M., Aboul-Enein, H.Y., Determination of nabumetone in pharmaceutical formulation by flow injection analysis (FIA) with UV-detection, *Pharmazie*, 58, 22-24 (2003).

Altiokka, G., Atkosar, Z. ve Can, N.O., The determination of levofloxacin by flow injection analysis using UV detection, potentiometry, and conductometry in pharmaceutical preparations, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 30, 881-885 (2003).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

Ergun, B., Altiokka, G., Can, N.O., Toxicological evaluation of aflatoxin M1 levels in Turkish diary products: An analytical approach, 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology IC-TST 2006, 2-5 November, Antalya, P-115, 198 (2006).

Can, N.O., Altiokka, G., Liquid chromatography and flow injection analysis assay methods for therapeutic drug monitoring of the antibacterial drug cefuroxime axetil, 15th World Congress of Pharmacology IUPHAR 2006, 2-7 July, Beijing, P150008, 203 (2006).

Can, N.O., Altiokka, G., Determination of ticlopidine in pharmaceutical formulation by flow injection analysis (FIA) with UV-detection, International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS 8, 13-16 June, Ankara, P-137, 255 (2006).

Keskin, E., Sentürk, Z., Can, N.O., Tuncel, M., Determination of B-blocker acebutalol in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis (FIA) with UV-detection, International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS 7, 24-27 June, Ankara, P-24, 157 (2003).

Can, N.O., Altiokka, G., Tuncel, M., High pressure liquid chromatographic determination of cefuroxime axetil and its application to tablets, International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS 7, 24-27 June, Ankara, P-7, 140 (2003).

Can, N.O., Altiokka, G., Tuncel, M., Determination of cefuroxime axetil in tablets by flow injection analysis (FIA) and UV-spectrophotometry, International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS 7, 24-27 June, Ankara, P-6, 139 (2003).

Altiokka, G., Can, N.O., A validated method for the determination of azapropazone in pharmaceutical formulations by HPLC, FIA and UV-spectrophotometry, International Symposium on Pharmaceutical Sciences ISOPS 7, 24-27 June, Ankara, P-2, 135 (2003).

Can, N. O., Tuncel, M., Aboul-Enein, H.Y., The determination of nabumetone by flow injection analysis with UV detection, 7th European Congress of Pharmaceutical Sciences EUFEPS 2002 Euro. J. Pharm. Sci, Vol. 17 Suppl. 1, 21-23 October, Stockholm, PO-33, S48 (2002).

Katılan Bilimsel Toplantılar:

15th World Congress of Pharmacology IUPHAR 2002, 7-12 July, San Francisco (2002).

4th European Congress of Pharmacology EPHAR 2004, 14-17 July, Porto (2004).

V. Ulusal Kromatografi Kongresi, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM), 30 June - 2 July, Eskişehir (2004).

Bilimsel Etkinlikler

Ödüller : Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Dönem Birinciliği, 29/6/2003

Projeler :

Gıda maddelerinde bulunan bazı antosiyaninlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle miktarının tayini, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Göksel Altıokka, Araştırmacı: Araş.Gör. Nafiz Öncü Can, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (040333 - Tamamlandı).

Sefuroksim aksetil'in çeşitli yöntemlerle tabletlerdeki ve vücut sıvılarındaki miktarının tayini, Proje Yürütücüsü: Yard. Doç. Dr. Göksel Altıokka, Araştırmacı: Araş. Gör. Nafiz Öncü Can, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (010367 - Tamamlandı).

Akrilamidin gıda maddelerinde oluşumuna etki eden faktörlerin analitik yöntemlerle incelenmesi, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Göksel Altıokka, Araştırmacı: Araş. Gör. Nafiz Öncü Can, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (050318 – Devam ediyor).

Süperoksit dizmutaz (SOD) enziminin elektrokimyasal yöntemlerle tayini, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Zeki Atkoşar, Araştırmacı: Araş. Gör. Nafiz Öncü Can, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (030308 – Devam ediyor).

Sözlü konferans veya seminerler :

Gıdalarda YBSK ile akrilamid tayini – Uygulama gösterimi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ve Kapiler Elektroferez Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, 4 Aralık, Eskişehir (2006).

Farmasötik preparattaki azapropazonun HPLC ve akış enjeksiyon analizi ile tayini – Sözlü sunum, İleri Teknoloji Araştırma Birimi (İTAB) Kanser Araştırmaları Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, 8 Kasım, Eskişehir (2005).

Sefuroksim aksetil'in UV-spektrofotometri, akış enjeksiyon analizi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile tabletlerdeki miktarının tayini - Sözlü sunum, Eczacılık Fakültesi Kuruluş Yıldönümü Seminerleri, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 19 Kasım, Eskişehir (2002).

Organizasyonunda bulunulan toplantılar :

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ve Kapiler Elektroforez Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 4-8 Aralık, Eskişehir (2006).

Katılınan kurslar ve eğitim programları :

I. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri Çalıştayı, Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), 11-13 Mart, Eskişehir (2002).

TEŞEKKÜR

Bilimsel araştırmayı bir yaşam biçimi haline getirmeyi kendisinden öğrendiğim; bilimsel bakış açısına, akademik yeteneklerine ve demokratik yaklaşımına hayran olduğum; birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum Eczacılık Fakóltesi Dekan Yardımcısı Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya,

Engin bilgi birikimi ile bana daima ışık tutan değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR'a,

Araştırmalarım süresince, değerli görüşleri ile çalışmalarımı şekillendirmeme büyük katkıda bulunan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Asuman KARAKAYA'ya,

İhtiyaç duyduğum her konuda, her zaman tam desteğini hissettiğim Eczacılık Fakóltesi Dekan Yardımcısı ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli Hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Bülent ERGUN'a,

Eczacılık Fakóltesi'nde eğitimime başladığım ilk yıldan bu yana, kariyerimdeki her adımı birlikte attığım sevgili eřim, Araş. Gör. Özgür Devrim CAN'a ve onun sevgili ailesine,

Yaşamımın her anında ve her alanında olduğu gibi, doktora tez çalışmam süresince de desteklerini esirgemeyen sevgili Anne ve Babama,

Tez çalışmalarım sırasında hem bilimsel kimlikleri hem de vefalı dostlukları ile en zor anlarımda yanımda olan sevgili kardeşlerim Araş. Gör. Yusuf ÖZKAY ve Araş. Gör. Ümide DEMİR ÖZKAY'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmasına yapmış olduğu finansal destek için Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

AKRİLAMİDİN GIDA MADDELERİNDE OLUŞUMUNA ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ ve MİKTARININ TAYİNİ

ÖZET

Akrilamid patates cipsleri, bisküvi ve kahve gibi çeşitli gıda maddelerinde sıklıkla bulunan, sıcaklıkla oluşan gıda zehirlerinden biridir. Akrilamidin bazı nörotoksik ve karsinojenik etkiler gösterdiği ispatlanmış ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından insanlar için olası karsinojen olarak 2A grubunda sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın amacı akrilamidin tayini için ucuz, basit ve duyarlı bir yöntem geliştirmek ve Türkiye’de üretilen bazı gıdaların akrilamid seviyelerini göstermektir. 80 örneğin akrilamid derişimi foto diyot dizisi detektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelenmiştir. Akrilamid ve metakrilamid (iç standart) isokratik elüsyon tekniği kullanılarak bir ters faz kolonu (GL Sciences, Inertsil® ODS-3) ile ayrılmıştır. Hareketli faz (asetonitril: su, 2: 98, v/v) 0.5 mL.dak⁻¹ akış hızında pompalanmış ve analitler 200 nm dalga boyunda ortalama 15 dakika içinde detekte edilmiştir. Örnekler katı faz temizleme kullanılarak hazırlanmış ve sisteme ek ekstraksiyon veya ön deriştirme basamağı uygulanmadan enjekte edilmiştir. Akrilamid ppb seviyelerinde yeterli kromatografik çözünürlükle detekte edilmiştir. Sonuç olarak, gıdalarda bulunan akrilamid miktarının pişirme şartlarına bağlı olarak değiştiği ve özellikle kahve ve patates cipsleri olmak üzere birçok örnekte nispeten yüksek bulunduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, gıda analizi, sıvı kromatografisi, Türk gıdaları

INVESTIGATION of FACTORS THAT INFLUENCE the OCCURRENCE of ACRYLAMIDE in FOODS and ITS DETERMINATION

ABSTRACT

Acrylamide is one of the heat-generated food toxicants, which was frequently found in various foodstuffs such as potato chips, biscuits and coffee. It has been demonstrated that acrylamide possesses some neurotoxic and carcinogenic effects and is classified in Group 2A as a possible carcinogen to humans by International Agency for Research on Cancer. The aim of this study was to develop an inexpensive, simple and sensitive method for determination of acrylamide and indicate acrylamide levels of some foods produced in Turkey. Acrylamide concentration of 80 samples was examined using high performance liquid chromatography coupled to diode array detection. Acrylamide and methacrylamide (internal standard) were separated using isocratic elution technique by a reversed phase column (GL Sciences, Inertsil[®] ODS-3). Mobile phase (acetonitrile: water, 2:98, v/v) was pumped at 0.5 mL.min⁻¹ flow rate and analytes were detected at 200 nm wavelength within an average time of 15 min. Samples were prepared by utilizing solid phase clean-up and injected in to the system with no further extraction or pre-concentration steps. Acrylamide was detected at ppb levels with adequate chromatographic resolution. As a result, it was observed that the amount of acrylamide in foods varies due to cooking conditions and was found to be relatively high in many of the samples, especially in coffee and potato chips.

Keywords: Acrylamide, food analysis, liquid chromatography, Turkish foods

İÇİNDEKİLER

| | SAYFA |
|---|-------|
| ÖZGEÇMİŞ | i |
| TEŞEKKÜR | v |
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| İÇİNDEKİLER | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ | xiii |
| GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| KAYNAK BİLGİSİ | 3 |
| Akrilamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 4 |
| Akrilamidin Toksikokinetik Özellikleri | 5 |
| Akrilamidin Toksikolojik Değerlendirmesi | 7 |
| Akrilamidin Gıdalarda Oluşum Yolları | 9 |
| Akrilamid Analizlerinin Analitik Değerlendirmesi | 12 |
| <i>Sıvı Kromatografisi Yöntemleri</i> | 12 |
| <i>Gaz Kromatografisi Yöntemleri</i> | 17 |
| <i>Diğer Analitik Yöntemler</i> | 21 |
| GEREÇLER | 22 |
| Kullanılan Maddeler | 22 |
| Kullanılan Cihazlar | 22 |
| YÖNTEMLER | 24 |
| Hareketli Fazın Hazırlanışı | 24 |
| Standart Çözeltilerin Hazırlanışı | 24 |
| Akrilamidin Numunelerden Ekstraksiyonu | 24 |
| Akrilamid Ekstrelerinin Katı Faz Ekstraksiyonu ile Temizlenmesi | 24 |
| Analiz Parametreleri | 24 |
| Sonuçların Değerlendirilmesi | 25 |
| BULGULAR ve TARTIŞMA | 26 |
| Risk Değerlendirmesi | 55 |

| | |
|--|----|
| SONUÇ ve ÖNERİLER | 58 |
| KAYNAKLAR | 59 |
| EK 1 Akrilamid standart maddesi analiz sertifikası | 71 |
| EK 2 Metakrilamid standart maddesi analiz sertifikası | 72 |
| EK 3 Butiramid standart maddesi analiz sertifikası | 73 |
| EK 4 N,N-dimetilakrilamid standart maddesi analiz sertifikası | 74 |
| EK 5 Katı faz ekstraksiyon kartuşu analiz sertifikası | 75 |
| EK 6 Analiz kolonu performans raporu | 76 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| ÇİZELGE NO ve ADI | SAYFA |
|--|-------|
| Çizelge 1 Tez çalışması kapsamında analiz edilen gıda türleri | 2 |
| Çizelge 2 Sıvı kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri | 13 |
| Çizelge 3 Gaz kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri | 18 |
| Çizelge 4 Akrilamidin UV-spektrofotometrik analizine ilişkin veriler | 27 |
| Çizelge 5 Sistem uygunluk testlerinin sonuçları (Sabit faz: GL Sciences Inertsil® C ₁₈ (150 x 4.6 mm., 3 µm); hareketli faz: CH ₃ CN: H ₂ O (2: 98), h/h) | 34 |
| Çizelge 6 Yöntemin doğruluğuna ilişkin yürütülen çalışmaların sonuçları (n=3) | 35 |
| Çizelge 7 Kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi | 36 |
| Çizelge 8 Gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 37 |
| Çizelge 9 Yöntemin saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri | 38 |
| Çizelge 10 Analizi yapılan gıda ürünlerinin akrilamid içerikleri (n=3) | 51 |
| Çizelge 11 Numune gruplarının akrilamid profili | 55 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| ŞEKİL NO ve ADI | SAYFA |
|--|-------|
| Şekil 1 Akrlamidin tüketim yönünden endüstriyel dağılımı | 3 |
| Şekil 2 Akrlamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu gösterimi | 4 |
| Şekil 3 Glisidamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu gösterimi | 4 |
| Şekil 4 Akrlamidin genel metabolizasyon yolları | 6 |
| Şekil 5 N-(2-karbamoiletıl)valin ve N-(2-karbamoilhidroksietıl)valin'in molekül yapıları | 8 |
| Şekil 6 N7-(2-karbamoil-2-hidroksietıl)-guanin ve N3-(2-karbamoil-2-hidroksietıl)-adeninin molekül yapıları | 8 |
| Şekil 7 Asparajin ve akrlamidin molekül yapıları | 9 |
| Şekil 8 Akrlamidin gıdalarda oluşum yolları | 10 |
| Şekil 9 Asparajinin akrlamide dönüşme mekanizması | 11 |
| Şekil 10 Akrlamidin 190 - 400 nm aralığındaki UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C = 1.68 \times 10^{-4} M = 11.4 \text{ ppm}$) | 27 |
| Şekil 11 İç standart olarak kullanılabilcek maddelerin ve akrlamidin molekül yapıları | 29 |
| Şekil 12 Akrlamid (2.1 $\mu\text{g/mL}$), butiramid (1.84 $\mu\text{g/mL}$) ve metakrlamid (2.08 $\mu\text{g/mL}$) çözeltilerinin kromatogramı | 30 |
| Şekil 13 $F_R - T_R$ grafiğı | 31 |
| Şekil 14 $F_R - A$ grafiğı | 31 |
| Şekil 15 $T - P$ grafiğı | 32 |
| Şekil 16 $T - T_R$ grafiğı | 32 |
| Şekil 17 $T - A$ grafiğı | 32 |
| Şekil 18 Akrlamid (AA, 2.85 – 11.43 ppb) ve metakrlamid (MAA, 392 ppb) içeren çözeltilerin kromatogramı | 33 |
| Şekil 19 Uygulanan ekstraksiyon ve temizleme yöntemi | 40 |
| Şekil 20 Baklava numunesinden elde edilen kromatogram | 41 |
| Şekil 21 Ekmek kabuğı numunesinden elde edilen kromatogram | 42 |
| Şekil 22 ECB bebe bisküvisi numunesinden elde edilen kromatogram | 43 |
| Şekil 23 M sütlü çikolata numunesinden elde edilen kromatogram | 44 |
| Şekil 24 NC kahve numunesinden elde edilen kromatogram | 45 |
| Şekil 25 N kafeinsiz kahve numunesinden elde edilen kromatogram | 46 |

| | | |
|-----------------|---|----|
| Şekil 26 | NG kahve numunesinden elde edilen kromatogram | 47 |
| Şekil 27 | ND çikolata numunesinden elde edilen kromatogram | 48 |
| Şekil 28 | Patates kızartması numunesinden elde edilen kromatogram | 49 |
| Şekil 29 | E sade tahin helva numunesinden elde edilen kromatogram | 50 |
| Şekil 30 | ÜÇK bisküvi numunesinden elde edilen kromatogram | 51 |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------|---|
| A | : Alan |
| <i>A</i> | : Absorbans |
| AA | : Akrilamid |
| ACN | : Asetonitril |
| A_d | : Adenin |
| ADI | : Kabul edilebilir günlük alım dozu |
| A_s | : Asimetri faktörü |
| α | : Seçicilik faktörü |
| BA | : Butiramid |
| BSS | : Bağlı standart sapma |
| C | : Derişim |
| C_y | : Sitozin |
| CAS | : Kimyasal Özetler Servisi |
| CYP2E1 | : Sitokrom P450 2E1 enzimi |
| dak | : Dakika |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| ECD | : Elektron yakalama detektörü |
| EPA | : Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı |
| ESI | : Elektrosprey iyonizasyon |
| Σx^2 | : x kareler toplamı |
| Σy^2 | : y kareler toplamı |
| Σxy | : x ve y değerleri çarpımı toplamı |
| FAO | : Gıda ve Tarım Organizasyonu |
| FDA | : Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi |
| FID | : Alev iyonlaştırma detektörü |
| F_R | : Akış hızı |
| <i>g</i> | : Yerçekimi ivmesi |
| $GA_{\alpha=0.05}$ | : Güven aralığı (0.05 anlamlılık düzeyinde) |
| GC | : Gaz kromatografisi |
| G_u | : Guanin |
| HPLC | : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| Hz | : Hertz |

| | |
|------------------|--|
| IARC | : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı |
| ICH | : Uluslararası Harmonizasyon Konferansı |
| IS | : İç standart |
| <i>i.p.</i> | : Periton içine |
| <i>i.v.</i> | : Damar içine |
| JECFA | : Gıda Katkıları Birleşik Uzman Komitesi |
| <i>k'</i> | : Kapasite faktörü |
| LC | : Sıvı kromatografisi |
| LD ₅₀ | : Gruptaki deneklerin yarısını öldüren doz |
| LOD | : Saptama sınırı |
| LOQ | : Tayin alt sınırı |
| M | : Molarite |
| MAA | : Metakrilamid |
| mAU | : Miliabsorbans birimi |
| MeOH | : Metanol |
| MOE | : Maruz kalma sınırları |
| MS | : Kütle spektrometresi |
| n | : Deney sayısı |
| <i>N</i> | : Teorik tabaka sayısı |
| NOAEL | : Advers etki gözlenmeyen derişim seviyesi |
| OECD | : Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü |
| ODS | : Oktadesil silan |
| P | : Basınç |
| PN | : Pik normalizasyonu |
| ppb | : Milyarda kısım |
| ppm | : Milyonda kısım |
| pptr | : Trilyonda kısım |
| PVDF | : Poliviniliden florür |
| r | : Korelasyon katsayısı |
| rpm | : Dakika başına dönüş sayısı |
| R _s | : Çözünürlük faktörü |
| SFOPH | : İsviçre Halk Sağlığı Federal Bürosu |
| SPE | : Katı faz ekstraksiyonu |
| SS | : Standart sapma |

| | |
|----------------|--|
| T | : Sıcaklık |
| <i>T</i> | : Kuyruklanma faktörü |
| T _h | : Timin |
| T _R | : Tutunma zamanı |
| TÜBİTAK | : Türkiye Bilimsel Teknik Araştırma Kurumu |
| USP | : Birleşik Devletler Farmakopesi |
| UV | : Mor ötesi |
| V | : Volt |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü |

GİRİŞ ve AMAC

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 (JECFA, 2005).

1950’li yıllardan itibaren endüstride geniş ölçüde kullanılan akrilamidin insan yaşamına etki eden başka bir yönünün daha açığa çıkması, konunun çok boyutlu olarak yeniden ele alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Beslenme yönünden ele alındığında akrilamid, pişirilmiş besin maddelerinin büyük bir kısmında meydana gelebilen, çeşitli mekanizmalarla nörotoksik ve karsinogenik etkiler gösteren ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından 2A kategorisinde değerlendirilerek “insanlar için olası karsinogen” olarak tanımlanan bir maddedir (IARC, 1997).

Akrilamid konusunun, son yıllarda bilim dünyasının ve insan sağlığıyla ilgilenen örgütlerin gündemine yerleşmesinin belki de en önemli nedeni, gıdalarda bulunma miktarı en yüksek toksik etkili bileşiklerden biri olması ve bu durumun günümüze kadar fark edilmemiş olmasıdır.

Konunun bilim dünyasına girişi ise 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 inşaatçı çalışan personeli de etkilediği düşünülmüş, yapılan analizlerde bireylerin kanında akrilamidin hemoglobine reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan bazı katılma ürünlerine rastlandığı rapor edilmiştir (Hagmar ve ark., 2001). Bölgede yaşayan insanların, hayvanların ve üretilen gıda maddelerinin akrilamid şüphesi ile analizi, dikkatlerin geriye dönük olarak insanlardaki olası akrilamid maruziyetine yönelmesine yol açmıştır (Tornqvist, 2005a). Bununla bağlantılı olarak yürütülen hayvan deneylerinde, pişirilmiş yem ile beslenen hayvanların kanında akrilamid katılma ürünlerine rastlanmış, dolayısıyla pişirilmiş gıdaların olası bir akrilamid kaynağı olarak değerlendirilebileceği fikri doğmuştur. Yapılan bir çalışmada, hemoglobine bağlanan akrilamid katılma ürünü miktarının, pişmiş yemlerle beslenen sığanlarda, pişmemiş yemlerle beslenen sığanlara göre fark edilir ölçüde artış gösterdiği saptanmış ve pişirilen yiyeceklerin akrilamid içerdiği görüşü ortaya atılmıştır (Tareke ve ark., 2000). Eş zamanlı yapılan bazı çalışmalarda ise akrilamid ile çalışan kişilerdeki maruziyetin 80–100 µg.gün⁻¹ değerine kadar yükselebileceği rapor edilmiştir (Bergmark, 1997; Tornqvist ve ark., 1998). 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 (Tareke ve ark., 2002) ve bu tespit başta İsveç, İngiltere, Norveç, İsviçre, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere

birçok ülkenin resmi gıda komisyonları tarafından da onaylanmıştır (Ruden, 2004). Bu bulguları takiben, gıdalarda akrilamid oluşum yolları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve bu maddenin esas olarak, gıdaların içinde bulunan aminoasitlerden ve glikoz gibi indirgen şekerlerden, Maillard reaksiyonu ile meydana geldiği belirlenmiştir (Mottram, ve ark., 2002; Stadler ve ark., 2002).

Sunulan tez çalışması ile amaçlanan, belirtilen konuya yönelik olarak gıdalarda akrilamid varlığının tespiti için yeni bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve özellikle ülkemizi büyüteç altına alarak kapsamlı bir incelemenin yapılmasıdır. Tezin kapsamı iki temel kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda HPLC cihazı kullanılarak akrilamidin gıdalardaki miktarının tayini için yeni bir yöntemin geliştirilmesi yer almaktadır. Yöntem geliştirme basamakları başlıca analiz şartlarının belirlenmesi, gerekli iyileştirmelerin yapılması, sistem uygunluk testleri ve validasyon çalışmalarından oluşmaktadır.

İkinci kısımda ise geliştirilen yöntemin çeşitli gıda maddelerine uygulanması, elde edilen verilerin değerlendirilerek analizi yapılan ürünlerin akrilamid içeriği bakımından profilinin çıkartılması ve sonuçların yorumlanması yer almaktadır. Bu kısım kapsamında analizi yapılmış olan gıda maddeleri **Çizelge 1**'de gruptandırılarak verilmiştir:

Çizelge 1. Tez çalışması kapsamında analiz edilen gıda türleri

| Yiyecekler | İçecekler | Geleneksel Gıdalar |
|--------------------|-------------|--------------------|
| Kahvaltılık gevrek | Hazır kahve | Tahin helvası |
| Hazır çorba | İçme suyu | Baklava |
| Ekmek | Çay | Tatlı |
| Bisküvi | Süt tozu | Türk Kahvesi |
| Cipsler | | Simit |
| Çikolata | | Börek |
| Hazır kek | | |
| Mısır patlağı | | |
| Şeker | | |
| Ketçap | | |
| Çerez | | |

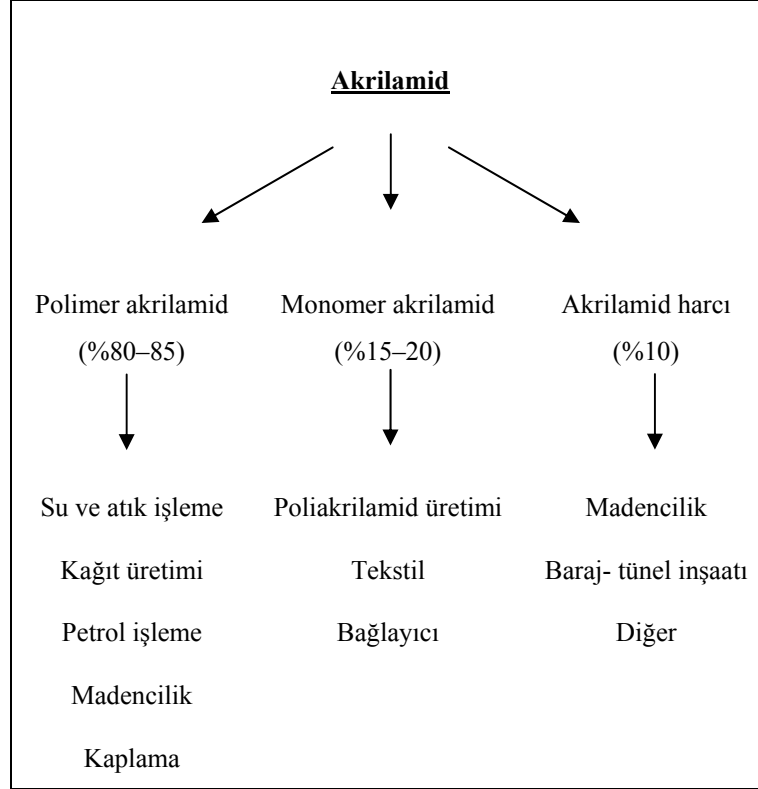
Tez çalışmaları sonucunda geliştirilen analiz yöntemi, ülkemizde gıda endüstrisi alanında üretim yapan kuruluşların kolaylıkla uygulayabileceği nitelikte, analiz araç ve gereçleri ucuz, doğru ve kesin sonuçlar veren bir yöntem özelliğindedir.

Gelişmekte olan ülke statüsünden gelişmiş ülke statüsüne geçme çabasındaki ülkemizde, birçok alanda olduğu gibi gıda üretimi ve kontrolü alanında da iyileştirmelere gerek olduğu açıktır. Bu ise hem güncel yaklaşımların benimsenmesi hem de yeni gelişmelerin ortaya çıkartılmasıyla sağlanabilir. Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde tez konusunun, ülkemizin bu alandaki saygınlığını, rekabet gücünü ve üretim kalitesini artırabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir.

KAYNAK BİLGİSİ

Akrilamid ilk kez 1893 yılında Alman bilim adamı Charles Moureu tarafından, akrilik klorürün benzendeki doymun çözeltisine amonyak eklenmesi yoluyla sentezlenmiştir (Carpenter, 1957). 1930'lu yıllara kadar kullanımı sınırlı olan akrilamidin önemi, tekstil ve yapay kauçuk üretiminde akrilik fiberlerin kullanımının yaygınlaşmasıyla artmıştır. 1954 yılında American Cyanide firması tarafından ticari akrilamid üretimi ile endüstriyel tüketim artmış, akrilamidin polimerleşmesi ve sentezi üzerine yeni yöntemler geliştirilmiştir (Bayer, 1949; Calvin, 1952).

Günümüzde akrilamid, akrilonitrilin bakır katalizi veya sülfürik asit ile hidrolizi yoluyla veya enzimatik yollarla elde edilmektedir. 1999 yılı verilerine göre dünyada yıllık akrilamid üretimi 400.000 tondur (OECD, 2001). Akrilamid en çok poliakrilamid ve türevlerinin üretilmesinde kullanılmaktadır. Bu türevler ise büyük oranda içme suyu, atık su, kağıt, maden ve petrol işlemede kullanılmaktadır. Akrilamidin endüstriyel kullanım alanları ve yüzdeleri **Şekil 1**'de gösterilmiştir.

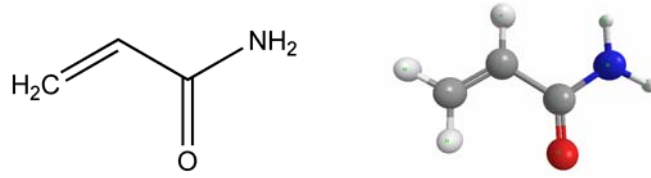


Şekil 1. Akrilamidin tüketim yönünden endüstriyel dağılımı

Günümüze kadar akrilamidin kimyasal özelliklerini, kullanımını ve toksisitesini farklı yönlerden ele alan ve birbiriyle örtüşen yaklaşımların geliştirildiği birçok derleme yayınlanmıştır (Blank, 2005; Friedman, 2003; http-1; LoPachin, 2005; Rice, 2005; Shipp ve ark., 2006; Smith ve Oehme, 1991; Stadler, 2005; Taeymans ve ark., 2004; Tornqvist, 2005b).

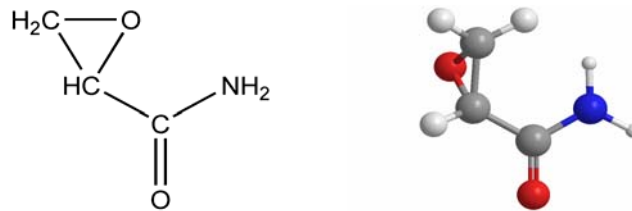
Akrilamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri:

79-06-1 CAS numarasına sahip olan akrilamidin diğer 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. 30 °C suda 2155 mg.mL⁻¹, metanolde 1550 mg.mL⁻¹, etanolde 862 mg.mL⁻¹, asetonda 631 mg.mL⁻¹, etil asetatta 126 mg.mL⁻¹, kloroformda 26.6 mg.mL⁻¹, benzende 3.46 mg.mL⁻¹, heptanda 0.068 mg.mL⁻¹ çözünürlüğe sahiptir ve oktanol-su dağılım katsayısı (log P) -0.78'dir. Erime noktası 84.5 °C, 25 mm Hg basıncına sahip ortamdaki kaynama noktası 125 °C ve parlama noktası 138 °C'dir. 25 °C'deki yoğunluğu 1.127 g.mL⁻¹, 20 °C'deki buhar basıncı 0.007 mm Hg'dir. %50 (a/h) sudaki çözeltisinin pH değeri 5.2-6.0 arasındadır. Yakıcı veya tahriş edici özelliği yoktur. Hem zayıf asidik hem de zayıf bazik karaktere sahip olan akrilamidin iki ve üç boyutlu molekül şekilleri **Şekil 2**'de görülmektedir.



Şekil 2. Akrilamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu gösterimi

Akrilamid iki farklı fonksiyonel gruba sahip monomerik bir yapıdır. Elektronca zayıf bir çifte bağ ile bir amid grubuna sahiptir ve kimyasal reaksiyonlara bu gruplar aracılığıyla katılmaktadır. Akrilamid, sahip olduğu çifte bağ ile amonyak, aminler, alkoller gibi nükleofilik maddelerle Michael tipi katılma reaksiyonları verirken, Diels – Alder reaksiyonlarına ve serbest radikallerle çeşitli reaksiyonlara da girer. Amid grubu ise hidroliz, dehidrasyon ve aldehitlerle kondensasyon reaksiyonları verebilmektedir. Polimerleşmesi, sodyum persülfat ve sodyum bisülfat gibi serbest radikal kaynakları kullanılarak başlatılmakta, reaksiyon şartlarına bağlı olarak doğrusal veya çapraz bağlı polimerler elde edilebilmektedir. Erime noktasının üzerindeki sıcaklıklarda veya UV ışık altında da kolayca polimerleşebilmektedir. Bu reaksiyonlarının yanı sıra akrilamid, vücutta metabolizasyonu esnasında CYP2E1 enzimi aracılığıyla bir epoksit türevi olan glisidamide dönüşmektedir. Glisidamid, akrilamidin zararlarının değerlendirilmesi açısından anahtar bir role sahiptir; çünkü akrilamid, toksik etkilerinin büyük kısmını bu madde aracılığıyla göstermektedir. Glisidamid molekülünün iki ve üç boyutlu molekül şekilleri **Şekil 3**'de verilmiştir.



Şekil 3. Glisidamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu gösterimi

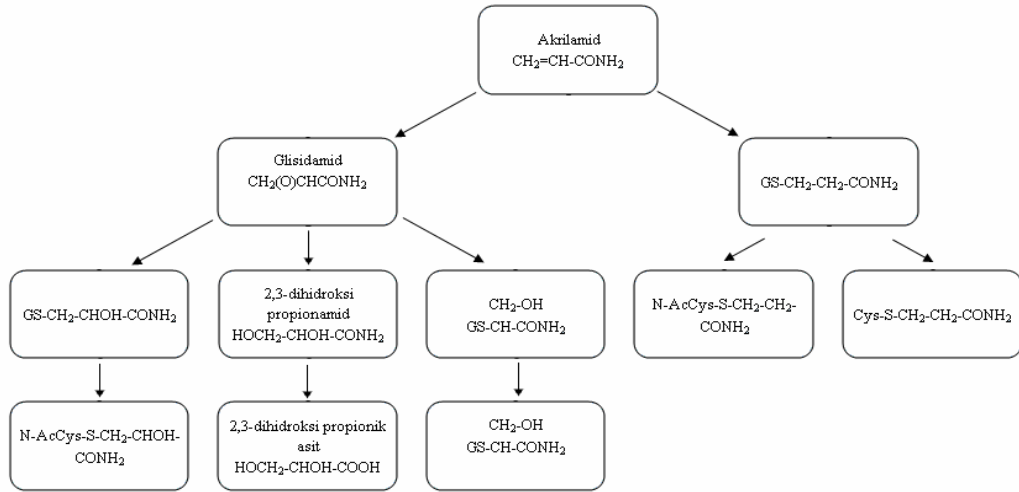
Akrilamidin Toksikokinetik Özellikleri

Akrilamidin gastrointestinal sistemden absorpsiyonu hızlı ve yüksek verimle olmaktadır (Ikeda ve ark., 1987; Marlowe ve ark., 1986). Deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda, farelerde oral uygulamayı takiben, akrilamidin maksimum serum konsantrasyonuna 30 dakikada, glisidamid seviyelerinin ise pik değerlerine 2 saatte ulaştığı belirtilmektedir (Doerge ve ark., 2005a; Twaddle ve ark., 2004).

Farelere ve sıçanlara *i.p.*, oral gavaj ve diyet yoluyla yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen serum akrilamid seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, (*i.p.* uygulama değerinin %100 olarak kabul edildiği belirtilmiştir) farelerdeki serum seviyelerinin gavaj ile %32-50 ve diyet ile %23, sıçanlarda ise sırasıyla %60-90 ve %28-47 seviyelerine ulaştığı bulunmuştur (Doerge ve ark., 2005a ve 2005b). Akrilamidin dermal absorpsiyonuna yönelik olarak gönüllüler üzerine yapılan bir çalışmada cilt üzerine uygulanan %50 akrilamid çözeltisi takiben 24 saat içinde absorpsiyonun %26 oranında görüldüğü belirtilmiştir (Fennell ve ark., 2005). Farklı yöntemler kullanılarak, akrilamidin sıçanlarındaki dermal absorpsiyonuna yönelik yapılan çalışmalarda ise %21-30 oranında absorpsiyon gözlemlendiği rapor edilmiştir (Ramsey ve ark., 1984; Sumner ve ark., 2003). Sumner ve ark. (2003) sıçanlar ve fareler üzerinde yaptıkları deneylerde, akrilamidin absorpsiyonu takiben 24 saat içinde vücudun değişik bölgelerine dağıldığını tespit etmişlerdir. Çalışmada inhalasyonla maruz bırakılmayı takiben en yüksek dağılımın kanda, sonra deri, testisler ve karaciğerde olduğu belirtilmektedir.

Carlson ve Weaver'in (1985) çalışmasında, oral alım sonrası en çok karaciğer ve testislerde, dermal alım sonrasında en fazla deride; *i.v.* uygulamada ise en çok kan, deri ve karaciğerde yayılım olduğu belirtilmiştir (Miller ve ark., 1982; Ramsey ve ark., 1984). Ikeda ve ark. (1983) gebe hayvanlar (sıçan, tavşan, köpek ve domuz) üzerine yaptıkları deneylerde genel olarak organ ve fetusteki dağılımlarda, türlere göre anlamlı farklılıklar olmadığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda akrilamid içeren ürünlerle beslenen annelerde, göbek kordonu ve anne sütü aracılığıyla bebeğe akrilamid aktarımı olduğu tespit edilmiştir (Sorgel ve ark., 2002). Bu geçişin sigara içen annelerde içmeyenlere göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Schettgen ve ark., 2003). Benzer bir durumun akrilamidli yemle beslenen ineklerin sütlerinde ve besi kuşlarının yumurtalarında da görüldüğü rapor edilmiştir (Kienzle ve ark., 2005; Pabst ve ark., 2005;).

Akrilamidin metabolizasyonu üzerine fare, sıçan ve insan deneklerinin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Başlıca metabolik yollar akrilamid ve metaboliti olan glisidamidin glutatyon ile konjugasyonuna dayanmaktadır (Shipp ve ark., 2006). Akrilamidin metabolizasyonu **Şekil 4**'de verilmiştir.



Şekil 4. Akrilamidin genel metabolizasyon yolları

Doerge ve ark. (2005a ve 2005b) akrilamidin toksikokinetik özelliklerini aydınlatmak üzere yürüttükleri çalışmalarında, akrilamidin ilk geçişte eliminasyona uğradığını rapor etmişlerdir. Gönüllüler kullanılarak yapılan çalışmalarda akrilamid metabolitlerinin oral uygulamayı takiben 24 saat içinde %34 (Fennell ve ark., 2005), 72 saat içinde %60 oranında (Fuhr ve ark., 2006) idrarla atıldığı ve başlıca atılan metabolitlerin N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil)sistein (%72 oranında) ve S-(3-amino-3-oksopropil)sistein (%14 oranında) olduğu belirlenmiştir. Fareler ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda da başlıca metabolitin N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil)sistein olduğu ve bu maddenin sıçanlarda ve farelerde toplam metabolit miktarının sırasıyla %67 ve %41'ini oluşturduğu, glisidamid kaynaklı metabolitlerin ise sıçanlarda ve farelerde sırasıyla %33 ve %59 olduğu rapor edilmiştir (Sumner ve ark., 1992). Yapılan başka çalışmalarda da bu sonuçlarla örtüşen sonuçlara ulaşılmıştır (Fennell ve ark., 2005; Kadry ve ark., 1999; Miller ve ark., 1982).

Akrilamidin ayrıca CYP2E1 ile okside olarak glisidamide dönüşmesi de söz konusudur (Bergmark ve ark., 1991); buna göre akrilamid, alımından hemen sonra epoksiti olan glisidamide dönüşmektedir (Calleman ve ark., 1990). Bu bulgu ¹³C ile işaretlenmiş izotoplar kullanılarak yapılan bir çalışma ile de doğrulanmıştır (Sumner ve ark., 1992). Glisidamid kimyasal etkinlik bakımından akrilamide göre daha aktiftir ve akrilamide göre hemoglobin ve DNA ile çok daha fazla etkileşmektedir (Paulsson ve ark., 2002; Segerback ve ark., 1995).

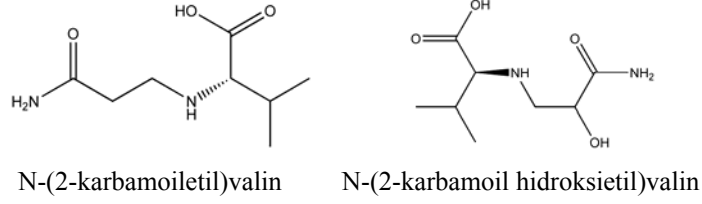
Marlowe ve ark. (1986) tarafından yapılmış bir çalışmanın sonuçlarına göre, akrilamid mideden yüksek verimle emilmekte, karaciğer böbrek ve pankreas tarafından elimine edilmekte ve plasentaya geçmektedir. Frantz ve ark. (1995), ¹⁴C işaretli akrilamid kullanarak yaptıkları bir çalışmada %30 civarındaki dermal absorpsiyon sonrasında idrarda %14, dokularda %7, deri ve solunumla verilen havada %4, feçes, plazma ve kırmızı kan hücrelerinde %1 oranında işaretli bileşiklere rastladıklarını rapor etmişlerdir. İşaretli akrilamid kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise oral, dermal veya inhalasyon yolu ile uygulanan akrilamidin %40–70 oranında idrar, %5–6 oranında feçes, %6 oranında solunum, %15 oranında safra ile atıldığı belirtilmektedir (Shipp ve ark., 2006).

Akrilamidin Toksikolojik Değerlendirmesi

Günümüze kadar akrilamidin toksik özelliklerinin ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Ortak bir görüş olarak, akrilamidin akut toksik etkilerinin yalnızca 100 mg.kg⁻¹ ve üstü dozlarda ortaya çıktığı ve LD₅₀ değerlerinin genellikle 150 mg.kg⁻¹'in üzerinde olduğu belirtilmektedir (JECFA, 2005). Farklı hayvan türleri kullanılarak yapılan deneylerde akrilamidin toksik etkilerini gösterdiği başlıca bölgenin sinir sistemi olduğu tespit edilmiştir. Akrilamide yeterli dozda sürekli maruz bırakılma sonucunda periferik sinirlerde dejenerasyonun meydana geldiği, uzun süreli maruz bırakılma durumunda ise beyindeki öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonların yürütüldüğü bölgelerdeki (serebral korteks, talamus, hipokampus) nöronlarda dejenerasyon ve morfolojik değişiklikler görüldüğü belirtilmiştir (Burek ve ark., 1980; Chapin ve ark., 1995; Friedman ve ark., 1995; Johnson ve ark., 1986; Tyl ve ark., 2000; Wise ve ark., 1995). İçme suyu vasıtasıyla 90 gün boyunca akrilamid verilmiş sıçanlardaki nöronal dejenerasyonun elektron mikroskopuyla incelendiği bir çalışma sonucunda NOAEL değeri nöronlardaki bozulmalar için 0.2 mg.kg⁻¹.gün⁻¹, diğer dokularda neoplasma dışı lezyonlar için ise 5 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ olarak saptanmıştır (Burek ve ark. 1980). Üreme üzerine yürütülen çalışmalarda 7 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ üzerindeki dozlarda erkek kemirgenlerde fertilitede azalma ve sperm sayısı ve morfolojisinde olumsuz değişiklikler gözlenmiştir. Ek olarak, erkek kemirgenlerde üreme hücrelerine mutajen etkili olduğu tespit edilmiş, üreme ve gelişim üzerine yürütülen deneyler için genel NOAEL değeri 2 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ olarak saptanmıştır. Bu konu üzerine yayınlanan bir raporda sinir sistemi bozuklukları yönünden ele alındığında NOAEL değeri 0.2 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ diğer sistemler ve organlar yönünden ele alındığında NOAEL değeri 2 mg.kg⁻¹.gün⁻¹ olarak kabul edilmiştir (JECFA, 2005).

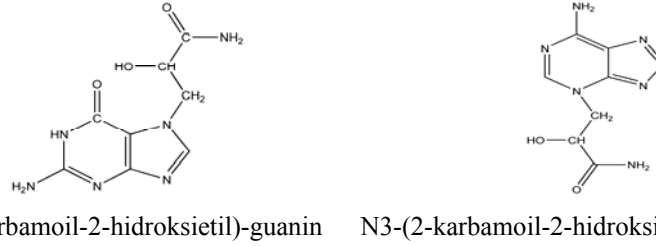
Akrilamidin memeli hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak klastojenik ve mutajenik etkili olduğu ve akrilamidin glisidamide metabolizasyonunun akrilamid genotoksitesisi için önemli bir basamak olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda CYP2E1 aracılıklı oksidasyonun DNA katılım ürünlerinin oluşumu için baskın yolak olduğu ve glisidamidin klastojenik etkiden sorumlu başlıca bileşik olduğu bulunmuştur.

Akrilamid ve glisidamidin hemoglobin ve diğer proteinler ile katılma reaksiyonu ürünleri oluşturduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Barber ve ark., 2001a; Bergmark ve ark., 1991; Hashimoto ve Aldridge, 1970; Maniere ve ark., 2005; Paulsson ve ark., 2002, 2003a, 2003b). Akrilamidin organizmadaki başlıca reaksiyonu, sahip olduğu α , β doymamış C=C çifte bağının, protein ve aminoasit yapılarındaki amin ve tiol grupları ile etkileşerek meydana getirdiği Michael tipi katılma reaksiyonudur. Akrilamidin, hemoglobinlerin N-terminal ucu ile bu reaksiyon aracılığıyla etkileştiği (Bergmark ve ark., 1993; Tareke ve ark., 2000) ve başlıca katılma ürünleri olarak N-(2-karbamoiletıl) valin ve N-(2-karbamoil hidroksietıl) valini oluşturduğu rapor edilmiştir (Fennel ve ark., 2005). N-(2-karbamoiletıl) valin ve N-(2-karbamoil hidroksietıl) valinin molekül yapıları **Şekil 5**'de verilmiştir.



Şekil 5. N-(2-karboiletil)valin ve N-(2-karboilhidroksietil)valin'in molekül yapıları

In vitro olarak akrilamid, DNA'nın azot grupları, adenin ve guaninin bazı amino grupları ile katılma reaksiyonları vermektedir (Solomon ve ark., 1985). Akrilamidin başlıca mutajenik etkisinin, vücutta biyotransformasyonu sonucu oluşan epoksiti olan glisidamid yoluyla ortaya çıktığı (Calleman ve ark., 1990) ve akrilamid - glisidamid uygulanmış hücrelerde $A_d \rightarrow G_u$, $G_u \rightarrow C_y$ ve $G_u \rightarrow T_h$ tarzı baz değişimlerinin normalden daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (Besaratina ve Pfeifer, 2004; Gamboa da Costa ve ark., 2003). ^{14}C izotoplu akrilamid kullanılarak yapılan deneylerde akrilamid ve glisidamidin fare ve sıçanlara *i.p.* uygulanmasından sonra farklı organlarda başta N7-(2-karboil-2-hidroksietil)-guanin ve N3-(2-karboil-2-hidroksietil)-adenin olmak üzere birçok katılma ürününü yüksek oranlarda meydana getirdiği saptanmıştır (Segeberck ve ark., 1995). N7-(2-karboil-2-hidroksietil)-guanin ve N3-(2-karboil-2-hidroksietil)-adeninin molekül yapıları Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. N7-(2-karboil-2-hidroksietil)-guanin ve N3-(2-karboil-2-hidroksietil)-adeninin molekül yapıları

Farklı çalışmalarda bunlara ek olarak glisidamidin akrilamide göre daha fazla katılma ürünü oluşturduğu (Gamboa da Costa ve ark., 2003), guanin kaynaklı katılma ürünlerinin adenin kaynaklılara göre 75 - 100 kat daha fazla olduğu (Twaddle ve ark., 2004) ve katılma ürünlerine daha çok karaciğer, akciğer ve böbreklerde rastlandığı belirtilmiştir (Doerge ve ark., 2005c).

Genel olarak bakıldığında, içme suyu yoluyla akrilamid verilen sıçanlarda, farklı bölgelerde tümör görülme sıklığında artışa rastlandığı belirtilmiştir (Johnson ve ark., 1986; Rice, 2005). Akrilamidin, fare ve sıçanların akciğer, cilt, merkezi sinir sistemi, tiroit ve üreme organlarında mezotelyoma, adenokarsinoma veya adenoma tipinde tümörler oluşturduğu yapılan uzun ve kısa vadeli deneylerle ispatlanmıştır (Bull ve ark., 1984a; Bull ve ark., 1984b; Friedman ve ark., 1995; Johnson ve ark., 1986).

Akrilamide maruz kalma düzeyinin tespitinde kullanılan en önemli yöntem, biomarker olarak görülen hemoglobin katılma ürünlerinin analizidir. İşçi sağlığı üzerine yapılan çalışmalarda mesleki maruziyet sonucu akrilamid almış bireylerin kanlarında bu biomarkere rastlandığı rapor edilmiştir. (Hagmar ve ark., 2001; Perez ve ark., 1999; Paulsson ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda akrilamid maruziyeti ve oluşan katılma ürünü miktarı arasında korelasyon olduğu (Fennell

ve ark., 2005; Hagmar ve ark., 2001), ayrıca sigara içen bireylerdeki biomarker miktarının içmeyenlere göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Hagmar ve ark., 2005). Maruz kalınan akrilamid miktarı ile hemoglobin katılma ürünü miktarı arasında her ne kadar pozitif bir korelasyon görülse de bu yöntemin doğruluğu ve kesinliği üzerine hala belirsizlikler söz konusudur. Bunun sebebi analiz yapan laboratuvarlar arasında ölçüme yönelik farklılıkların var olması ve validasyonu sağlanmış resmi bir analiz yönteminin henüz bulunmamasıdır.

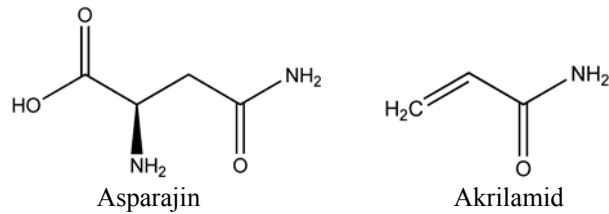
İnsanların endüstriyel yolla veya kazara akrilamide maruz kalması üzerine yürütülen epidemiyolojik çalışmalar, insanlarda akrilamid toksisitesi bakımından en duyarlı sistemin sinir sistemi olduğunu işaret etmektedir. Akrilamide meslekleri nedeniyle maruz kalmış bireyler üzerine birçok epidemiyolojik inceleme yapılmıştır. Bütün olarak ele alındığında akrilamid maruziyetinin kanser sonucu ölümlerle ilişkilendirilemeyeceği ve organ düzeyinde kansere yakalanma riskinde doza bağımlı bir artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Yalnızca yüksek kümülatif dozda akrilamid alan bireylerde pankreas kanseri görülme riskinde iki kat artış olduğu belirtilmektedir (JECFA, 2005).

Akrilamidi, endüstriyel üretim ve tüketim kademelerinde, mesleki maruziyet sonucu alan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda akrilamide mesleki maruziyetin kanser veya ölüm vakalarında anlamlı bir artışa yol açmadığı rapor edilmiştir (Collins ve ark., 1989; Hogan ve Scott, 1990; Marsh ve ark., 1999; Sobel ve ark., 1986). Ancak yapılan bir başka çalışmada mesleki maruziyet sonucunda pankreas kanseri görülme sıklığında artış olduğu belirtilmiştir (Schulz ve ark., 2001).

Hollanda, İsveç, İsviçre, İtalya ve Norveç'te yaşayan halkların, beslenme yoluyla akrilamide maruz kalmaları ve hastalanma risklerinin araştırıldığı çalışmalarda, kanser görülme sıklığında akrilamid alımıyla ilişkilendirilebilecek bir artışa rastlanmadığı rapor edilmiştir (Dybing ve Sanner, 2003; Konings ve ark., 2003; Mucci ve ark., 2003; Mucci ve ark., 2004; Pelucchi ve ark., 2004; Svensson ve ark., 2003).

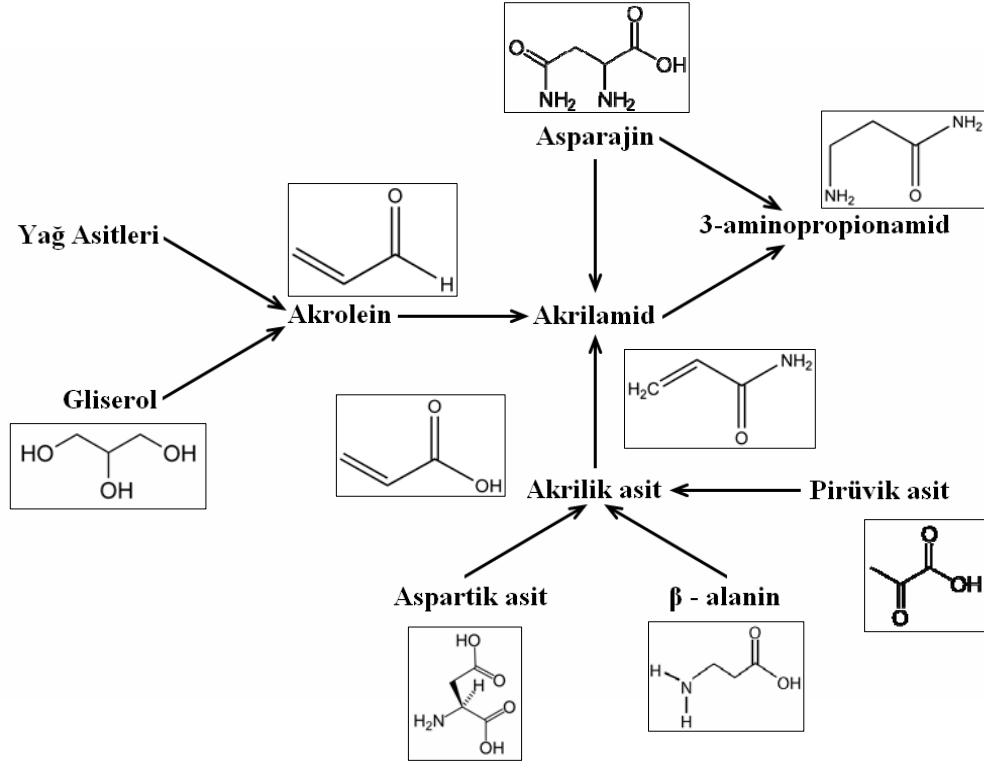
Akrilamidin Gıdalarda Oluşum Yolları

Akrilamid, yüksek karbonhidrat ve düşük protein içerikli bitkisel kaynaklı ürünlerin pişirme ve benzeri termal uygulamalar sırasında yüksek sıcaklığa maruz bırakılması sonucu meydana gelmektedir. Akrilamidin gıdalarda oluşumunu açıklayan birçok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmaların en etkinini, asparajin ve indirgen şekerler üzerinden yürüyen Maillard reaksiyonuna dayanmaktadır. Serbest halde bulunan asparajin akrilamidin en önemli prekürsörü olarak kabul edilmektedir. Asparajin ve akrilamidin molekül yapıları **Şekil 7**'de verilmiştir.



Şekil 7. Asparajin ve akrilamidin molekül yapıları

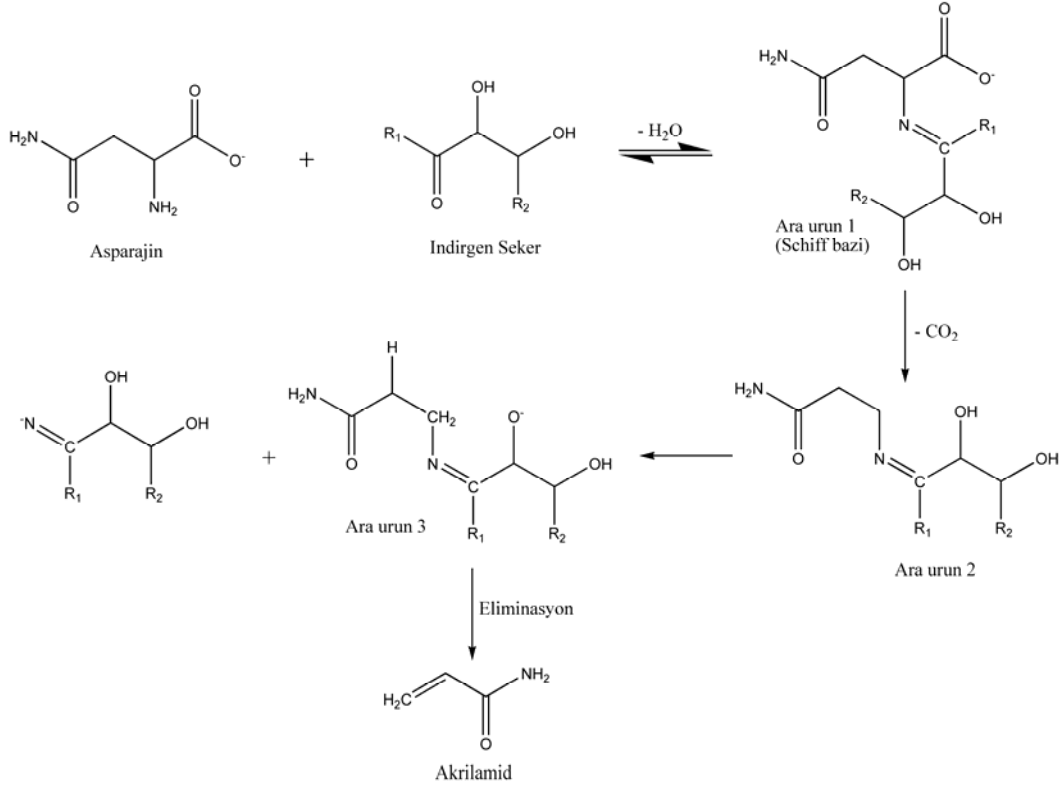
Serbest halde bulunan asparajin indirgen şekerlerle Maillard reaksiyonu ile etkileşmekte, renk ve tadın yanı sıra akrilamidi de meydana getirmektedir. Akrilik asit üzerinden yürüyen oluşum yollarının da var olduğu ancak asparajin yolu kadar etkili olmadığı yapılan literatür incelemelerinde görülmüştür. Akrilamidin gıdalarda oluşum yolları **Şekil 8**'de verilmiştir.



Şekil 8. Akrilamidin gıdalarda oluşum yolları

İlk kez 1912 yılında Louis-Camille Maillard tarafından ortaya konan (Maillard, 1912) ve bu nedenle kendi adıyla anılan Maillard reaksiyonu, şekerlerin ve aminoasitlerin, renk pigmentleri oluşturmak üzere etkileşmelerini açıklayan bir reaksiyondur. Isıya maruz bırakılmış gıdaların kızarmasına veya kahverengi renk almasına neden olan, bir başka deyişle yediğimiz yiyeceklerin güzel görünmesini sağlayan “kızarma” reaksiyonu Maillard reaksiyonudur.

Maillard reaksiyonu, gıdalarda akrilamid oluşumunun temel mekanizması olarak görülmektedir. Bir aminoasit olan asparajinin bu reaksiyon aracılığıyla akrilamide dönüştüğü yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Mottram, ve ark., 2002; Stadler ve ark., 2002). Asparajinin tek başına termal olarak akrilamid oluşturabildiği de rapor edilmiş olmakla birlikte (Yaylayan ve ark., 2003) asparajinin akrilamide dönüşebilmesi için indirgen özellikli şekerlere ihtiyaç duyduğu birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Becalski ve ark., 2003; Stadler ve ark., 2003; Stadler ve ark., 2004; Zyzak ve ark., 2003). Asparajinin akrilamide dönüşme mekanizması **Şekil 9**'da verilmiştir.



Şekil 9. Asparajinin akrilamide dönüşme mekanizması

Pişirme süresi ve sıcaklığı ile akrilamid oluşumu arasında doğrusal bir ilişki olmakla birlikte aynı gıda tiplerinin farklı ürünleri veya aynı ürünlerin farklı tarihlerde üretilmiş olanları arasında bile akrilamid içeriği bakımından farklılıklar görülmektedir. Benzer bir durum evde pişirme söz konusu olduğunda da ortaya çıkmaktadır. Gıdanın özellikle sahip olduğu asparajin ve indirgen şekerler (başlıca fruktoz ve glikoz) yönünden bileşimi, türü, saklama koşulları, dönemsel değişiklikler de akrilamid miktarı üzerine farklılıklara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda pH değeri ve su içeriğinin de akrilamid oluşumuna etki ettiği ve ortamda Maillard reaksiyonuna girmeye uygun diğer aminoasitlerin bulunmasının akrilamid oluşumunu azalttığı belirtilmektedir.

3-aminopropionamidin de akrilamid oluşumunda oldukça etkili bir prekürsör olduğu tespit edilmiştir. Bu maddenin asparajinden akrilamid oluşumu reaksiyonunda bir ara madde olduğu, asparajinin dekarboksilasyonu sonucunda oluştuğu ve akrilamide dönüştüğü yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Granvogl ve ark., 2004; Stadler, ve ark., 2004; Zyzak ve ark., 2003).

Pirüvik asit de akrilamid oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonlara katılmaktadır. Maddenin amonyak varlığında sırasıyla pirüvik asit, laktik asit, akrilik asit ve akrilamid yönünde değişime uğradığı belirtilmektedir (Wronowski ve Yaylayan, 2003; Yaylayan ve ark., 2005a, 2005b).

Gıdalarda akrilamid varlığının kanıtlanmasından sonra dünya çapında birçok resmi kuruluş bu maddenin oluşumu ve azaltılması üzerine çalışmalar başlatmıştır. Yayınlanan raporlarda, yürütülmekte olan üretim basamaklarında yapılan iyileştirmelerle, patates cipslerindeki akrilamid miktarlarında %30-40 oranında azalma sağlanabileceği belirtilmektedir (JECFA, 2005). Ancak bu

iyileştirmelerin papates cipsi üreticileri tarafından hangi yaygınlıkta uygulandığı belirsizdir. Benzer öneriler ve durumlar kahve ve kahvaltılık gevrekler için de söz konusudur.

Gıda modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda akrilamid miktarının azaltılabilmesi için birçok seçeneğin bulunduğu belirtilmektedir. En verimli yöntem, prekürsör madde olan asparajinin pişirme öncesinde gıdaya asparajinaz enzimi katılarak seçici olarak yok edilmesidir. Bunun yanı sıra asparajinin azaltılmasına yönelik alternatif yöntemler de vardır. Akrilamid miktarının azaltılması için önerilen diğer yöntemler ise temel gıda kompozisyonunun değiştirilmesi (Maillard reaksiyonuna asparajinle yarışmalı olarak giren aminoasitlerin katılması gibi) ve pişirme şartlarının değiştirilmesidir (sıcaklığın düşürülmesi gibi). Ne var ki bu önerilerin büyük ölçekli üretimlere uygulanabilirliği henüz tam olarak değerlendirilmemiştir. Bu noktada üretim yöntemlerinin tüketici memnuniyeti, ürünlerin besleyicilik özellikleri ve olası zararlı maddelerin oluşumu üzerine etkilerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Akrilamid Analizlerinin Analitik Değerlendirmesi

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 yayımlanmış olan yöntemlerin farklı uygulamaları üzerine yoğunlaşmışlardır.

Sıvı Kromatografisi Yöntemleri

Sıvı kromatografisi kullanılarak yürütülen çalışmalarda akrilamidi yüksek oranda çözebilme gücü nedeniyle başlıca ekstraksiyon çözücüsü olarak su tercih edilmiş ve bazı örneklerin içerdiği yağda çözünen bileşikler apolarlığı yüksek çözücülerle arındırılmıştır. Örnekler genellikle katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmiş, sıvı-sıvı ekstraksiyonu nadiren tercih edilmiştir.

Kromatografik ayırma işlemlerinde başta Hypercarb olmak üzere çok çeşitli ters faz kolonları kullanılmıştır. 50 – 250 mm aralığında uzunluğa, 2 – 4.6 mm genişliğinde iç çapa sahip olan ve 3 – 10 µm çaplı partiküllerle doldurulmuş kolonların kullanıldığı çalışmalarda genellikle teorik tabaka sayısı 10.000'i geçen ayırımlar gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda çok çeşitli hareketli faz bileşimlerinin kullanıldığı görülmektedir. Akrilamid yapı olarak polaritesi yüksek bir madde olduğu için hareketli faz bileşimleri de buna bağlı olarak yüksek polaritede tutulmuştur. Miktar tayini işlemlerinde çoğunlukla kütle spektrometrisi ve foto diyot dizisi detektörler tercih edilirken, analizlerde ppb seviyesinde tayinler yapılabilmektedir. İç standart olarak genellikle izotoplu akrilamid türleri, metakrilamid ve butiramid tercih edilmiştir. Sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan çalışmaların başlıca teknik özellikleri **Çizelge 2**'de verilmiştir.

Çizelge 2. Sıvı kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| Örnek | Ekstraksiyon Yöntemi veya Kartuşu | Kolon ve Boyutları | Hareketli Faz, Akış Hızı, T _R | Detektör, IS, Enjeksiyon Hacmi | LOD, LOQ, Aralık | Kaynak |
|--------------------------------|--|--|---|---|---|---------------------------|
| Sıçan plazması | Asetonitrille çöktürme, filtrasyon | Luna C ₁₈ (2) (Phenomenex) 250 mm x 3 mm x 5 µm | 5 mM Heptansülfonik asit : MeOH (99:1), 0.5 mL.dak ⁻¹ , 5.4 dak | UV- 200 nm, 20 µL | 0.025 µg.mL ⁻¹ , 0.1 µg.mL ⁻¹ 0.1 – 100 µg.mL ⁻¹ | Barber ve ark., 2001b |
| Akrilamid poimerleri | Metanol, filtrasyon | Partisil 10 PAC (Whatman) 250 mm x 4.6 mm | Metilen klorür: MeOH (90:10), 1 mL.dak ⁻¹ , | UV-240, -, - | 100 ppm | Ludwig ve Besand, 1977 |
| Patates kızartması | Oasis HLB, Carrez I ve II, Filtrasyon, | Atlantis dC18, HILIC, Zorbax, Luna (Waters), 50 mm x 2.1 mm x 5 µm | Su %100, 0.5 – 1mL.dak ⁻¹ , 7-12 dak | UV-226, -, -, | 2 µg.mL ⁻¹ – 4 µg.mL ⁻¹ 0.1 – 2 µg.mL ⁻¹ | Gokmen ve ark., 2005 |
| Kahve | Isolute Multimode (IST) (300 mg) | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5 µm | % 0.1 Formik asit, 0.2 mL.dak ⁻¹ , 3.70 dak | MS/MS, [² H ₃] AA, 10 µL | 2 µg.L ⁻¹ , 2 – 30 µg.L ⁻¹ | Granby ve Fagt, 2004 |
| Çeşitli Polimerler | 10 g / 50 mL MeOH | Partisil 10 PAC (Whatman) 250 mm x 4.6 mm x 10 µm | MeOH: CH ₂ Cl ₂ (15: 85) 1 mL.dak ⁻¹ , 4.2 dak | UV-240 nm, Benzamid, 10 µL | 1 ppm, -, 1 – 16 ppm | Husser ve ark., 1977 |
| Patates Kızartması | Su, Oasis HLB (Waters) | Aquasil C ₁₈ (Thermo) 250 mm x 2.1 mm x 5 µm | MeOH: 1 mM NH ₃ -Format (16:84) 0.175 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [¹³ C ₃]AA, 10 µL | -, -, 10-500 ng.mL ⁻¹ | Becalski ve ark., 2004 |
| Kızarmış patates | 400 mM Perklorik asit, - | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5 µm | %0.1 Formik asit: ACN (98:2) 0.3 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, MAA, 10 µL | 1 ng.mL ⁻¹ , 3 ng.mL ⁻¹ , 1-10000 ng.mL ⁻¹ | Taubert ve ark., 2004 |
| Tahıllar, patates kızartması | Su, Isolute Multi-Mode 300 mg (IST), | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5 µm | %100 Su 0.4 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃]AA, 10 µL | 10 µg.kg ⁻¹ , 30 µg.kg ⁻¹ 25-2000 µg.kg ⁻¹ | Rosen ve Hellenas, 2002 |
| Kahvaltılık tahıl ve krakerler | Su, Isolute Multimode 2, 2x2 > Accubond II SCX 1, 1 mL | Shodex RSPak DE-613 (Showa Denko) 150 mm x 6 mm | % 0.01 Formik asit: Metanol (6:4) 0.35 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS, [¹³ C ₃] AA, 50 µL | -, 45 ng.mL ⁻¹ , - | Riediker ve Stadler, 2003 |

Çizelge 2. (Devam) Sıvı kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|--|---|--|-------------------------------|
| Kahve | Su, Oasis HLB 6 mL; Bond Elut-Accucat | Synergi Hydro-RP 25 mm x 2 mm x 4 µm | % 0.5 MeOH 0.2 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [¹³ C ₃]AA, 1 µL | 10 µg.kg ⁻¹ , -, 8 – 3600 ng.mL ⁻¹ | Andrzejewski ve ark., 2004 |
| Japon yemekleri | Su, Mixed-Mode SPE 500 mg | Atlantis dC ₁₈ (Waters) 150 mm x 2.1 mm x 3 µm | MeOH : Su (10:90), 0.1 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃]AA, 2 µL | 0.2 ng.mL ⁻¹ , 0.8 ng.mL ⁻¹ , 20 – 1000 ng.mL ⁻¹ | Ono ve ark., 2003 |
| Kızarmış ekmek ve patates cipsi | Su, Isolute M-M 300 mg (Jones) | Primesphere 5C ₁₈ -HC (Phenomenex) 250 mm x 3.2 mm x 5 µm | % 0.1 Asetik asit: %2.1 ACN 0.5 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, MAA, [² H ₃]AA, [¹³ C ₃]AA 50 µL | -, -, 0.01 – 100 mg.L ⁻¹ | Ahn ve ark., 2002 |
| Çikolata tozu, kakao ve kahve | Su, Carrez I ve II, Isolute MultiMode-500 | Shodex RSpak DE-413L (Showa Denko) 150 mm x 6 mm | MeOH: Su: Formik asit (30:70:0.007) 0.6 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃] AA, 60 µL | 9.2 mg.kg ⁻¹ , 12.5 mg.kg ⁻¹ , 10 – 2500 µg.kg ⁻¹ | Delatour ve ark., 2004 |
| Çeşitli gıdalar | Su, Oasis HLB (Waters) | Synergi Hydro-RP (Phenomenex) 250 mm x 2 mm x 4 µm | - % 0.5 MeOH + % 0.1 Asetik asit (suda) 0.2 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS, [¹³ C ₃] AA, 20 µL | 10 µg.kg ⁻¹ , -, 8 – 3600 ng.mL ⁻¹ | Roach ve ark., 2003 |
| Patates kızartması | Su, Strata-X-C SCX (Phenomenex) | Synergi Hydro-RP (Phenomenex) 250 mm x 2 mm x 4 µm | % 0.1 formik a. (su): % 0.1 formik a (MeOH) (96:4) 0.5 mL.dak ⁻¹ | MS, [² H ₃] AA, 25 µL | -, -, 10 – 100 ng.mL ⁻¹ | Peng ve ark., 2003 |
| Patates cipsleri ve kızartmaları | Su, filtrasyon | Mightysil RP-18 GP (Kanto) 100 mm x 2 mm x 5 µm | Su: MeOH (80:20), 0.2 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS, [¹³ C ₁] AA, 20 µL | 1 ng.mL ⁻¹ , 5 ng.mL ⁻¹ , 5 – 1000 ng.mL ⁻¹ | Inoue ve ark., 2003 |
| Ekmek, patates kızartması | MeOH: Su (5: 95, v/v), direkt enjeksiyon | Alltima C ₁₈ LC (Alltech) 150 mm x 3.2 mm x 5 µm | ACN: 5 mM Formik Asit (5:95), 0.3 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃] AA, 5 µL | -, 30 µg.kg ⁻¹ , 50 – 2000 µg.kg ⁻¹ | Konings ve ark., 2003 |
| Patates cipsi, bisküvi, tahıllar | Hekzan, Su, Carrez I ve II | LiChrospher 100 CN (Merck) 250 mm x 4 mm x 5 µm | ACN: % 1 Asetik asit (50:50), 0.7 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃] AA, 10 µL | 10 µg.kg ⁻¹ , 30 µg.kg ⁻¹ , 5 -1500 µg.kg ⁻¹ | Hoenicke ve ark., 2004 |
| Et, patates kızartması | Su, Isolute Multi-Mode 300 mg (IST) | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5µm | %100 Su, 0.2 mLdak ⁻¹ , 3.40 dak | ESI-MS/MS, [¹³ C ₃] AA, 20 µL | 10 µg.kg ⁻¹ , -, 10 – 5000 µg.kg ⁻¹ | Tareke ve ark., 2002 |

Çizelge 2. (Devam) Sıvı kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| | | | | | | |
|--------------------------------------|--|---|--|--|--|-------------------------|
| Çeşitli gıdalar | Su, filtrasyon, doğrudan enjeksiyon | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5µm | %100 Su, 0.2 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS [¹³ C ₃] AA, 20 µL | 10 µg.L ⁻¹ , 10 µg.L ⁻¹ 1 – 500 µg.L ⁻¹ | Rydberg ve ark., 2003 |
| Patates cipsi, ekmekek, kahve, tahıl | Su + CH ₂ Cl ₂ , Oasis MAX ve Oasis MCX, ENVI-carb | Hypercarb (Thermo) 150 mm x 2 mm x 5µm | 1 mM amonyum format (% 15 MeOH içinde) 0.175 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [¹³ C ₃] AA, 5 µL | 6 µg.kg ⁻¹ , -, 10-500 ng.mL ⁻¹ | Becalski ve ark., 2003 |
| Patates kızartması | Su, Isolute Multi-Mode 300 mg (IST) | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5µm | % 0.1 Formik asit 0.250 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS, [² H ₃] AA, 10 µL | -, 2 ng.L ⁻¹ , 2-30 ng.L ⁻¹ | Pedreschi ve ark., 2005 |
| Patates kızartması | 2 M NaCl, Oasis HLB 200 mg ve MCX 150 mg 6 cc (Waters) | Atlantis dC ₁₈ (Waters) 150 mm x 2.1 mm x 5 µm | %0.1 Formik asit, 0.2 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS [² H ₃] AA, | -, 100 ng.g ⁻¹ 100 – 2000 ng.g ⁻¹ | Young ve ark., 2004 |
| Sudaki Poliakrilamid ürünleri | Su doğrudan enjekte edilmiş | ODS-AL-302 (Nalco) 150 mm x 4.6mm x 5 µm ; FAA (YMC) 100 mm x 7.8 mm x 9 µm | 0.01 M H ₂ SO ₄ , 0.6 mL.dak ⁻¹ | UV (210 nm), 100 µL | 0.003 ppm, 0.01 ppm, 0.01 – 5 ppm | Ver Vers, 1999 |
| Avustralya yemekleri | Bond Elut Accucat MAX-MCX 600 mg 3 mL | Aqua C ₁₈ (Phenomenex) 150 mm x 2.0 mm x 3 µm | %2 Formik asit: su: MeOH (5:95:2) 0.2 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃]AA, 10 µL | 22 µg.kg ⁻¹ , 36 µg.kg ⁻¹ 20 – 2000 µg.kg ⁻¹ | Croft ve ark., 2004 |
| Sudaki Poliakrilamid ürünleri | Su doğrudan enjekte edilmiş | Hypersil-ODS (HP) 200 mm x 2.1 mm x 5 µm | 0.84 g KH ₂ PO ₄ (960 mL suda): 40 mL MeOH, 0.3 mL.dak ⁻¹ | UV (210 nm), 50 µL | 0.003 ppm, 0.01 ppm, 0.01 – 5 ppm | Ver Vers, 1999 |
| Poliakrilamid ürünleri | Asetonitril-su, basamaklı ekstraksiyon | RCM-100 (Waters) 100 mm x 8 mm x 10 µm; FAA (Bio-Rad) 100 mm x 7.8 mm x 10 µm | 0.02 M H ₂ SO ₄ 0.6 mL.dak ⁻¹ | UV (210 nm) 1.0 mL/dak 100 µL | 0.5 ppm, 5 ppm, | Tseng, 1990 |
| Gıdalar, anne sütü, dokular | Sıvı-sıvı ekstraksiyonu | Ters faz, Belirtilmemiş | Su: asetik asit, org. çözücü (Oranları yok) | MS/MS, 20 µL | -, 1 ng.mL ⁻¹ 1 – 1000 ng.mL ⁻¹ | Sorgel ve ark., 2002 |
| Şeker | Basamaklı sıvı-sıvı ekstraksiyon | Partisil 10 ODS-2 (Whatman) 250 mm x 4.6 mm | MeOH: su (65:45) 1.0 mL.dak ⁻¹ | MS -, 100 µL | 200 pptr 200 – 2000 pptr | Cutie ve ark., 1986 |

Çizelge 2. (Devam) Sıvı kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| | | | | | | |
|--------------------------------|--|---|---|--|---|------------------------------|
| Patates ürünleri | Su, Isolute Multimode SPE (IST) 300 mg | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5µm | %0.1 Formik asit, 0.25 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS, [² H ₃]AA, 10 µL | 1 ng.mL ⁻¹ , 2 ng.mL ⁻¹ , 2 – 30 ng.L ⁻¹ | Pedreschi ve ark., 2005 |
| Bisküvi, ekmeç, patates cipsi, | Carrez I ve II, Extrelut 20 NT | Luna PhenylHexyl (Phenomenx) 250 mm x 4.6 mm x 5 µm | ACN : 1 g.L Asetik asit (suda) (Gradient: 30:70 > 60:40) 0.8 mL.dak ⁻¹ | MS, [¹³ C ₃] AA, 20 µL | 6.6 µg.kg ⁻¹ , 19.6 µg.kg ⁻¹ , - | Jezussek ve Schieberle, 2003 |
| Brezilya yiyecekleri | Oasis HLB (Waters) 200 mg, 6 mL | µ-Bondapak C ₁₈ – 300 mm x 3.9 mm x 5 µm | %0.1 Asetik asit, 0.6 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, [² H ₃] AA, 0.1 µL | 2 ng.mL ⁻¹ , -, 2 – 20000 ng.mL ⁻¹ | Arisseto ve ark., 2007 |
| Doku kültürü çözeltileri | Ekstraksiyon yapılmamış | Radial-Pak C ₁₈ (RCSS), 10µm, | 0.001 N H ₂ SO ₄ 3 mL.dak ⁻¹ | UV (210 nm) | 1 ng.mL ⁻¹ , 5 ng.mL ⁻¹ 1 – 1000 ng.mL ⁻¹ | Freshour ve ark., 1985 |
| Hong Kong Yemekleri | Su, Oasis HLB (Waters) 200 mg, 6 mL | Hypercarb (Thermo) 150 mm x 2.1 mm x 5 µm | % 10 asetik asit : metanol (9:1) 0.2 mL.dak ⁻¹ | ESI-MS/MS [¹³ C ₃] AA, 20 µL | 3 µg.kg ⁻¹ , 10 µg.kg ⁻¹ 3 – 2000 µg.kg ⁻¹ | Leung ve ark., 2003 |
| Patates cipsi, kızartması | Su ile ASE100 ekstraktörü, Mixed Mode SPE 500 mg | IonPac ICE-AS1 (Dionex) 250 mm x 4 mm x 7.5 µm | 3 mM Formik asit ACN: Su (30:70) 0.15 mL.dak ⁻¹ | UV (202 nm) | -, -, 10 – 1000 µg.mL ⁻¹ | Hofler ve ark., 2002 |
| Patates cipsi, kızartması | Su ile ASE100 ekstraktörü, Mixed Mode SPE 500 mg | IonPac ICE-AS1 (Dionex) 250 mm x 4 mm x 7.5 µm | 3 mM Formik asit ACN: Su (30:70) 0.15 mL.dak ⁻¹ | UV (202 nm) | -, -, 10 – 1000 µg.mL ⁻¹ | Cavalli ve ark., 2004 |
| Çevresel ürünler | Su, - | Partisil-10 ODS-2 250 mm x 4.6 mm | Su %100, 2 mL.dak ⁻¹ , 5.4 dak | UV (208 nm), [² H ₃] AA, 20 µL | -, -, 1-500 ppm, | Skelly ve Husser, 1978 |
| Çeşitli gıda maddeleri | Su, Bond Elut C18 ve Bond Elut Accucat 600 mg (Varian) | Hypercarb (Thermo) 50 mm x 2.1 mm x 5 µm | %0.1 Asetik asit MeOH: Su (95:5) 0.25 mL.dak ⁻¹ | MS, [¹³ C ₁]AA, 10 µL | 9 ng.g ⁻¹ , 30 ng.g ⁻¹ , -, | Takatsuki ve ark., 2003 |
| Bebek Mamaları | Su, Oasis HLB SPE (200 mg & mL) | Atlantis dC18 (210 mm x 1.5 mm x 5 µm) | MeOH: %1 Formik asit (10:90) 0.2 mL.dak ⁻¹ | MS/MS, ¹³ C ₃ -AA, 10 µL | 0.1-5 ng.mL ⁻¹ , 0.3 µg.kg ⁻¹ , 1 µg.kg ⁻¹ | Jiao ve ark., 2005 |

Çizelge 3. Gaz kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| Örnek | Ekstraksiyon Yöntemi veya Kartuşu | Kolon ve Boyutları | Analiz Şartları | Detektör, IS / Türev Enjeksiyon Hacmi | LOD, LOQ, Aralık | Kaynak |
|-------------------------------------|--|---|-------------------------------------|--|---|---------------------------|
| Bıldırcın eti, organları, yumurtası | Su, 1-propanol, Carrez I ve II, Extrelut 20 NT | FFAP (Agilent) 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm | 60 °C > 240 °C | MS/MS, ² H ₃ -AA, 2 µL | 3.5 µg.kg ⁻¹ , 10 µg.kg ⁻¹ , - | Kienzle ve ark., 2005 |
| Kavrulmuş badem ve fındık | Su, Carrez I ve II, Filtrasyon | BGB Wax 12 m x 0.25 mm x - | 70 °C > 220 °C | MS, ¹³ C ₃ -AA, MAA, 50 µL | 4 µg.L ⁻¹ , 10 µg.L ⁻¹ 10 – 1000 µg.L ⁻¹ | Amrein ve ark., 2005 |
| Laboratuvar içi hava | Metanol, Silikajel | Fenil – metilpolisiloksan (12:88) kolon, 30 m x 0.53 mm x 1.5 µm | 100 °C, 7 mL/dak | Nitrojen-Fosfor detektörü, -, 2-3-5 µL | -, -, 0.01- 10 µg.mL ⁻¹ | Pantusa ve ark., 2002 |
| Sıçan siyatik siniri | Su, Filtrasyon | DB-23 (JW) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 75 °C > 155 °C 40 mL/dak | ECD 200 °C, Br, 1 µL | 3 µg.g ⁻¹ , -, 2.2 – 7.4 µg.mL ⁻¹ | Raymer ve ark., 1993 |
| Akrilamid jelde üretilen ürünler | Su, filtrasyon | DBwax (JW) 30 m x 0.53 mm x 1.00 µm | 100 °C > 170 °C 40 mL/dak | ECD 300 °C, Br, 1 µL | 3 ppb, 10 ppb, 5-100 ppb | Bologna ve ark., 1999 |
| 1R4F Kentucky sigara dumanı | Duman 2-propanolde çözülmüş | DB-225 (JW) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 40 °C > 220 °C, | MD-MS, ² H ₃ AA, 5 µL | -, -, 0.2 – 8 µg | White ve ark., 1990 |
| Kızartılmış Gıdalar | Su, Carbograph 4 1000 mg (LARA) | HP PAS 1701 (Agilent) 25 m x 0.32 mm X 0.25 µm | 65 °C > 250 °C, | MS, N,N-Dimetil-AA / Br, 2 µL | 5 µg.kg ⁻¹ , -, 5-500 µg.kg ⁻¹ | Tareke ve ark., 2000 |
| Karbonhidratlı, proteinli gıdalar | Su, Carbograph 4 1000 mg (LARA) | BPX-10 (Varian) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 65 °C > 250 °C, -, | MS, N,N-Dimetil-AA ve [¹³ C ₁]AA, 2 µL | 5 µg.kg ⁻¹ , -, 5-500 µg.kg ⁻¹ | Tareke ve ark., 2002 |
| Domates | Su, Bond-Elut 500 mg | DB 17 (J&W) 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm | 65 °C > 250 °C, | MS, Metakrilamid /Br, 1 µL | 1µg.kg ⁻¹ , -, - | Castle ve ark., 1991 |
| Patates kızartması | Su, Isolute Multimode SPE 500 mg | CP-Sil 24 CB Lowbleed, 30 m x 0.32 mm x 0.5 µm | 85 °C > 175 °C > 175 °C > 250 °C | MS, Br, ² H ₃ AA, - | 12 ng.mL ⁻¹ , 40 ng.mL ⁻¹ , 20-1000 ng.mL ⁻¹ | Ohara-Takada ve ark, 2005 |
| Mantar | Su, Bond-Elut 500 mg | DB 17 (J&W) 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm | 65 °C > 250 °C | MS, 2,3-dibromo-2-metilpropyramid / Br, 1 µL | 1µg.kg ⁻¹ , -, - | Castle ve ark., 1993 |
| Kızarmış ekmek ve patates | Su, Kimyasal işlem | DB 17 (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm | 85 °C > 175 °C 175 °C > 250 °C | MS, Metakrilamid / Br, 1 µL | 25 µg.kg ⁻¹ , -, - | Ahn ve ark., 2002 |

Çizelge 3. (Devam) Gaz kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| | | | | | | |
|------------------------------|---|--|-------------------------------------|--|---|--|
| Karbonhidratlı Gıdalar | Su, Extrelut NT20 (Merck) | BGB Wax 30 m X 0.25 mm x 0.25 µm | 60 °C > 186 °C > 186 °C > 250 °C | MS, Propionamid, 1 µL | -, -, 10 – 30 µg.kg ⁻¹ | SFOPH, (2003) |
| Gıdalar | Su, Kimyasal işlem | Carbowax 20 M (Fluka) 10 m x 0.25 mm x 0.4 µm | 70 °C > 220 °C | MS/MS, [² H ₃]AA, MAA ve butiramid, 1 µL | 3 µg.L ⁻¹ , 10 µg.L ⁻¹ 10 – 100 µg.L ⁻¹ | Biedermann ve ark., 2002 |
| Japon yemekleri | Su, Isolute Multi-Mode 500 mg (IST) | CP-Sil 24 CB (Varian) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 85 °C > 175 °C > 175 °C > 250 °C | MS, [² H ₃]AA / Br, 1 µL | 12 ng.mL ⁻¹ , 40 ng.mL ⁻¹ , 20-1000 ng.mL ⁻¹ | Ono ve ark., 2003 |
| Fırınlanmış gıdalar | n-Hegzan, Soxhlet,, Kimyasal işlem | Supelcowax (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.20 µm | 60 °C > 240 °C, | MS, -, 1 µL | 2 µg.kg ⁻¹ , 10 µg.kg ⁻¹ , 10 – 4000 µg.L ⁻¹ | Tateo ve Bononi, 2003 |
| Çeşitli gıdalar | Su, n-hegzan, Sep-Pak Plus Florisol (Waters) | DB-Wax 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm | 50 °C > 240 °C | MS, [¹³ C ₁]AA / Br, 2 µL | 9 ng.g ⁻¹ , 30 ng.g ⁻¹ , - | Nemoto ve ark, 2002 |
| Çeşitli gıdalar | Su, - | Stabilwax Crossbond Carbowax (TR) 15 m x 0.25 mm x 0.25 mm | 40 °C > 220 °C | MS, [¹³ C ₃] AA / Br, 1 µL | 5 µg.kg ⁻¹ , -, 5-1000 µg.kg ⁻¹ | Robarge ve ark.,2003 |
| Tahıllı gıdalar | SPME (Supelco) 100 µm (PDMS) | CP-Sil 8 CB (Varian) 30 m x 0.26 mm x 0.25 µm | 50 °C > 100 °C > 100 °C > 250 °C | MS, Sililleme, 1 µL | 5 µg.kg ⁻¹ , -, 5-500 µg.kg ⁻¹ | Lagalante ve Felter, 2004 |
| Tahıllı gıdalar | Su, Carrez I ve II, Florisol kolon | ZB-WAX (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 65 °C > 170 °C > 170 °C > 200 °C | MS, [¹³ C ₃] AA / Br, 2 µL | 2 µg.kg ⁻¹ , -, 5 – 500 µg.kg ⁻¹ | Pittet ve ark., 2004 |
| İçme suyu, kahve | Dietil eter, sıvı-sıvı ekstraksiyon | DB5 MS (Agilent) 30 m x 0.32 mm x 1 µm | 100 °C > 240 °C 240 °C > 320 °C | MS/MS, [² H ₃] AA, 1 µL | 0,003 µg.L ⁻¹ , -, - | Perez ve Osterman- Golkar, 2003 |
| Patates cipsi | Metanol, Soxhlet ekstraksiyonu | BP 21 (Agilent) FID-15 m, MS 30 m x 0.25 mm x 0.25µm | 75 °C > 230 °C | FID ve MS, -, 2.5 µL | | Pedersen ve Olsson 2003 |
| Zencefilli kek | Musluk suyu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu | BGB-Wax (BGB) 12 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 70 °C > 220 °C, 0.175 mL/dak | MS, [¹³ C ₃] AA, MAA, 1 µL | 10 - 60 µg.kg ⁻¹ , 60– 3000 µg.kg ⁻¹ | Amrein ve ark., 2004 |
| Sinir dokuları homojenatı | Su, basamaklı ekstraksiyon | Cam % 5 FFAP (GasChromQ) 1.80 m x 2.0 mm x 0.2 µm | 145 °C | ECD, -, 2 µL | 9.5 pg, 10 pg, 10 – 100 pg | Poole ve ark., 1981 |

Çizelge 3. (Devam) Gaz kromatografisi kullanılan yöntemlerin teknik özellikleri

| | | | | | | |
|-----------------------------|--|---|---|---|---|------------------------------------|
| Patates ürünleri | Su, sıvı-sıvı ekstraksiyonu | Carbowax 20 M (Fluka) 10 m x 0.25 mm x 0.4 µm | 70 °C > 200 °C | MS, MAA, Butiramid, 1 µL | -, -, | Amrein ve ark., 2003 |
| Gevrekler, patates cipsi | Carrez I ve II, Extrelut 20 NT | FFAP (Quadrex) 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm | 60 °C > 240 °C | [² H ₃] AA, 2 µL, | 4 µg.kg ⁻¹ , -, - | Jezussek ve Schieberle, 2003 |
| Tahıllı gıdalar | Hekzan, Su, Carrez I ve II | DB-WAX (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 70 °C > 230 °C | MS/MS, [² H ₃] AA, 1 µL | -, 30 µg.kg ⁻¹ , - | Hoenicke ve ark., 2004 |
| Patates ürünleri | Katı faz mikro ekstraksiyon, | DB-WAX (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 80 °C > 220 °C 1 mL.dak ⁻¹ , 9.88 dak | MS, -, - | 0.1 µg.L ⁻¹ 0.3 µg.L ⁻¹ 1-1000 µg.L ⁻¹ | Lee ve ark., 2007 |
| Pilav, domates sosu | Metanol, hekzanla temizleme | Supelcowax-10 (Supelco) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 60 °C > 240 °C | MS, -, 1 µL | 25 g.L ⁻¹ 75 g.L ⁻¹ 0.150-1 g.L ⁻¹ | Tateo ve ark., 2007 |
| Çeşitli gıdalar | Su, n-propanol, hekzan, | Innowax (J&W) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 70 °C > 240 °C 1 mL.dak ⁻¹ , | MS, [² H ₃] AA, 1 µL | 15-40 µg.kg ⁻¹ 50 - 1500 µg.kg ⁻¹ | Dunovska ve ark., 2006 |
| Çeşitli gıdalar | Oasis HLB (Waters), 200 mg 6 mL | HP5-MS (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 60 °C > 200 °C 1 mL.dak ⁻¹ , 6.6 dak | MS/MS, ¹³ C ₃ AA, Br, 1 µL | -, -, 0.5-125 µg.kg ⁻¹ | Zhang ve ark., 2006 |
| Çeşitli gıdalar | n-hekzan, NaCl çözeltisi ile ekstraksiyon | HP-INNOWax 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm | 110 °C > 140 °C 140 °C > 240 °C | ECD, ¹³ C ₃ AA, 1 µL | 0.1 - 3 µg.kg ⁻¹ 0.5-125 µg.kg ⁻¹ | Zhang ve ark., 2006 |
| Çeşitli gıdalar | Su, Oasis HLB SPE 200 mg 6 mL (Waters) | GC Glass %5 FFAP (Qudrex), 2 m x 3 mm | 165 °C | ECD, Br, 5 µL | 0.032 µg.L ⁻¹ , - 0 -5 µg.L ⁻¹ | http-2 |

Doğru akım polarografilerine göre daha düşük derişimlerde tayinlerin yapıldığı diferansiyel pulse yöntemlerinde 1 mg.kg⁻¹'dan daha düşük derişimlerde tayinlere olanak sağlanmıştır; bu değer doğru akım türleri için 100-5000 mg.kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda akrilonitril, etil akrilat ve bazı akrilamid türevlerinin analizi etkilediği tespit edilmiştir (MacWilliams ve ark., 1965; Betso ve McLean, 1976; McLean ve ark., 1978).

Bu tekniklerin yanı sıra kapiler elektroforez (Bermudo ve ark., 2006a ve 2006b) ve mikroemülsiyon elektrokinetik kapiler kromatografisi (Bermudo ve ark., 2004) tekniklerinin kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır. Bu çalışmalarda detektör olarak genellikle UV-görünür alan detektörleri kullanılmış ve hassasiyeti artırmak için ön derişirme ve türevlendirme işlemleri uygulanmıştır.

Bu çalışmaların yanı sıra akrilamid oluşumu ve miktar tayini üzerine yapılan analitik çalışmaların incelendiği ve gelecek araştırmalara yönelik önerilerin yer aldığı birkaç derleme de yayınlanmıştır (Wenzl ve ark., 2003; Castle ve Eriksson, 2005; Zhang ve ark., 2005).

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

%99+ ölçüsünde elektroforez saflıktaki akrilamid standart maddesi Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Akrilamid standart maddesine ait analiz sertifikası **EK 1**'de verilmiştir (Aldrich Katalog No: 14,866-0, Lot No: 02113EC-334).

%98 ölçüsünde HPLC saflıktaki metakrilamid standart maddesi Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Metakrilamid standart maddesine ait analiz sertifikası **EK 2**'de verilmiştir (Fluka Katalog No: 64090, Lot No: 1212682).

%98 ölçüsünde titrasyon saflıktaki butiramid standart maddesi Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Butiramid standart maddesine ait analiz sertifikası **EK 3**'de verilmiştir (Fluka Katalog No: 19240, Lot No: 444984/1).

%98 ölçüsünde GC saflıktaki N,N-dimetilakrilamid standart maddesi Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından satın alınmıştır. N,N-dimetilakrilamid standart maddesine ait analiz sertifikası **EK 4**'de verilmiştir (Fluka Katalog No: 38873, Lot No: 402416/1).

Hareketli fazın hazırlanmasında kullanılan ve uzak mor ötesi bölgede kullanıma uygun %99.9 ölçüsünde HPLC saflıktaki E Chromasolv® asetonitril Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından satın alınmıştır (Riedel-de Haen Katalog No: 34888, Lot No: 1262M).

Analizlerde kullanılan bidistile su tamamı cam malzemedden oluşan aparat kullanılarak Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda üretilmiş ve 0.2 µm gözenek çaplı selüloz asetat filtreden süzülerek kullanılmıştır.

Kullanılan Cihazlar

HPLC analizlerinin tamamı Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan LC-20AT model gradient pompa, CBM-20A model iletişim ünitesi, CTO-10ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model foto diyot dizisi detektörü ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Numuneler Rheodyne (ABD) marka 7725i model manuel enjeksiyon portuna bağlı 10 µL hacimli loop vasıtasıyla Hamilton (İsviçre) 22 gauge şırınga ile enjekte edilmiştir. Analizlerde elde edilen veriler Intel Pentium 4 işlemcili bir bilgisayara yüklenmiş olan Shimadzu LabSolutions LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı ile değerlendirilmiştir.

UV-spektrofotometrisi ile yapılan incelemelerde Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan UV-2401PC 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

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 satın alınmıştır. Katı faz ekstraksiyon kartuşuna ait analiz sertifikası **EK 5**'de verilmiştir (Waters Katalog No: WAT094225, Lot No: 066A36115A).

Ayrırma 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. Kolona ait kolon performans raporu **EK 6**'da verilmiştir (GL Sciences Katalog No: 5020-01771, Lot No: 5JI82477).

YÖNTEMLER

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, çözülmüş gazların uzaklaştırılması için 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiş ve devamında 0.2 µm gözenek çaplı steril selüloz asetat filtreden süzülerek kullanılmıştır.

Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Akrilamid standart stok çözeltisi, 14.2 mg standart madde tartılıp 50 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi 3.99×10^{-3} M (0.284 mg.mL⁻¹, 284 ppm) olarak hesaplanmıştır. Bu çözelti deneylerin yürütüldüğü çalışma aralığına bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir.

Metakrilamid standart stok çözeltisi 17.0 mg standart madde tartılıp 50 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi 3.99×10^{-3} M (0.340 mg.mL⁻¹, 340 ppm) olarak hesaplanmıştır. Bu çözelti analizlerde kullanılan sabit derişime bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir.

Akrilamidin Numunelerden Ekstraksiyonu

Analizi yapılacak numunelerden 50 – 200 mg aralığında tartım alınmış ve tartılan numune bir polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 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.

Akrilamid Ekstrelerinin Katı Faz Ekstraksiyonu ile Temizlenmesi

PVDF filtreden süzme işlemi sonrasında toplanan süzöntü katı faz ekstraksiyonu ile temizleme için kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyonu kartuşları, sırasıyla 1 mL metanol ve 1 mL bidistile su geçirilerek 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.

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.

HPLC analizleri için asetonitril: su (2: 98, h/h) bileşiminde hazırlanan hareketli faz kolona 0.5 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 ölçölmüş 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 ve 14.5 ± 0.1 dakikalarda gözlenmiş ve analizler 20. 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.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) tavsiyelerine uygun olarak yapılan validasyon ve sistem uygunluk testleri sonucunda, geliştirilen yöntemin yeterli analitik kalitede veri sağladığı tespit edilmiştir. Üçer kez tekrarlanan analizler sonucu elde edilen veriler pik normalizasyonu değerleri kullanılarak değerlendirilmiş ve incelenen gıdalardaki akrilamid içerikleri hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

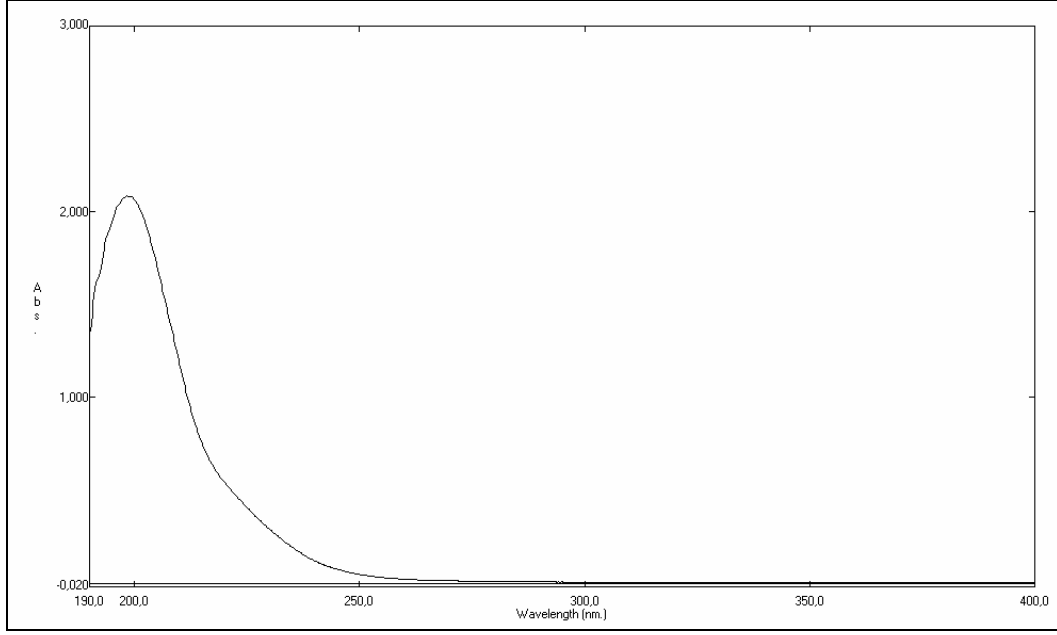
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yüksek ayırma gücünün yanı sıra, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi analitik açıdan son derece önemli özelliklerinden dolayı hemen her çeşit numunenin analizinde kullanılabilen etkili bir ayırma tekniğidir. Miktar tayininin söz konusu olduğu tüm kalite kontrol laboratuvarlarında sıvı kromatografisi sistemleri vazgeçilemez bir yere ve üstünlüğe sahiptir. HPLC kullanımı sonucunda elde edilen sonuçlardaki istatistiksel uyum ve kesinlik, bu yöntemle 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 HPLC için ayrıca bir üstünlüktür. HPLC 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.

HPLC 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 kullanılacak uygun bir analiz yönteminin geliştirilmesi çalışmalarına, evrensel bir yöntem olan UV-spektrofotometri ile akrilamidin UV ve görünür bölgedeki davranışlarının incelenmesi ile başlanmıştır. Akrilamidin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle, çözücü olarak su kullanılarak 1.60×10^{-4} M ($11.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 11.4 ppm) derişiminde akrilamid stok çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltiden bir seri seyreltme yapılarak maddenin UV-görünür bölgedeki absorpsiyonu incelenmiştir. Bu aşamada 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. Ancak yapılan deneylerde 200 nm yakınlarında belirgin absorbans sinyali gözlenmiş ve hazırlanan bir seri kalibrasyon çözeltisinin analizi ile akrilamidin belirtilen dalga boyunda **Eşitlik 1**'e uyan, derişime bağlı doğrusal yanıtlar verdiği tespit edilmiştir. Bu dalga boyunun sonraki aşamalarda geliştirilecek olan HPLC yönteminde de sinyallerin tespitinde kullanılabilmesine karar verilmiştir. Akrilamidin UV bölgedeki spektrumu **Şekil 10**'da ve ölçüm parametreleri **Çizelge 4**'de verilmiştir.

$$A = 12293.71 \times M + 0.007 \quad (r = 0.9999) \quad \text{(Eşitlik 1)}$$

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



**Şekil 10. Akrilamidin 190-400 nm aralığındaki UV-görünür bölgedeki spektrumu
(C = 1.68 x 10⁻⁴ M = 11.4 ppm)**

Çizelge 4. 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 x 10 ⁻⁴ M (11.4 ppm) |
| Dalgaboyu (nm.) | 199.90 |
| Absorbans | 2.088 |

Yürütülen deneylerin tüm aşamalarında, ışığa bağlı olası bir polimerleşmeyi önlemek için standart çözeltiler karanlık ortamda, alüminyum folyo ile kaplı cam kaplarda saklanmış ve günlük olarak hazırlanmıştır.

HPLC 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 HPLC 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 çeşitlemeleri 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.

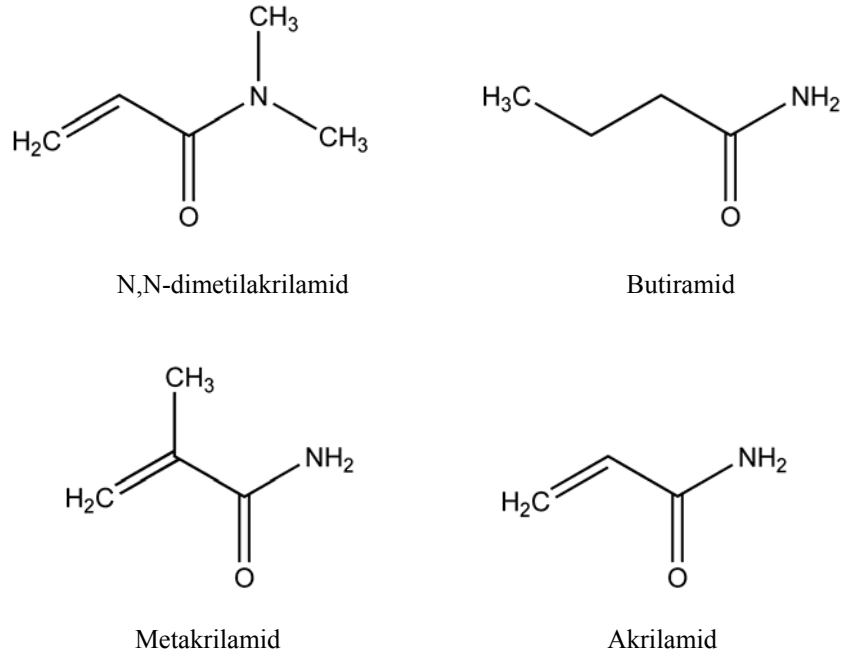
Bir başka değişken olarak kolon dolgu maddelerinin çaplarının analize olası etkileri de değerlendirilmiştir. 3 ve 5 µm partikül çaplı kolonlara yönelik olarak yapılan değerlendirmede düşük partikül çaplı kolonların yüksek geri basınç oluşturmalarına karşılık, aynı uzunluktaki 5 µm çaplı partikül içeren 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 HPLC kolonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara genel kullanıma sahip, görece ucuz HPLC çözücüleri olan metanol, asetonitril ve su bileşimli hareketli fazların denenmesi ile başlanmıştır. 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 değerinde tutunmasını sağladığı görülmüş ve bu hareketli fazın çalışma boyunca kullanılmasına karar verilmiştir.

Kolon ve hareketli faz seçimi esnasında iç standart seçimi için de çalışmalar yürütülmüştür. Bilindiği üzere kromatografyi içine alan tüm yöntemlerde kromatografik parametrelerin iyi ayarlanması ve günden güne sabit tutulması son derece önemlidir. Çünkü maddelerin alıkonulma zamanları ve sinyal büyüklükleri analiz koşullarıyla son derece ilintilidir. Hareketli faz bileşiminin, kolon sıcaklığının, detektör veriminin hatta kolonun fizikokimyasal durumunun daima

en üst seviyede veya aynı değerlerde tutulması her zaman mümkün olamamaktadır. Çünkü, özellikle biyolojik sıvı, ekstre veya benzeri karışık yapılı örnek analizleri söz konusu olduğunda, başta kolonun kimyasal yapısı olmak üzere birçok aletsel bileşen bu örneklerden kötü yönde etkilenmektedir. Aletsel parametrelerde meydana gelebilen değişimlerin yanı sıra, analiz yapandan kaynaklanan değişimlerin de görülebilmesi, kromatografik çalışmalarda iç standart kullanımını gerekli hale getirmektedir. İç standart maddeler kimyasal yapı ve davranış benzerlikleri nedeniyle ortam değişkenlerinden analiz edilen maddeler gibi etkilenen ve analiz edilen numuneye değişmez derişimde katılan maddelerdir. Tayin işlemleri bu maddelerin sinyalleri referans alınarak yapıldığında analiz koşullarına bağlı değişikliklerden kaynaklanan hatalar engellenmekte, sonuçların daha doğru ve kesin elde edilmesi sağlanmaktadır.

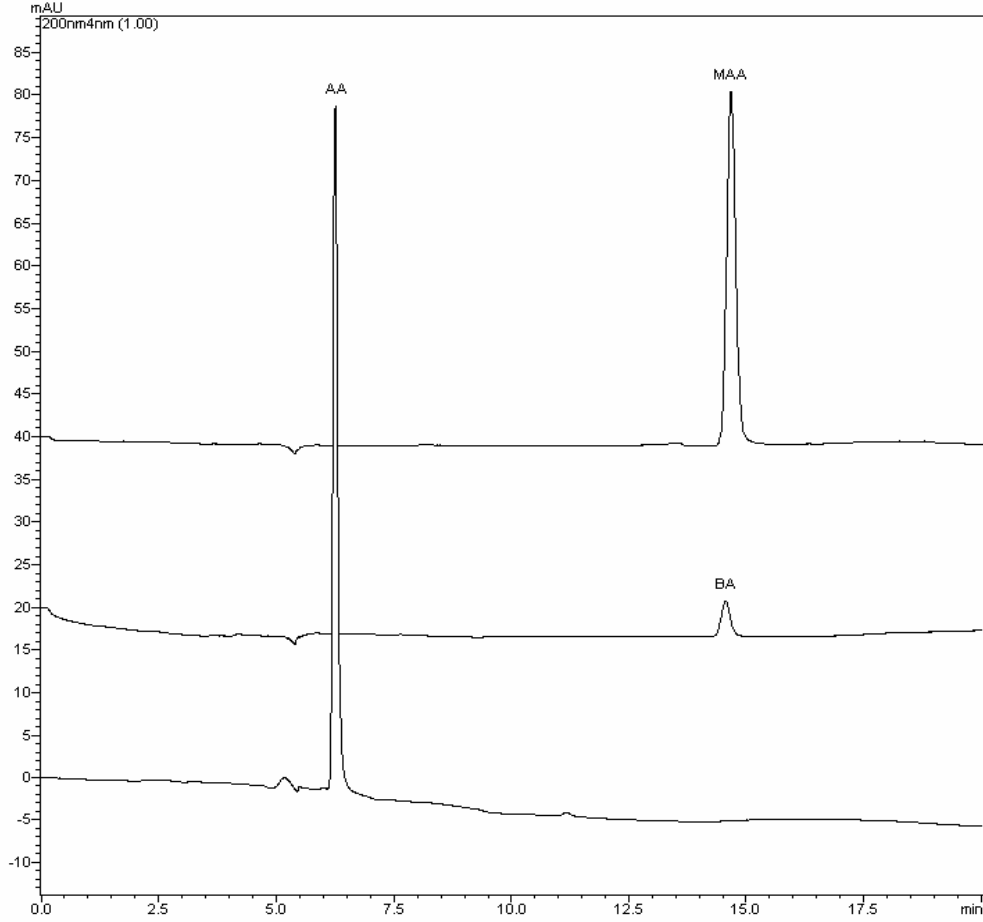
Bu bağlamda, analizlerde iç standart olarak kullanılabilir maddeler araştırılmıştır. Yapısal benzerlik, polarite, çözünürlük ve detekte edilebilirlik gibi başlıca parametreler göz önüne alınarak yürütülen araştırmalarda, gerek kimyasal yapılarındaki benzerlik, gerekse gıdalarda bulunmamalarından dolayı ilk etapta metakrilamid, butiramid ve NN-dimetilakrilamid maddelerinin iç standart olarak kullanılabilir en uygun maddeler olduğuna karar verilmiştir. Maddelerin ve akrilamidin molekül yapıları Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. İç standart olarak kullanılabilir maddelerin ve akrilamidin molekül yapıları

Belirtilen maddelerin seçilen kolon ve hareketli faz şartlarındaki davranışları incelenmiş ve kullanılabilirliği tartışılmıştır. İncelemelerde metakrilamid ve butiramidin 15. dakika civarında kolondan çıktığı, NN-dimetilakrilamidin ise belirtilen koşullarda uzun süre kolondan çıkmadığı tespit edilmiştir. Metakrilamid maddesi, standardının HPLC saflıkta olması ve eşit derişimdeki butiramid

sinyallerine göre daha yüksek sinyal vermesi nedeniyle tercih edilmiş ve alıkonulma zamanı ve sinyal büyüklüğü açısından kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir. Butiramid, metakrilamid ve akrilamide ait kromatogram **Şekil 12**'de verilmiştir.



Şekil 12. Akrilamid ($2.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), butiramid ($1.84 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve metakrilamid ($2.08 \mu\text{g.mL}^{-1}$) çözeltilerinin kromatogramı

Akış hızının akrilamidin tutunmasına ve sinyal büyüklüklerine yaptığı etkinin incelenebilmesi için bir seri deney yürütülmüştür. Çalışmalarda akrilamid (1.20×10^{-7} M, 8.6 ng.mL^{-1} , 8.6 ppb) ve metakrilamid (4.61×10^{-6} M, 392 ng.mL^{-1} , 392 ppb) içeren standart çözelti, daha önce tespit edilen hareketli faz ve kolon şartlarında, akış hızı $0.3 - 0.7 \text{ mL.dak}^{-1}$ aralığında değiştirilerek analiz edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Deneyler sonucunda akış hızı düştükçe akrilamid ve IS'nin 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 **Eşitlik 2** ve **Eşitlik 3**'de verilmiştir:

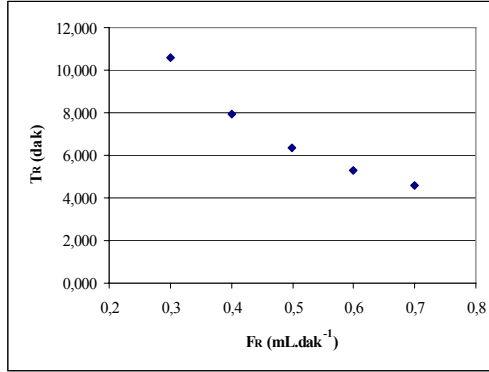
$$T_R = -14.6356 \times F_R + 14.275 \quad (r = -0.9688) \quad \text{(Eşitlik 2)}$$

Burada, T_R : tutunma zamanı; F_R : akış hızı; r: korelasyon katsayısı'dır.

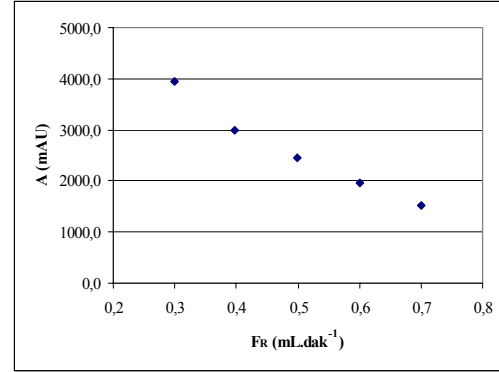
$$A = -5815.25 \times F_R + 8474.855 \quad (r = -0.9848) \quad (\text{Eşitlik 3})$$

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

Olumsuz bir etken olarak, akış hızının artışıyla birlikte kolon basıncının çok yüksek değerlere ulaştığı (yaklaşık 150 bar) tespit edilmiş, dolayısıyla yüksek basıncı ve pik morfolojilerinin bozulmasını engellemek için ortalama bir değer olan 0.5 mL.dak⁻¹ değeri akış hızı olarak seçilmiştir. Akış hızı – tutunma zamanı ve akış hızı – akrilamid sinyali grafikleri sırasıyla **Şekil 13** ve **Şekil 14**'de verilmiştir.



Şekil 13. F_R- T_R grafiği



Şekil 14. 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 **Eşitlik 4** ve **Eşitlik 5**'de verilmiştir:

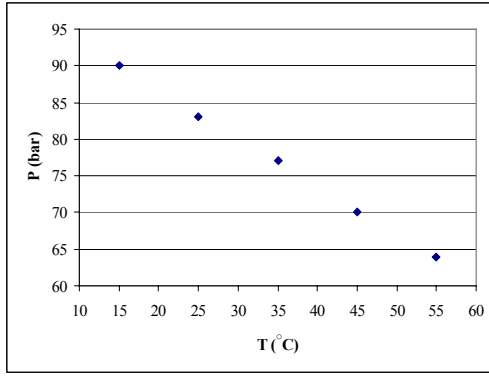
$$P = -0.65 \times T + 99.55 \quad (r = -0.9996) \quad (\text{Eşitlik 4})$$

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

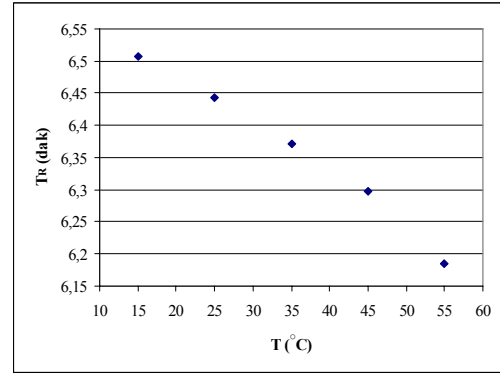
$$T_R = -0.00792 \times T + 6.638 \quad (r = -0.9939) \quad (\text{Eşitlik 5})$$

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

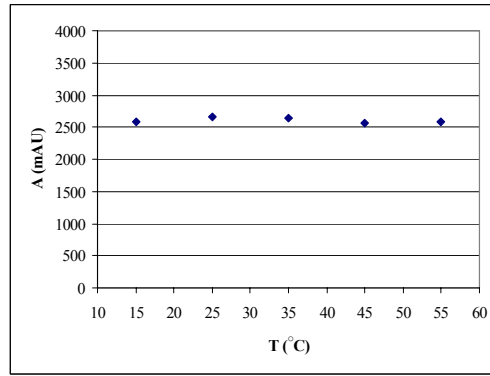
Sıcaklık artışının çözücü viskozitesini azalttığı için basıncı düşürdüğü ve moleküllerin kinetik enerjilerini artırdığı için maddelerin geliş zamanlarını kısalttığı sonucuna varılmıştır. Sıcaklık değişiminin akrilamidin sinyal şiddetine belirgin bir etkisine rastlanmamıştır. Çalışmalarda genel olarak 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, sıcaklık - tutunma zamanı ve sıcaklık – akrilamid sinyali ilişkilerini gösteren grafikler sırasıyla **Şekil 15**, **Şekil 16** ve **Şekil 17**'de verilmiştir.



Şekil 15. T - P grafiği



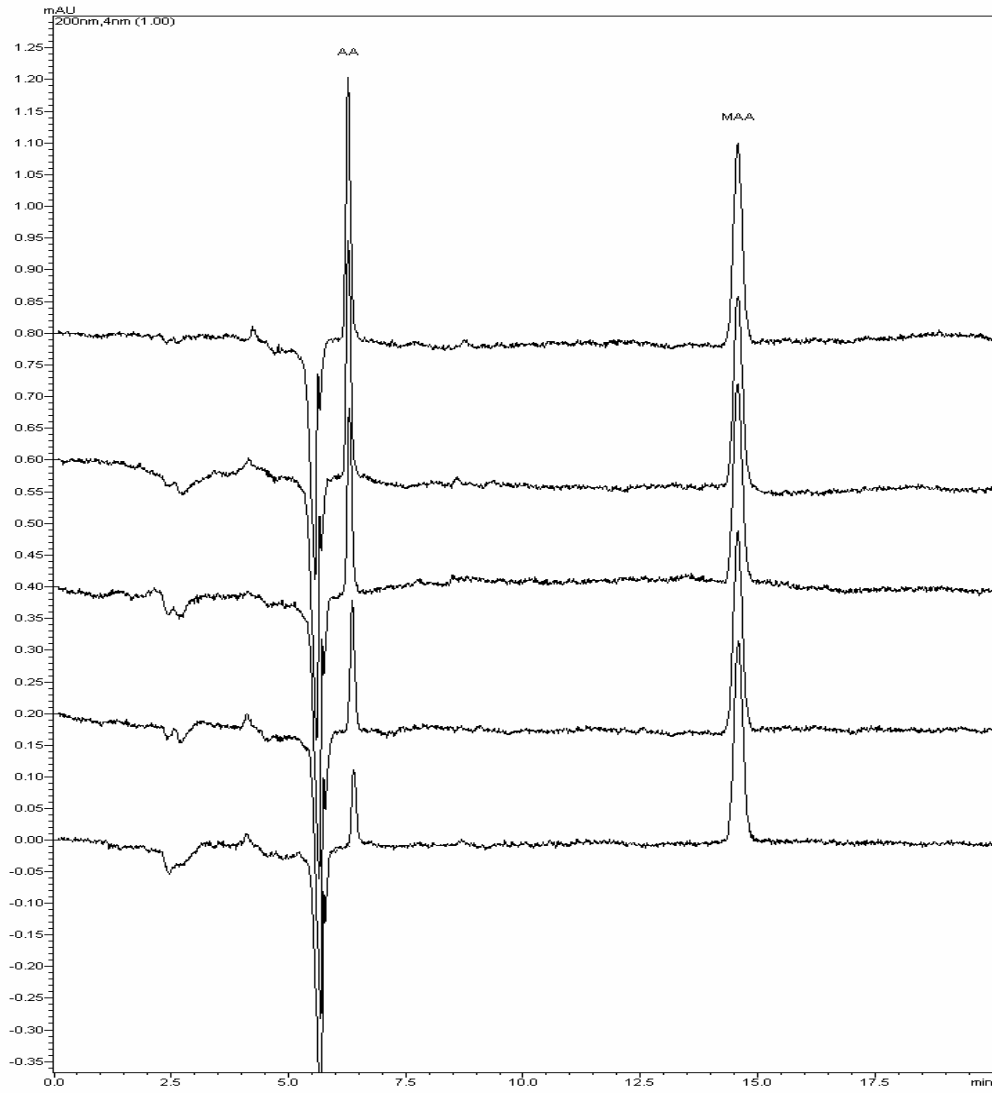
Şekil 16. T - T_R grafiği



Şekil 17. T - A grafiği

Aletsel bir değişken olarak detektörün sinyal toplama frekansının etkisi de incelenmiştir. Sinyal toplama frekansı 40.00 – 0.78 Hz aralığında değiştirilerek gürültü ve pik morfolojileri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Frekansın artışı ile cihaz gürültüsünün arttığı ve pik morfolojilerinin iyileştiği belirlenmiştir. Gürültünün düşük tayin limitlerine inebilmede bir engel oluşturduğu düşünüldüğünden veri toplama frekansı düşük tutulmuş ve 1.56 Hz olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen ön araştırmalar doğrultusunda yürütülen analizlerde, akrilamid ve IS içeren standart çözeltinin analizi yaklaşık 20 dakikada tamamlanmıştır. Geliş zamanlarına göre maddeler sırasıyla, AA için 6.3 ± 0.1 ve IS için 14.5 ± 0.1 dakikada detekte edilmiştir. Standart maddelere ait kromatogram Şekil 18’de görülmektedir.



Şekil 18. Akrilamid (AA, 2.85 – 11.43 ppb) ve metakrilamid (MAA, 392 ppb) içeren çözeltilerin kromatogramı

Şekil 18’de de görüldüğü gibi, analitlerin kolondan çıkışı yaklaşık 15 dakikada tamamlanmıştır. Maddelerin analizin özellikle ilk dakikalarında kolonda kalmaları sayesinde, sinyallerinin örnekten ileri gelen analiz dışı bileşenlerin sinyalleriyle çakışması engellenmiş ve sonuçta yöntemin seçiciliği arttırılmıştır. Bütün olarak ele alındığında, yöntemin gıda ürünlerinin analizine uygun olduğu düşünülmektedir.

Analizler esnasında kaydedilen kromatogramlar analiz cihazının bağlı olduğu bilgisayara yüklü olan veri analiz programı ile değerlendirilmiştir. Akrilamidin ve metakrilamidin (iç standart) detektör yanıtları, pik normalizasyonu (PN) yöntemi kullanılarak birlikte değerlendirilmiştir. PN değeri, sinyal alanının tutunma zamanına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Validasyon çalışmaları, akrilamidin değişen derişimlerine karşı iç standardın sabit bir derişimi kullanılarak, yani analitin PN değeri iç standardın PN değerine oranlanarak yürütülmüştür. PN değerlerinin alan yanıtlarına tercih edilmesi ile alet, ortam veya analizci kaynaklı değişimlerden ileri gelen ve analizi etkileyen faktörlerin etkisi en aza indirilmiştir.

Validasyon çalışmaları öncesinde HPLC sisteminin ve geliştirilen yöntemin yeterli kalitede kabul edilebilir veri sağladığının tespiti için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu testlerde teorik tabaka sayısı, kuyruklanma, asimetri, kapasite, seçicilik ve çözünürlük faktörleri, pik alanlarının ve geliş zamanlarının bağlı standart sapmaları (BSS) hesaplanmıştır. Birleşik Devletler Farmakopesi (USP) ölçütlerine göre yapılan değerlendirmede HPLC yönteminin analiz yapmaya uygun olduğu düşüncesine ulaşılmıştır. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları **Çizelge 5'** de verilmiştir.

Çizelge 5. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları (Sabit faz: GL Sciences Inertsil® C₁₈ (150x4.6 mm., 3 µm); hareketli faz: CH₃CN: H₂O (2: 98), h/h)

| Parametre | Analiz değeri | Tavsiye edilen değer |
|---|---------------|----------------------|
| Tutunma zamanı (dak) | 6.3 ± 0.1 | N/A |
| Kapasite faktörü (<i>k'</i>) | 11.9 | > 2 |
| Asimetri faktörü (<i>A_s</i>) | 1.1 | 0.95 < x < 1.2 |
| Kuyruklanma faktörü (<i>T</i>) | 1.1 | < 2 |
| Seçicilik faktörü (<i>α</i>) | 8.4 | > 1 |
| Çözünürlük faktörü (<i>R_s</i>) | 26.9 | > 2 |
| Teorik tabaka sayısı (<i>N</i>) | 18496 | > 2000 |
| Tutunma zamanının %BSS | 0.06 | < 1 |
| Pik alanının %BSS | 1.37 | < 1.5 |

Geliştirilen yöntem, analitik yöntemlerin validasyonu üzerine Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen öneriler doğrultusunda valide edilmiştir. Bu kılavuz doğruluk, kesinlik, doğrusallık, aralık, tayin alt sınırı, saptama sınırı, seçicilik, sağlamlık ve sistem uygunluk testlerinin yapılmasını önermektedir.

Yöntemin doğruluğunu ve karmaşık numunelere uygulanabilirliğini belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemine dayalı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Analit dışı bileşenlerin yöntem ile yaptığı etkileşim, bilinen derişimde akrilamid - metakrilamid karışımının, önceden analiz edilmiş numunelere katılması ve analiz edilmesi yoluyla tespit edilmiştir. Geri kazanım verileri 3 farklı numuneye (kahve, bisküvi ve patates cipsi) katılan 3 farklı derişimdeki çözeltinin 3'er kez analiz edilmesi ile elde edilmiştir. Tekrarlanan deneyler sonucunda elde edilen veriler, doğrusallık çalışmaları sonucunda elde edilen kalibrasyon denklemini kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre numune bileşenleri analize konu olan maddelerin tayinine olumsuz etkide bulunmamaktadır. Yöntemin doğruluğuna ilişkin deneysel veriler **Çizelge 6'** da sunulmuştur.

Çizelge 6. Yöntemin doğruluğuna ilişkin yürütülen çalışmaların sonuçları (n=3)

| Numune | Derişim Yüzdesi | Eklenen AA (ng.mL ⁻¹) | Bulunan AA (ng.mL ⁻¹) | Geri Kazanım Yüzdesi |
|---|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Kahve | 50 | 2.85 | 2.79 | 98 |
| | 100 | 8.55 | 8.30 | 97 |
| | 150 | 14.26 | 14.11 | 99 |
| | 50 | 2.85 | 2.74 | 96 |
| | 100 | 8.55 | 8.38 | 98 |
| | 150 | 14.26 | 13.83 | 97 |
| | 50 | 2.85 | 2.68 | 94 |
| | 100 | 8.55 | 8.13 | 95 |
| | 150 | 14.26 | 13.26 | 93 |
| Kahve numunesi ortalama geri kazanımı | | | | 96 |
| Bisküvi | 50 | 2.85 | 2.79 | 98 |
| | 100 | 8.55 | 8.13 | 95 |
| | 150 | 14.26 | 13.97 | 98 |
| | 50 | 2.85 | 2.77 | 97 |
| | 100 | 8.55 | 8.21 | 96 |
| | 150 | 14.26 | 13.54 | 95 |
| | 50 | 2.85 | 2.71 | 95 |
| | 100 | 8.55 | 8.30 | 97 |
| | 150 | 14.26 | 13.54 | 95 |
| Bisküvi numunesi ortalama geri kazanımı | | | | 96 |

Çizelge 6. (Devam) Yöntemin doğruluğuna ilişkin yürütülen çalışmaların sonuçları (n=3)

| | | | | |
|---|-----|-------|-------|------|
| Patates cipsi | 50 | 2.85 | 2.79 | 98 |
| | 100 | 8.55 | 8.04 | 94 |
| | 150 | 14.26 | 13.54 | 95 |
| | 50 | 2.85 | 2.79 | 98 |
| | 100 | 8.55 | 8.47 | 99 |
| | 150 | 14.26 | 13.97 | 98 |
| | 50 | 2.85 | 2.71 | 95 |
| | 100 | 8.55 | 8.21 | 96 |
| | 150 | 14.26 | 13.83 | 97 |
| Patates cipsi numunesi ortalama geri kazanımı | | | | 97 |
| Ortalama geri kazanım | | | | 96 |
| Standart sapma | | | | 1.65 |
| % Bağıl standart sapma | | | | 1.71 |
| Güven aralığı ($\alpha=0.05$ anlamlılık düzeyinde) | | | | 0.62 |

Yöntemin kesinliği tekrar edilebilirlik çalışmalarıyla saptanmıştır. Bu amaçla, yöntemin doğrusallığının tespitinde kullanılan 8.55 ng.mL^{-1} derişimdeki akrilamid çözeltisi aynı gün içinde ve ardışık 3 gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Sonuçlara ait standart sapma, bağıl standart sapma ve güven aralığı değişkenlerinin istatistiksel olarak değerlendirildiği incelemede geliştirilen yöntemin kesinlik bakımından yeterli analitik hassasiyete (%BSS <2.0) sahip olduğu tespit edilmiştir. Kesinlik sonuçları **Çizelge 7**'de verilmiştir.

Çizelge 7. Kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

| | 1. Gün (n=8) | 2. Gün (n=8) | 3. Gün (n=8) | Günler arası (n=24) |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| Ortalama | 0.079 | 0.080 | 0.080 | 0.080 |
| SS | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| % BSS | 1.18 | 1.26 | 1.69 | 1.38 |
| GA $\alpha=0.05$ | 0.0006 | 0.0007 | 0.0009 | 0.0004 |

SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma; GA: Güven aralığı

Yöntemin doğrusallığını test etmek için $4.01 \times 10^{-8} \text{ M} - 2.01 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($2.85 - 11.43 \text{ ng.mL}^{-1}$) aralığında akrilamid ve metakrilamid standartlarını içeren seri

çözeltiler hazırlanmış ve belirtilen analiz koşullarında analiz edilmiştir. Doğrusallığın gün içi ve günler arası uygulamalardaki değişimini tespit edebilmek için deneyler 3 güne yayılarak yürütülmüştür. Toplanan veriler en küçük kareler metoduyla değerlendirilmiş, buna göre eğim, kesim ve bu değerlerinin standart sapmaları ile korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının 0.9998 bulunduğu deneylerde yöntemin belirtilen aralıkta doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert-Beer yasasına uyduğu sonucuna varılmıştır. Yöntemin gün içi ve günler arası doğrusallığına ilişkin istatistiksel veriler **Çizelge 8**'de sunulmuştur.

Çizelge 8. Gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | 1. Gün (n=5) | 2. Gün (n=5) | 3. Gün (n=5) | Günler arası (n=15) |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Aralık (ng.mL ⁻¹) | 2.85 – 11.43 | | | |
| Eğim | 8.44 x 10 ⁻³ | 8.54 x 10 ⁻³ | 8.62 x 10 ⁻³ | 8.53 x 10 ⁻³ |
| Kesim | 7.77 x 10 ⁻³ | 7.63 x 10 ⁻³ | 6.66 x 10 ⁻³ | 7.35 x 10 ⁻³ |
| Σx ² | 8.13 x 10 ¹ | 8.13 x 10 ¹ | 8.13 x 10 ¹ | 2.44 x 10 ² |
| Σy ² | 5.79 x 10 ⁻³ | 5.93 x 10 ⁻³ | 6.04 x 10 ⁻³ | 1.78 x 10 ⁻² |
| Σxy | 6.86 x 10 ⁻¹ | 6.94 x 10 ⁻¹ | 7.01 x 10 ⁻¹ | 2.08 x 10 ¹ |
| Kesim SS | 8.54 x 10 ⁻⁴ | 1.43 x 10 ⁻³ | 5.64 x 10 ⁻⁴ | 2.41 x 10 ⁻³ |
| Eğim SS | 9.47 x 10 ⁻⁵ | 1.59 x 10 ⁻⁴ | 6.28 x 10 ⁻⁵ | 1.54 x 10 ⁻⁴ |
| r | 0.9999 | 0.9998 | 0.9999 | 0.9998 |
| GA _{α=0.05} | ± 9.02 x 10 ⁻⁵ | ± 1.51 x 10 ⁻⁴ | ± 5.96 x 10 ⁻⁵ | ± 8.48 x 10 ⁻⁵ |

Σx²: x kareler toplamı; Σy²: y kareler toplamı; Σxy: x ve y değerleri çarpımı toplamı; SS: Standart sapma; r: Korelasyon katsayısı; GA_{α=0.05}: Güven aralığı (0.05 anlamlılık düzeyinde)

Yöntemin çalışma aralığının belirlenmesinde, analizlerde elde edilebilecek akrilamid sinyallerin büyüklükleri ve bunlara karşılık gelen derişimler göz önüne alınmıştır. Yapılan analizlerde kromatografik sisteme enjekte edilen numunelerdeki akrilamid derişimlerinin çalışma aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), kalibrasyon eşitliğinin eğimi ve kesim değerinin standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır. Kesimin standart sapmasının eğime oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri saptama sınırı için 3.3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır. Hesaplama kullanılan istatistiksel veriler doğrusallığın günler arası çalışmalarından elde edilmiştir. Bu yolla hesaplanan LOD ve LOQ değerleri **Çizelge 9**'da verilmiştir.

Çizelge 9. Yöntemin saptama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri

| | 1. set (n=8) | 2. set (n=8) | 3. set (n=8) | Ortalama (n=24) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Aralık (ng.mL⁻¹) | 2.85 – 14.26 | | | |
| Kesim SS | 8.54 x 10 ⁻⁴ | 1.43 x 10 ⁻⁴ | 5.64 x 10 ⁻⁴ | 2.41 x 10 ⁻³ |
| Eğim | 8.44 x 10 ⁻³ | 8.54 x 10 ⁻³ | 8.62 x 10 ⁻³ | 8.53 x 10 ⁻³ |
| LOD (ng.mL⁻¹) | 0.34 | 0.55 | 0.22 | 0.93 |
| LOQ (ng.mL⁻¹) | 1.01 | 1.67 | 0.65 | 2.82 |

LOD: Limit of detection (Saptama sınırı); LOQ: Limit of quantitation (Tayin alt sınırı)

Kromatografik yöntemlerin en önemli parametrelerinden olan ve analizi yapılan maddenin, numunedeki girişim yapabilecek diğer maddelerin varlığında dahi tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini göstermesi anlamına gelen seçiciliğin belirlenmesi için numune analizlerinde elde edilen kromatogramlar analitik olarak değerlendirilmiştir. Seçiciliğin belirlenmesinde ayırım faktörünün 1.0'den büyük olması referans alınmış, akrilamid ve IS için ayırım faktörleri hesaplanmıştır. Numunelerin genelinde ayırım faktörünün hedeflenen değerin üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu sonuç ile yöntemin yeterli seçiciliğe sahip olduğu kabul edilmiştir.

Yöntemin sağlamlığının test edilmesi için mobil fazın organik çözücü içeriği, akış hızı, dalga boyu, kolon sıcaklığı ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) kartuşunun şartlandırma basamakları üzerinde küçük değişiklikler yapılarak akrilamid ve IS sinyalleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bunlara ek olarak akrilamid ve metakrilamidin analizlerde kullanılan polipropilen ve cam bazlı yardımcı malzemelerin temas yüzeylerine adsorpsiyonu üzerine de birtakım incelemeler yapılmıştır. Sonuçta bu değişikliklerin akrilamid analizlerine anlamlı etkilerde bulunmadığı tespit edilmiştir.

Miktar tayininin temel basamaklarından biri olarak akrilamidin gıda maddelerinden ekstraksiyonu için sıvı-sıvı, Soxhlet ve katı faz ekstraksiyonu yöntemlerinin kullanılabilirliği incelenmiştir. Yapılan ön incelemelerde, ekstraksiyon için tercih edilecek yöntemin akrilamidin yanı sıra gıdaların içinde bulunabilecek başka maddeleri de çekebileceği, bu olumsuz durumun olabildiğince engellenmesi gerektiği üzerinde durulmuştur. Diğer gıda bileşenlerine ait sinyallerin analizler esnasında akrilamid veya IS pikleri ile girişim yapması veya yüksek polariteli hareketli faz nedeniyle yeterince sürüklenmemesi sonucu kolonda birikerek analiz şartlarını bozması, yüksek olasılıklı bir ihtimal olarak değerlendirilmiştir. Bu noktada özellikle apolarlığı yüksek (yağda çözünen) maddelerin ekstre edilmemesinin kolon sağlığı açısından bir gereklilik olduğu sonucuna varılmıştır. Akrilamidin çözünürlük özellikleri incelendiğinde en fazla suda ve metanolde çözüldüğü görülmüştür. Ters faz kromatografilerde kolonda tutunabilecek birçok apolar maddenin metanolde çözüldüğü ve akrilamidin sudaki çözünürlüğünün en yüksek oranda gerçekleştiği

göz önüne alınarak, ekstraksiyon çözücüsü olarak suyun tercih edilmesinin yararlı olacağına karar verilmiştir.

Ekstraksiyon için yöntem geliştirme çalışmalarına numunelerde bulunan akrilamidin tamamını çekebilecek çözücü cinsi, hacmi ve uygulama yolunun belirlenmesi ile başlanmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde akrilamidin sudaki çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı gıda maddelerinde bulunabilecek ortalama akrilamid miktarının suda tamamen çözüneceği fikrine ulaşılmıştır. Birçok kaynakta 2 – 3 g numunenin içerdiği akrilamidin 100 mL çözücü ile yüksek verimle çekilebileceği belirtilmektedir (Wenzl ve ark., 2003; Castle ve Eriksson, 2005; Zhang ve ark., 2005). Bu bilgi ışığında çözücü sarfiyatının ve gerekli numune miktarının düşük tutulabilmesi için 50 – 200 mg numuneye karşılık çözücü olarak 10 mL su kullanılmasına karar verilmiştir.

Numunenin çözücü ile muamele edilme süresinin ekstraksiyon verimine etkisinin incelendiği deneylerde verimin, 90 saniyelik uygulama süresine kadar artış gösterdiği, bu süreden sonra zamandan bağımsız olarak doğrusal bir grafik sergilediği görülmüştür. Bu saptamalar doğrultusunda ekstraksiyon süresi olarak 2 dakikanın yeterli olacağı sonucuna varılmıştır. Cam veya polipropilen malzemenin analizlere etki etmediği bulgusundan yola çıkılarak yapılan uygulamada, uygun şekilde parçacık boyutu düşürülen numuneler tartıldıktan sonra bir polipropilen santrifüj tüpüne alınmış, üzerine 10 mL distile su eklenmiş, 30 saniye karıştırıldıktan sonra 90 saniye makine ile 2500 rpm devirde çalkalanmıştır. Uygulanan ekstraksiyon yönteminin hem kimyasal hem de fiziksel etkileri olması nedeniyle, çözünmeyen partiküllerin çöktürülmesi için bu şekilde hazırlanan karışım yüksek devirde (5600 rpm = 3000 x g) santrifüj edilmiş ve üstteki berrak kısımdan 2-3 mL alınarak sonraki işlem basamaklarına geçilmiştir.

Çalkalama sırasında fiziksel veya kimyasal etkilerle ekstreye geçmiş olan apolar özellikli bileşenlerin ekstreden temizlenmesi için uygulama kolaylığına sahip ve etkili bir yöntem olması nedeniyle katı faz ekstraksiyonunun (SPE) kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaca yönelik olarak kullanılacak SPE kartuşu tiplerinin belirlenebilmesi için yapılan literatür incelemelerinde numune, ekstraksiyon tipi ve ekstraksiyon koşullarına göre birçok SPE kartuşunun kullanıldığı görülmüştür. Kullanılan çözücünün su olması ve akrilamidin polar özellikli bir madde olması nedeniyle ters faz prensibine göre çalışan Oasis HLB SPE kartuşunun (Waters) kullanılmasına karar verilmiştir.

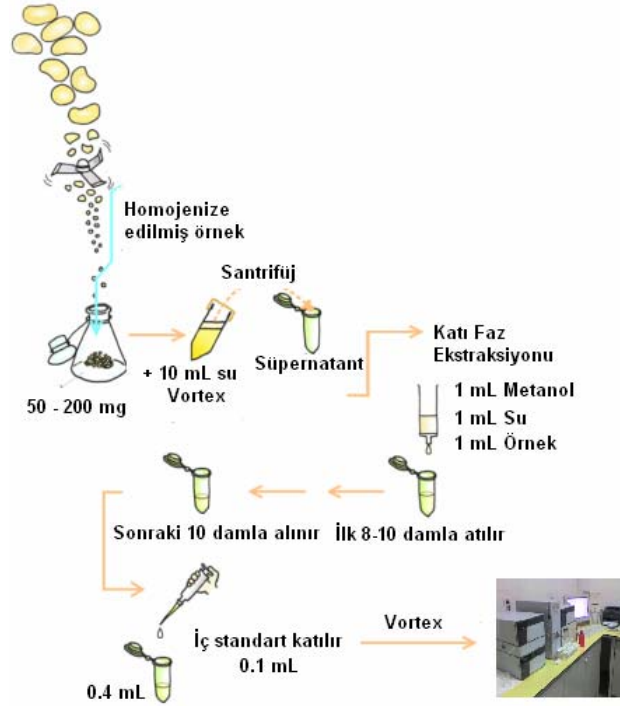
Ekstraksiyon kartuşunun şartlandırılması üzerine yapılan çalışmalarda, üretici firmanın tavsiye ettiği şartlandırma basamakları olan ve kartuştan sırasıyla 1 mL metanol, 1mL su ve 1 mL numune geçirilmesini tavsiye eden yöntem referans alınarak metanol, su ve numune hacimlerindeki değişimin temizleme işlemine etkileri araştırılmıştır. Yapılan testlerde başlangıç basamağında geçirilen metanol ve su miktarının artırılmasının yöntemde bir katkısı görülmemekle birlikte azaltılması durumunda numune kromatogramlarında yabancı madde sinyallerinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca geçirilen numune miktarının artırılmasının da kirliliklerin artışına yol açtığı belirlenmiştir. Bunun üzerine üretici firma tarafından tavsiye edilen şartlandırma basamaklarına bağlı kalınmasına karar verilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen temizleme işlemi için santrifüj sonrasında alınan ekstrenin 1 mL'si SPE kartuşundan geçirilmiştir. Numunenin ekstraksiyon

kartuşunda geçirilmesi sırasında kartuştan çıkan ilk 10 -12 damla kartuşta şartlandırma işleminden kalmış olabilecek su ile seyrelmemesi için atılmış, sonraki 10 damla (yaklaşık 0.5 mL) alınarak bir polipropilen vialde biriktirilmiştir.

Literatür çalışmalarında aminoasit ve proteinleri uzaklaştırmak için Carrez I ve II çözeltilerinin kullanıldığı belirtilmektedir (Delatour ve ark., 2004; Hoenicke ve ark., 2004; Gokmen ve ark., 2005). Bu uygulama yararlı sonuçlar doğursa da genel olarak bakıldığında uygulama basamaklarının artması nedeniyle akrilamid geri kazanımını düşüreceği ve madde kaybına yol açacağı açıktır. Geliştirilen yöntemde bu nedenle ek bir çöktürme işlemi uygulanmamıştır.

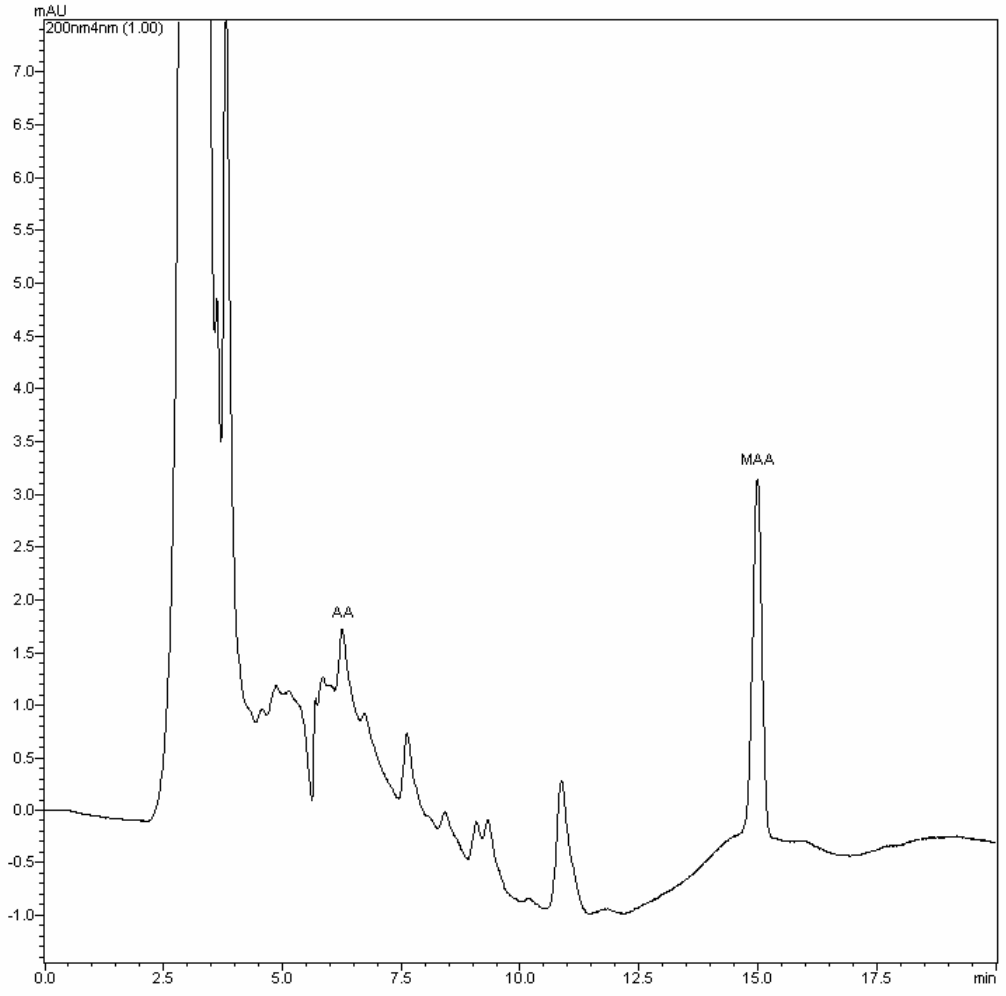
Yukarıda belirtilen temizleme işleminden sonra elde edilen numuneye iç standart katılmış ve analiz edilmiştir. Bunun için temizlenmiş olan numunenin 0.4 mL'si alınmış, üzerine 0.1 mL metakrilamid çözeltisi katılmış ve kromatografik sisteme enjekte edilmiştir.

Uygulanan ekstraksiyon ve temizleme yöntemi **Şekil 19**'da gösterilmiştir.

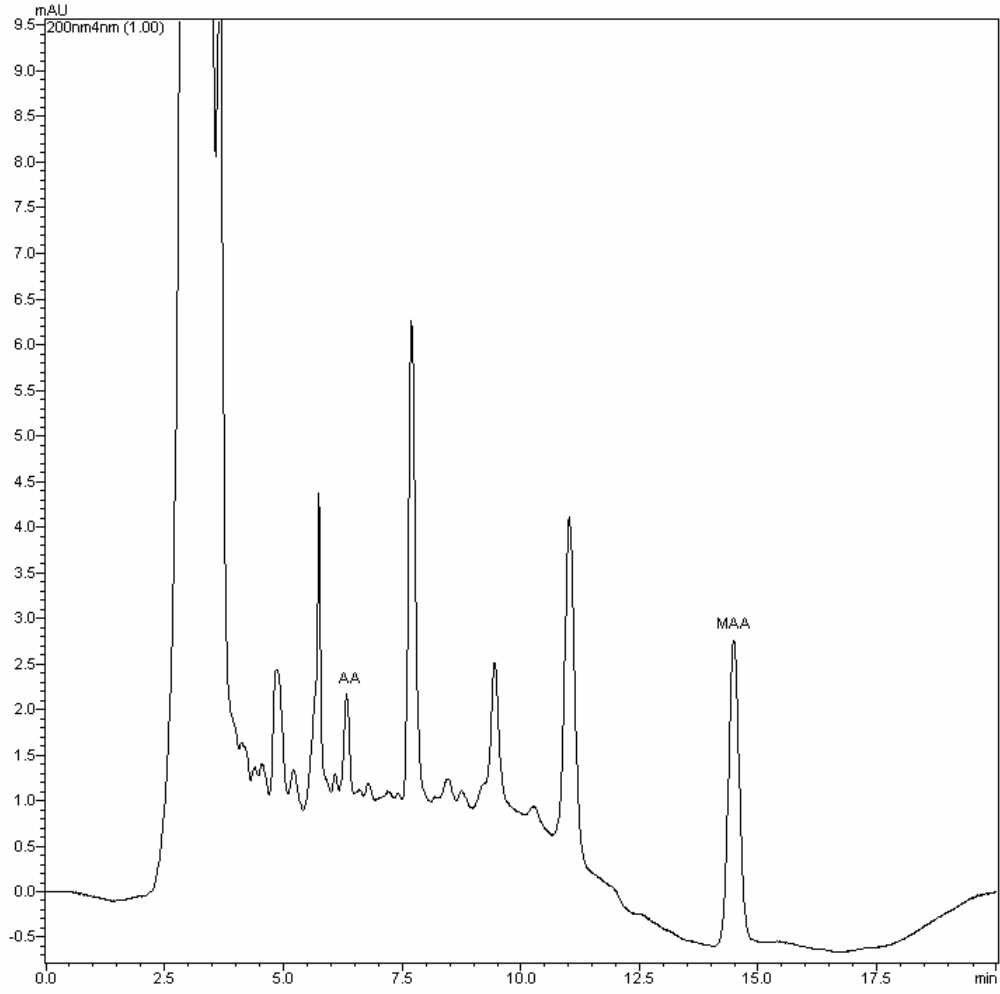


Şekil 19. Uygulanan ekstraksiyon ve temizleme yöntemi

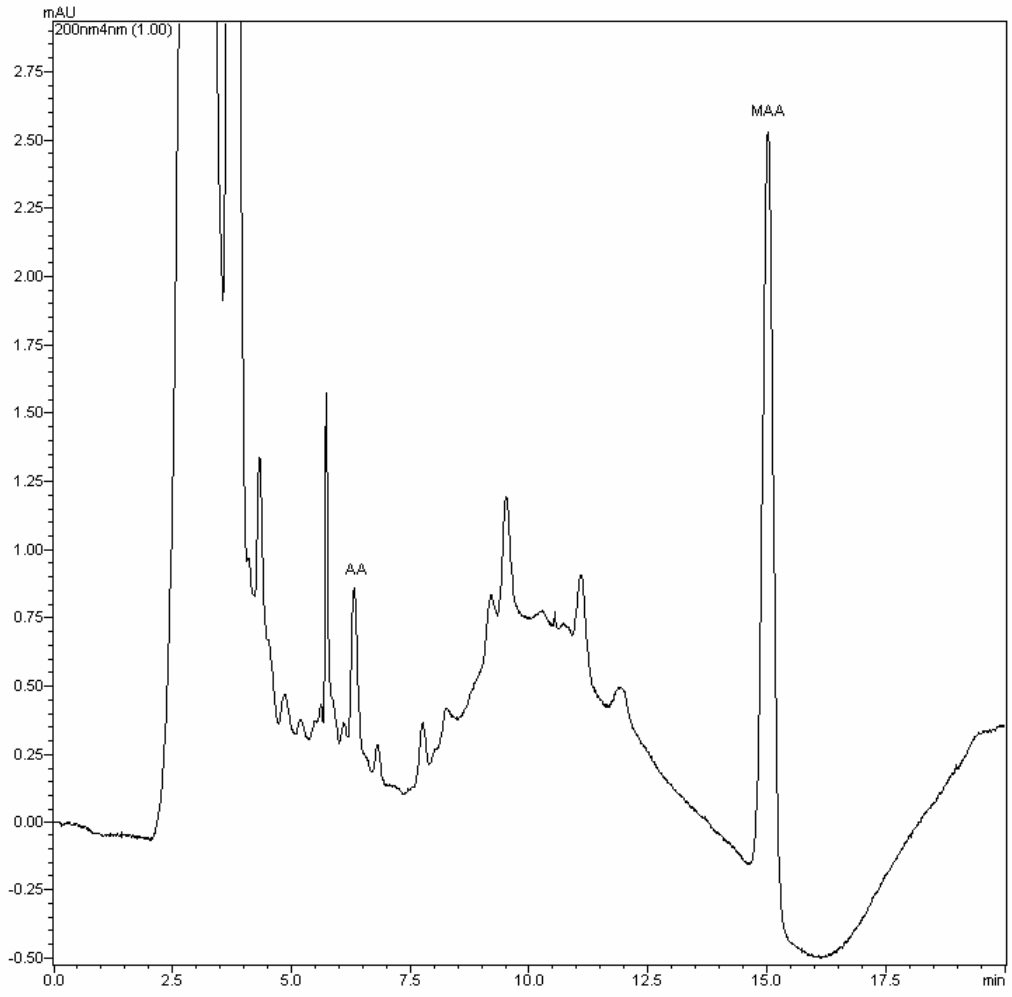
Çalışmanın olabildiğince geniş bir yelpazede gerçekleştirilebilmesi için birçok farklı gıda maddesi piyasadan toplanmış ve analiz edilmiştir. Çalışmada çeşitli kaynaklardan sağlanan 80 farklı numunenin analizi, belirlenen koşullarda gerçekleştirilmiş, analizler sonucu elde edilen kromatogramlardan bazıları **Şekil 20 - Şekil 30**'da verilmiştir.



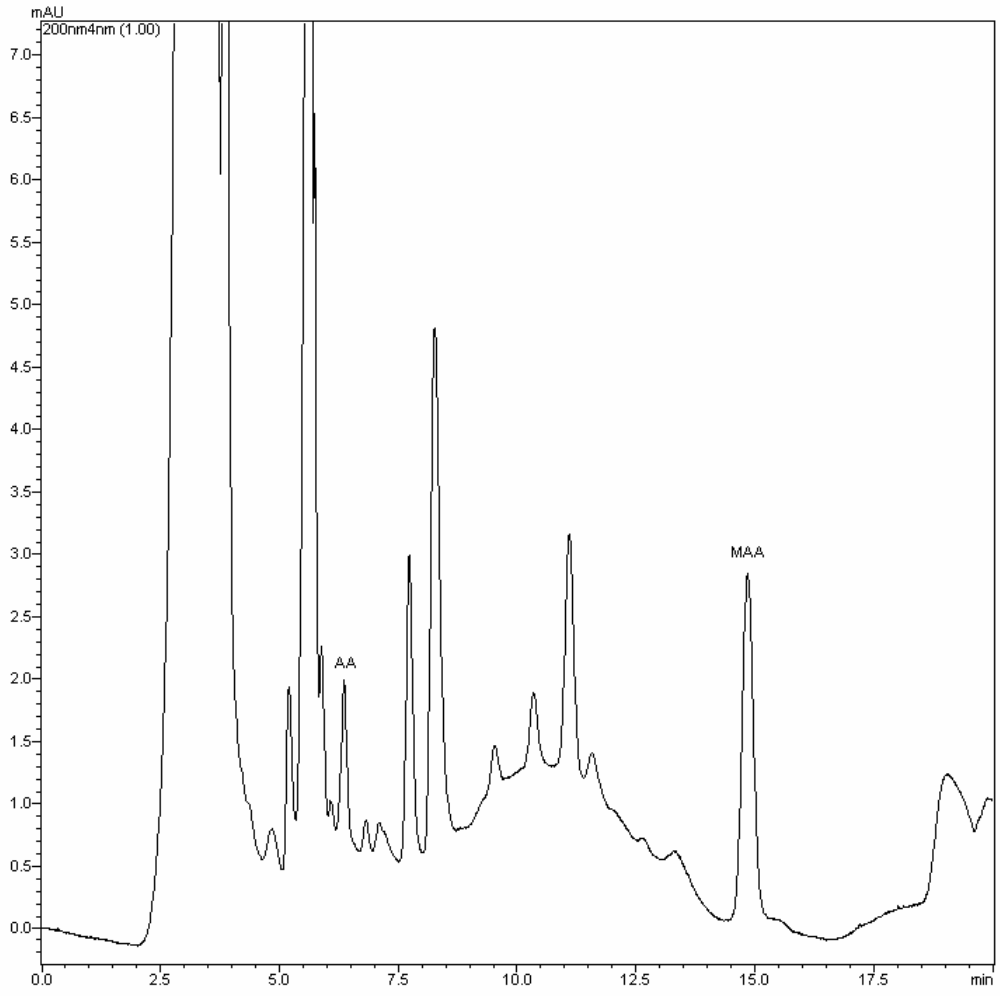
Şekil 20. Baklava numunesinden elde edilen kromatogram



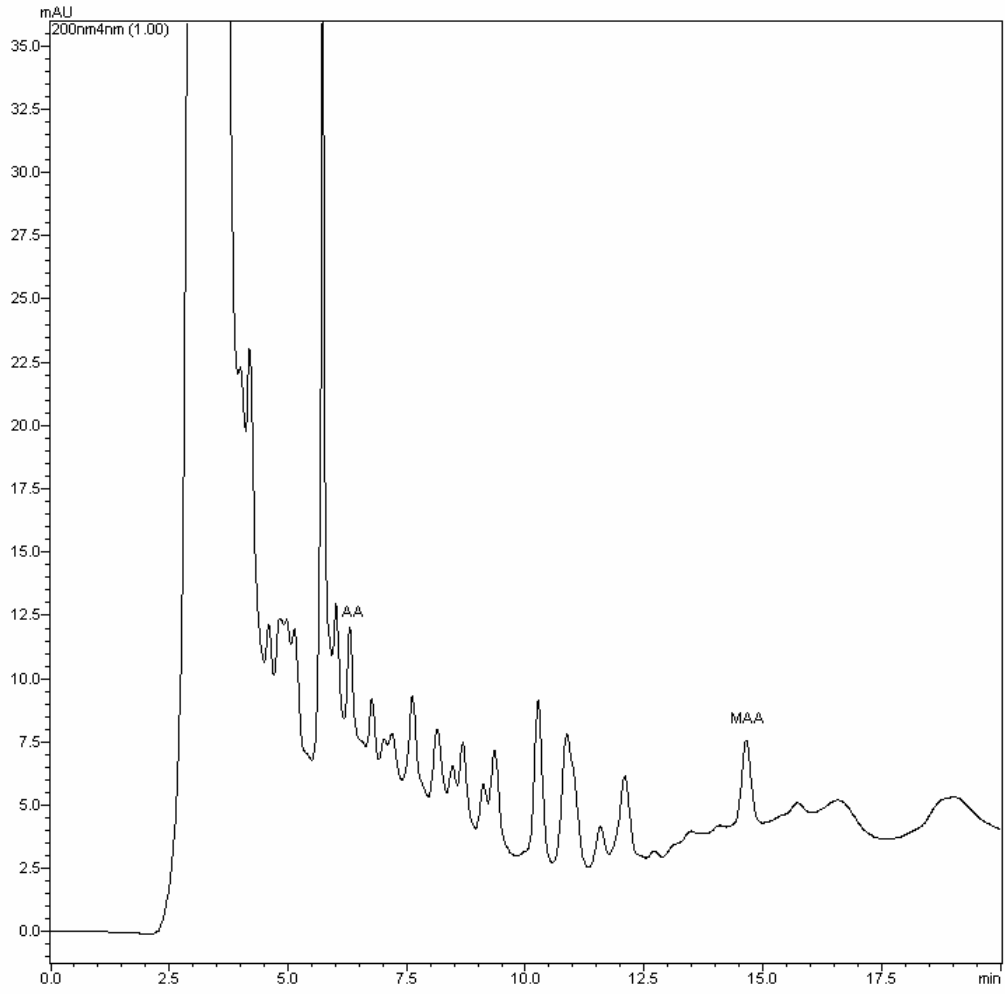
Şekil 21. Ekmek kabuğu numunesinden elde edilen kromatogram



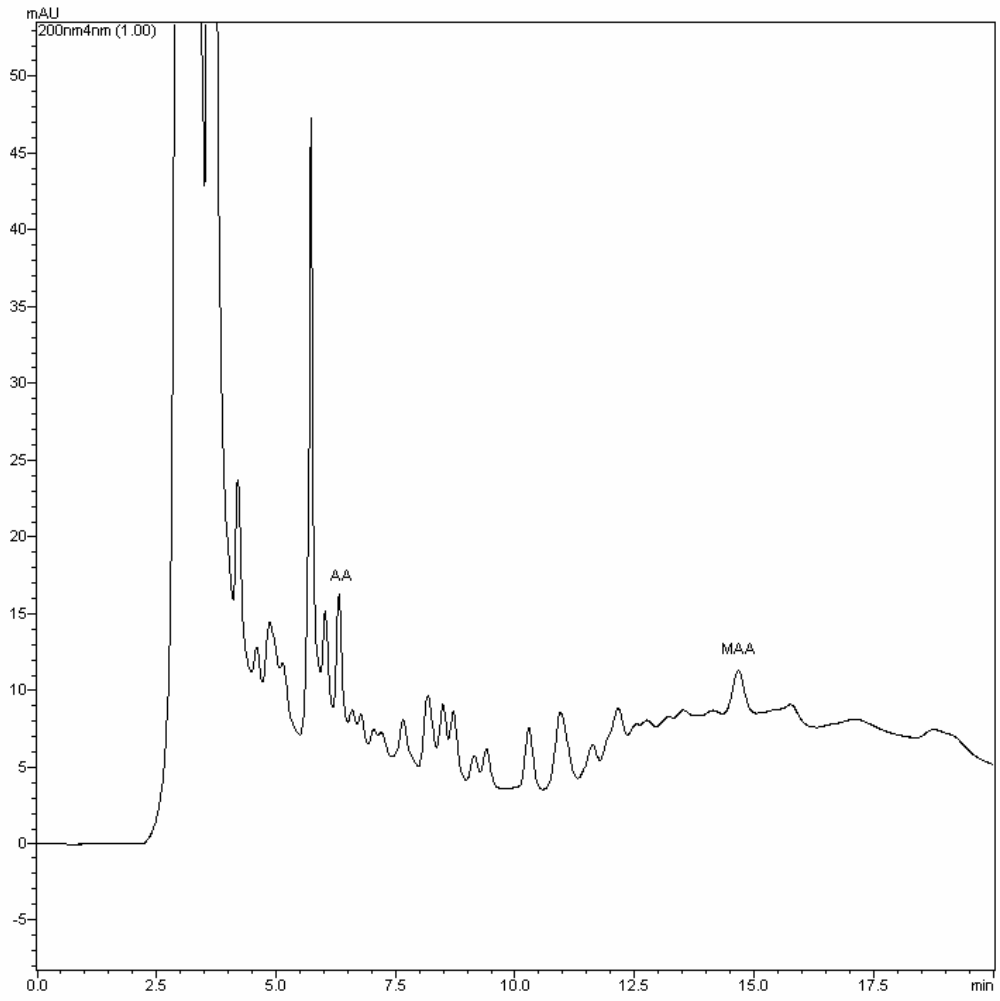
Şekil 22. ECB bebe bisküvisi numunesinden elde edilen kromatogram



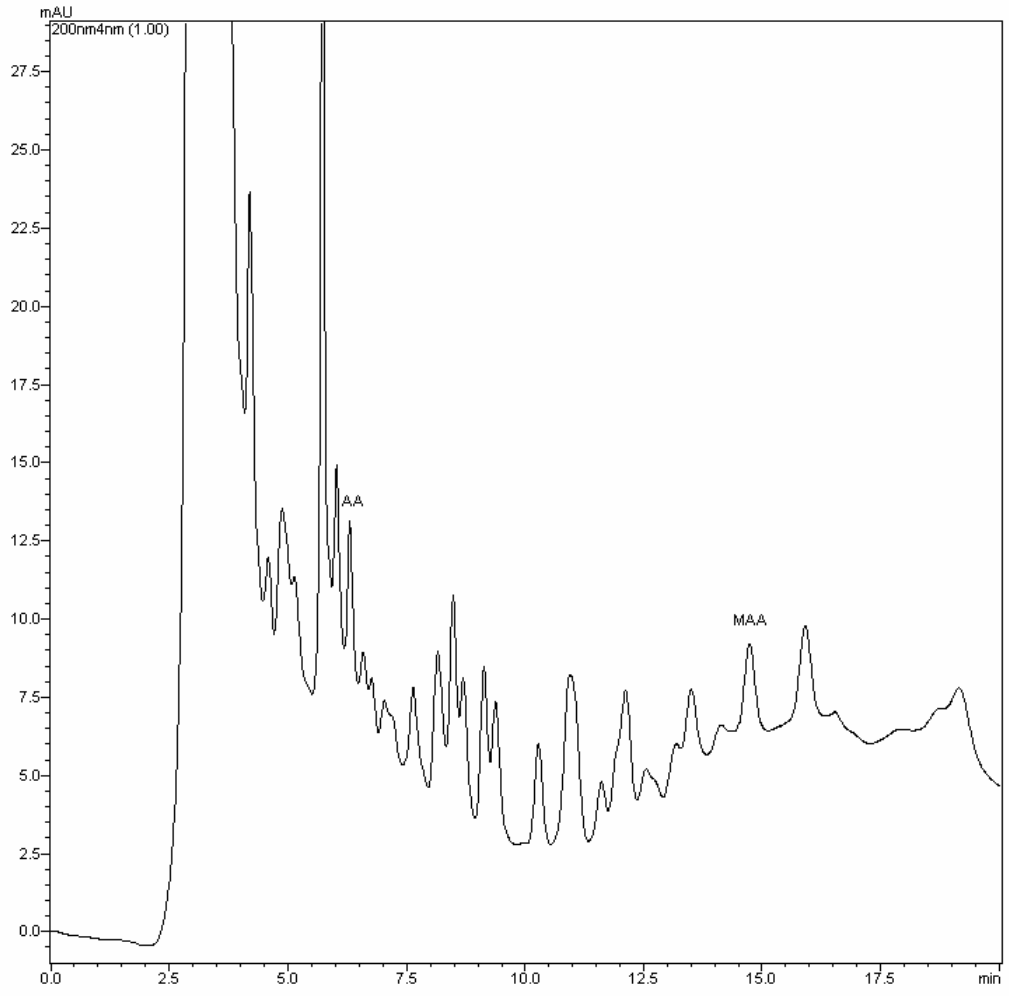
Şekil 23. M sütlü çikolata numunesinden elde edilen kromatogram



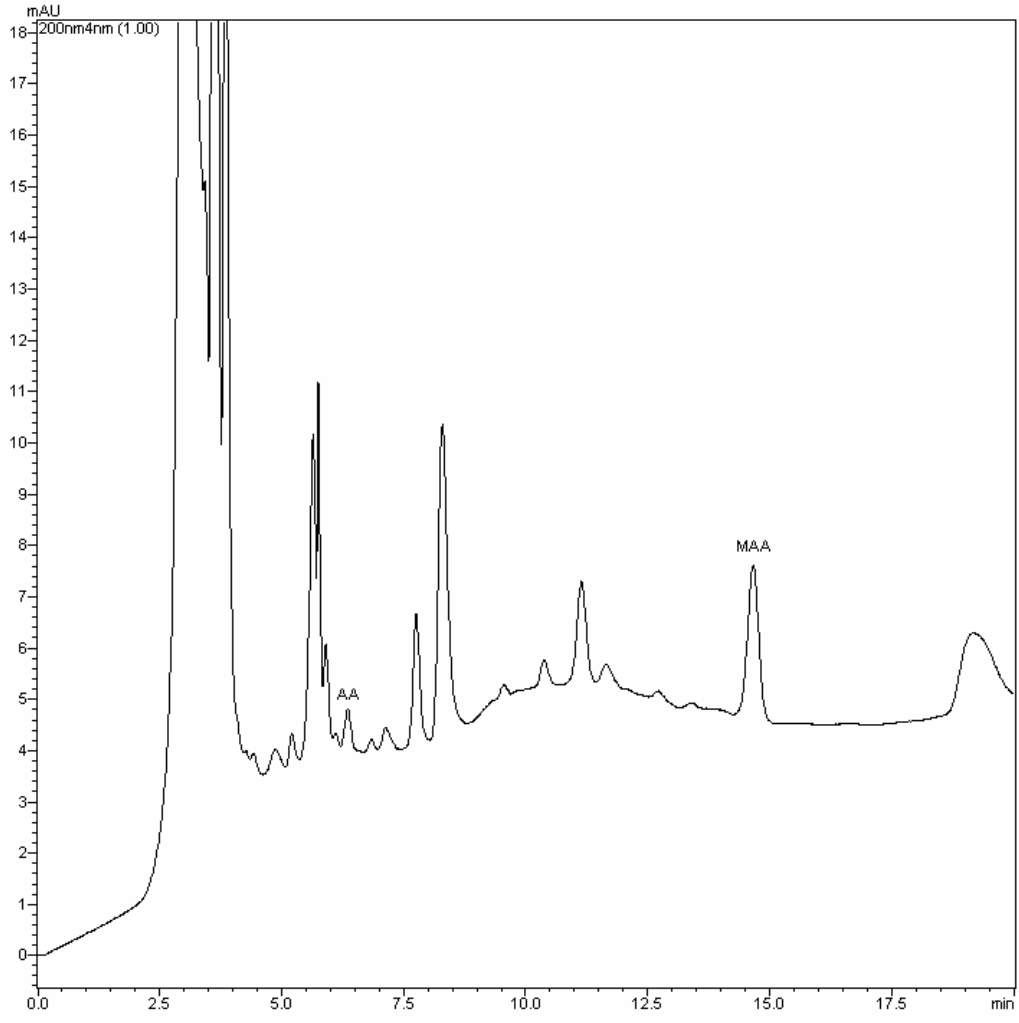
Şekil 24. NC kahve numunesinden elde edilen kromatogram



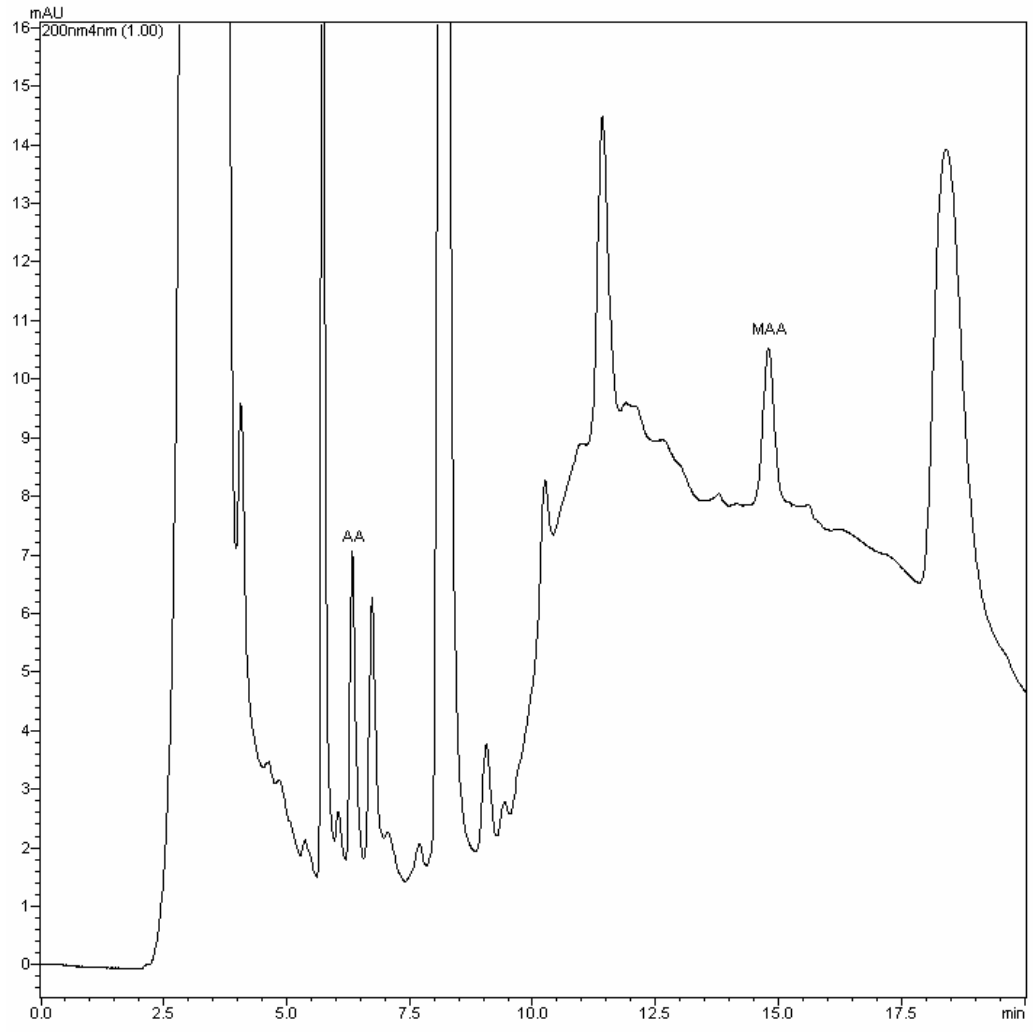
Şekil 25. N kafeinsiz kahve numunesinden elde edilen kromatogram



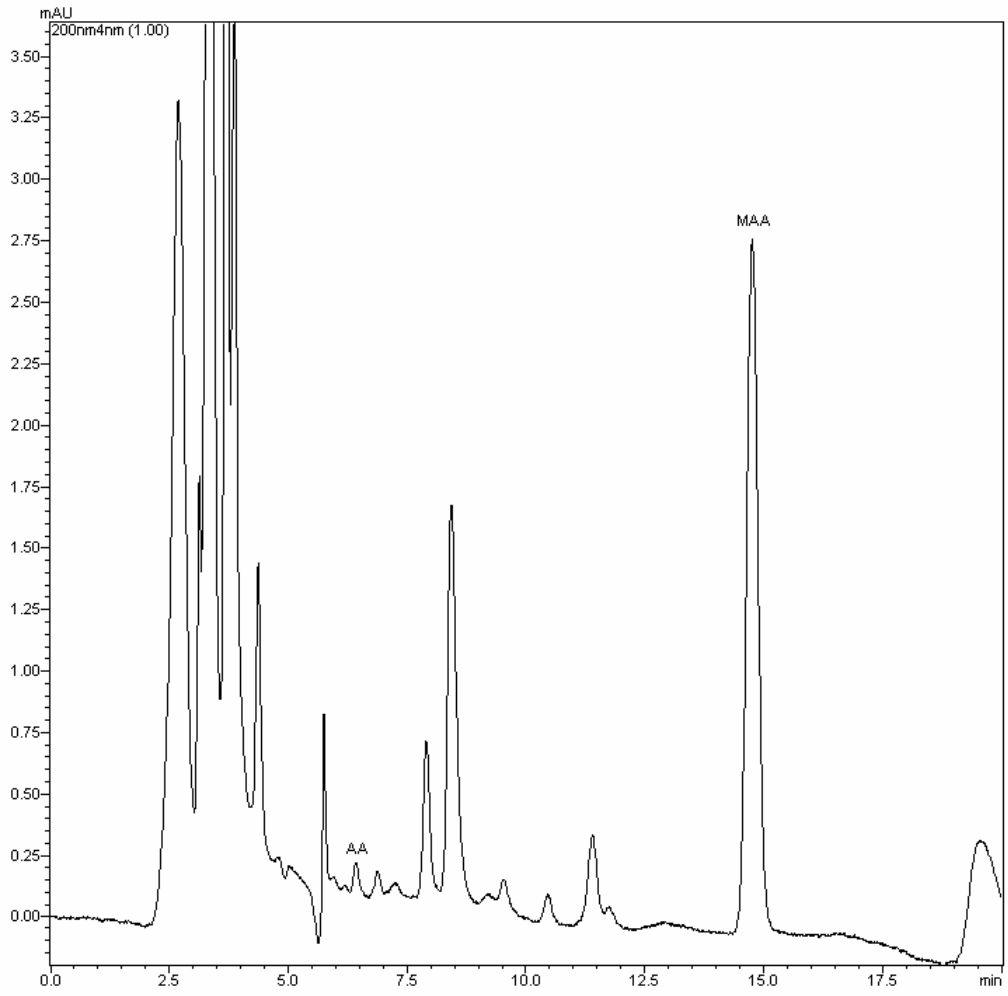
Şekil 26. NG kahve numunesinden elde edilen kromatogram



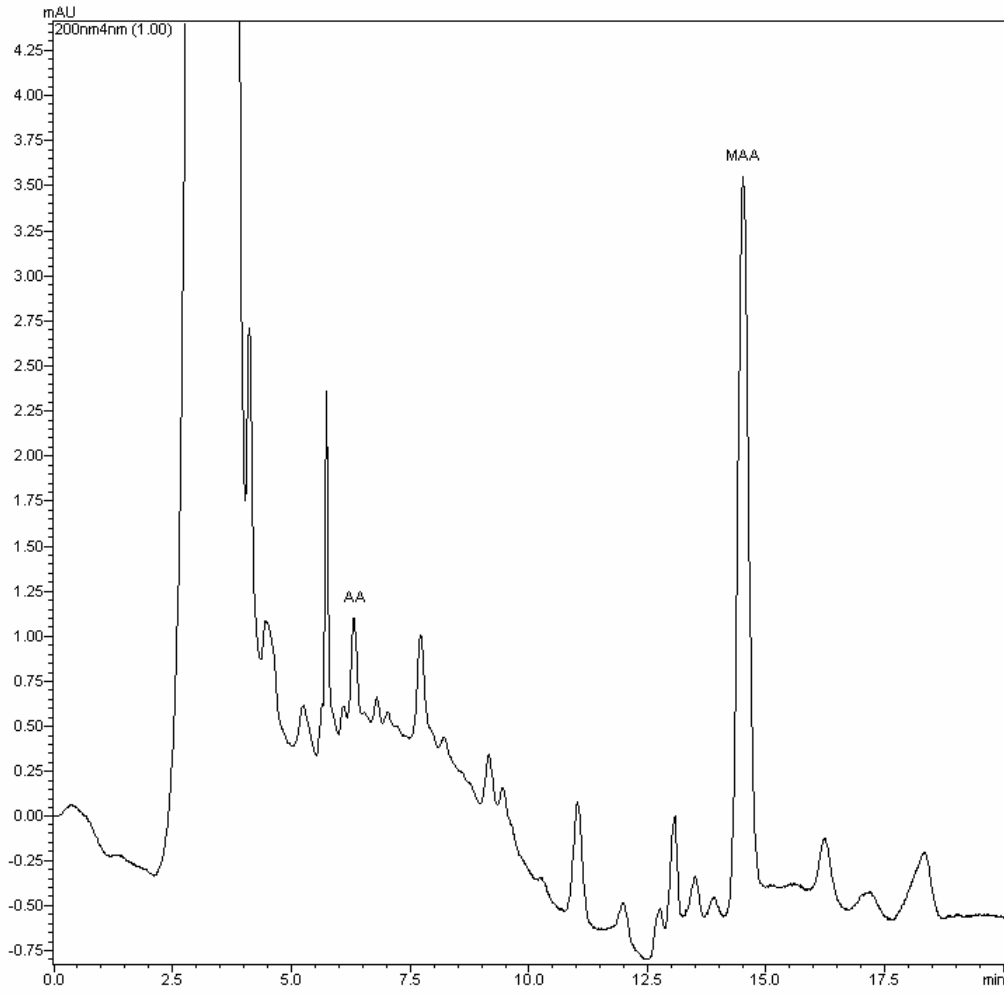
Şekil 27. ND çikolata numunesinden elde edilen kromatogram



Şekil 28. Patates kızartması numunesinden elde edilen kromatogram



Şekil 29. E sade tahin helva numunesinden elde edilen kromatogram



Şekil 30. ÜÇK bisküvi numunesinden elde edilen kromatogram

Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre, her numune içerisindeki akrilamid miktarı ayrı ayrı hesaplanmış ve sonuçlar **Çizelge 10**'da verilmiştir.

Çizelge 10. Analizi yapılan gıda ürünlerinin akrilamid içerikleri (n=3)

| Numune Cinsi | Bulunan Miktar (mg.kg ⁻¹) |
|-----------------|---------------------------------------|
| E Çeşme Suyu | 0.00 |
| K Su | 0.00 |
| E Su | 0.00 |
| Tel Kadayıf | 0.01 |
| Tulumba Tathısı | 0.02 |
| Toz Şeker | 0.10 |
| Küp Şeker | 0.11 |

Çizelge 10. (Devam) Analizi yapılan gıda ürünlerinin akrilamid içerikleri (n=3)

| | |
|---------------------------------|------|
| Tel Kadayıf (Ev Yapımı) | 0.12 |
| P Normal Ketçap | 0.12 |
| C Normal Ketçap | 0.16 |
| İrmik Helvası | 0.17 |
| Baklava Şerbeti | 0.22 |
| Ekmek Kadayıfı | 0.22 |
| CM Kahve Beyazlatıcı | 0.24 |
| Göbete Böreği (İç Kısım) | 0.26 |
| N Çikolatalı Kahvaltılık Gevrek | 0.32 |
| Antep Fıstığı | 0.38 |
| LEG Çay | 0.43 |
| ECB Bebe Bisküvisi (İç Kısım) | 0.49 |
| Dondurma Külahı | 0.53 |
| E Çavdarlı Bisküvi | 0.58 |
| E Sade Tahin Helva | 0.58 |
| İthal Yaprak Çay | 0.59 |
| LC Patates Cipsi (Açık Renk) | 0.68 |
| N Sade Kahvaltılık Gevrek | 0.68 |
| LYL Poşet Çay | 0.83 |
| EKGB Kek | 0.90 |
| PO Patates Cipsi | 0.90 |
| K Mercimekli Çabuk Çorba | 1.10 |
| Su Böreği | 1.17 |
| M Patates Çerezi | 1.25 |
| M Petit Beurre Bisküvi | 1.25 |
| ÜDK Gofret | 1.26 |
| Cevizli Baklava | 1.32 |

Çizelge 10. (Devam) Analizi yapılan gıda ürünlerinin akrilamid içerikleri (n=3)

| | |
|--------------------------------|------|
| ÜKGB Kek | 1.35 |
| K Kremalı Domates Çabuk Çorba | 1.38 |
| ÜÇK Bisküvi | 1.41 |
| Patlamış Mısır | 1.42 |
| K Kremalı Tavuk Çabuk Çorba | 1.48 |
| EÇ Kraker | 1.50 |
| Fıstıklı Saray Burma | 1.58 |
| ECB Bebe Bisküvisi (Dış Kısım) | 1.66 |
| Kavrulmuş Fındık | 1.68 |
| E Kakaolu Bisküvi | 1.76 |
| EEL Kızarmış Ekmek | 1.83 |
| ND Çikolata | 2.00 |
| Fıstık Kahvesi | 2.09 |
| LM Patates Cipsi | 2.09 |
| S Kakaolu Kaymaklı Bisküvi | 2.12 |
| Simit (Kabuk) | 2.36 |
| KME Kahve | 2.37 |
| Ballı Ballı Tatlısı | 2.47 |
| EK Bisküvi | 2.60 |
| Göbete Böreği (Orta Kısım) | 2.83 |
| MYL Elmalı Bisküvi | 2.98 |
| ÜB Çikolatalı Bisküvi | 3.25 |
| Ekmek Kabuğu (Ev Yapımı) | 3.26 |
| Ü Petit Beurre Bisküvi | 3.28 |
| M Beyaz Çikolata | 3.32 |
| M Sütlü Çikolata | 3.34 |
| M Fındıklı Çikolata | 3.41 |

Çizelge 10. (Devam) Analizi yapılan gıda ürünlerinin akrilamid içerikleri (n=3)

| | |
|------------------------------|-------|
| Patates Kızartması (Açık) | 3.42 |
| M Ballı-Bademli Çikolata | 3.53 |
| E Petit Beurre Bisküvi | 3.55 |
| Göbete Böreği (Dış Kısım) | 3.56 |
| M Antep Fıstıklı Çikolata | 4.01 |
| M Bitter Çikolata | 4.61 |
| Kakao | 5.35 |
| E Kakao Kremalı Gofret | 6.01 |
| LC Patates Cipsi (Koyu Renk) | 8.57 |
| Mırra Kahve | 9.03 |
| E Çifte Kavrulmuş Bisküvi | 11.39 |
| Patates Kızartması (Koyu) | 14.45 |
| NC Kahve | 17.22 |
| Karamelli Kahve | 20.24 |
| JM Kahve | 20.71 |
| Vanilyalı Kahve | 21.30 |
| NG Kahve | 22.02 |
| JM Kahve | 32.95 |
| N Kafeinsiz Kahve | 38.82 |

Çizelge 10'da görüldüğü gibi, akrilamid farklı gıdalarda farklı miktarlarda bulunmaktadır. Sonuçların yorumlanması ile akrilamidin hangi tip ürünlerde göreceli olarak az ya da çok bulunduğu tespit edilmiştir. Numuneler üzerine yapılan tekli değerlendirmelerin yanı sıra numune gruplarına ilişkin toplu değerlendirmeler de yapılmıştır. Numune gruplarına ilişkin sayısal veriler **Çizelge 11'**de verilmiştir.

Çizelge 11. Numune gruplarının akrilamid profili

| Numune grubu | Numune sayısı | Ortalama değer \pm SS (mg.kg ⁻¹) |
|----------------------|---------------|--|
| Su | 3 | 0.00 \pm 0.00 |
| Şeker | 2 | 0.11 \pm 0.01 |
| Ketçaplar | 2 | 0.14 \pm 0.03 |
| Çaylar | 3 | 0.62 \pm 0.20 |
| Tatlılar | 10 | 0.67 \pm 0.84 |
| Çerezler - gevrekler | 5 | 0.90 \pm 0.62 |
| Çorbalar | 3 | 1.32 \pm 0.20 |
| Börekler | 4 | 1.96 \pm 1.51 |
| Gofretler - kekler | 4 | 2.38 \pm 2.43 |
| Ekmek – simit | 3 | 2.48 \pm 0.72 |
| Bisküviler | 15 | 2.56 \pm 2.65 |
| Çikolatalar | 7 | 3.46 \pm 0.80 |
| Patates cipsleri | 7 | 4.48 \pm 5.17 |
| Kahveler | 10 | 17.46 \pm 11.97 |

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda varılan nokta, diğer araştırmacı grupların bulguları ile uyuşur nitelikte olmak üzere, akrilamidin yüksek sıcaklığa maruz bırakılan gıda ürünlerinde bol miktarda bulunduğu ve bu gıdalar yoluyla fazlaca tüketildiğidir. Yapılan incelemelerde ürünlerin farklı sıcaklığa maruz kalan bölgelerinde, akrilamid miktarının uygulanan sıcaklıkla doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Deneysel sonuçlar göstermektedir ki akrilamid en fazla kahve, patates kızartması ve çikolata türlerinde bulunmaktadır. Bu bulguların yanı sıra yüksek sıcaklıkta ve tekrarlı pişirme işlemine maruz bırakılan ürünlerde akrilamid miktarın arttığı (çifte kavrulmuş bisküvi gibi) ve geleneksel gıda türlerinde göreceli olarak düşük miktarlarda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Gıdalarla alım yönünden ele alındığında akrilamide maruz kalan bireylerde beslenme yoluyla akut toksik etkilerin görülme olasılığı oldukça düşük görünmektedir. Ne var ki sürekli maruziyet söz konusu olduğunda nörotoksik ve karsinogenik etkilerin görülebileceği açıktır.

Risk Değerlendirmesi

Akrilamidin zararlı etkileri üzerine birçok çalışma ve risk değerlendirme yapılmıştır. Çalışmaların geneli incelendiğinde, akrilamidin özellikle nörotoksik ve karsinogenik etkileri dikkati çekmektedir. 1990 – 2002 yılları arasında akrilamide yönelik olarak yapılmış olan risk değerlendirmelerinin özetlendiği bir

çalışmada belirtildiği üzere (Ruden, 2004), akrilamidin deney hayvanları ve insanlar için karsinojenik etkili bir madde olduğu günümüzde birçok ülkenin resmi sağlık ve gıda kuruluşları tarafından kabul edilmiştir. Ne var ki 1988 yılından önceki değerlendirmelerde akrilamidin insanlar ve hayvanlar için karsinojenik olmadığı görüşü yaygındı (Rice, 2005). Bull ve ark. (1984a ve 1984b) ve Johnson ve ark. (1986) tarafından yapılmış olan ve akrilamidin farelerdeki karsinojenik etkilerini belirten çalışmaların bu tarihten çok önce yayınlanmış olması, konuya o yıllarda gerekli hassasiyetin gösterilmemiş olduğunun bir göstergesidir.

Ülkeler bazında yetişkinlerin akrilamid alımı üzerine yapılan tahminlerde bireylerin günde 0.3 – 5.1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde akrilamid aldığı, bu değerlerin çocuklarda iki-üç kat fazla olduğu belirtilmektedir. Günlük toplam akrilamid alımında başlıca pay sahibi olan gıda grupları patates kızartmaları (%16-30), patates cipsleri (%6-46), kahve (%13-39), hamur işleri ve bisküviler (%10-20) ve ekmek (%10-30) olarak tespit edilmiştir (JECFA, 2005); diğer gıda gruplarının katkısı %10 dolayındadır. Ne var ki yapılan çalışmalarda daha çok batı tarzı diyetlerin referans alınması, doğu tarzı diyetlerin akrilamid profilinin tam olarak belirlenememesine yol açmaktadır. Bu nedenle, yayınlanan değerlerin diyet özellikleri bakımından büyük farklılıklar görülen ülkelerde çok farklı düzeylere ulaşabileceği beklenebilir.

Akrilamidin ortalama günlük alım miktarları konusunda farklı kuruluşlar tarafından birçok değer yayınlanmıştır. WHO, akrilamidin günlük alım miktarını 0.3-0.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ aralığında, FDA ise 0.4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak belirlemiştir (Canady, 2002; WHO, 2002). Akrilamidin kabul edilebilir günlük alım dozu (ADI) ise FDA verilerine göre 0.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ olarak saptanmıştır (Canady, 2002).

WHO ve FAO tarafından ortaklaşa yayınlanan bir raporda, akrilamide maruz kalma sınırlarının (MOE) belirlenmesine yönelik bazı saptamalara yer verilmiştir (JECFA, 2005). 0.001 – 0.004 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ aralığındaki günlük akrilamid alımı temel alınarak yapılan saptamalarda, nöronlardaki morfolojik değişikliklerin görüldüğü NOAEL değerine göre (0.2 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$) hesaplanan MOE değerleri 200–50, diğer yan etkilerin görüldüğü NOAEL değerine göre (2 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$) hesaplanan MOE değerleri ise 2000–500 aralığında tespit edilmiştir. Raporda, tahmin edilen günlük alım miktarlarıyla karşılaştırıldığında bu değerlerin tehlike oluşturabilecek düzeyden uzak olduğu, ancak yüksek dozlara maruz kalma söz konusu olduğunda nöron harabiyeti riskinin göz ardı edilmemesi gerektiği belirtilmiştir. Raporda ayrıca 0.001 – 0.004 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ dozlarındaki akrilamid alımının kanser oluşturma riski üzerine etkisini konu alan ek bir inceleme de yapılmıştır. İnceleme sonucunda, elde edilen MOE değerlerinin genotoksik ve karsinojenik bir madde için düşük sayılabilecek düzeyde olduğu, ancak yine de insan sağlığı açısından önem taşıdığı değerlendirilmesine varılmıştır.

Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA), bireylerin akrilamid alım dozuna karşılık kansere yakalanma riskleri üzerine yaptığı değerlendirmede, kansere yakalanma olasılığını, hayat boyu 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ dozunda akrilamid alan kişiler için % 0.45, 0.02 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ dozunda alanlar için ise % 0.01 olarak belirlemiştir (http-3). Bu olasılık WHO tarafından 0.14 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ için % 0.01 (WHO,

1996), Norveç Gıda Kontrol Otoritesi tarafından $0.08 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ için % 0.01 (NFCA, 2002) olarak belirlemiştir.

Tüm bu veriler ışığında, akrilamidin insanlar için nörotoksik ve karsinojenik bir tehlike olduğu konusunda uluslararası yaklaşımların fikir birliği içinde olduğu açıktır. Ancak akrilamidin insanlar üzerindeki karsinojenik etkisinin sayısal olarak ifadesi için yeterli düzeyde epidemiyolojik verinin bulunmaması, kesin ve güvenilir bir değerlendirme yapılmasını ve net bir sonuca ulaşılmasını olanaksız hale getirmektedir (JECFA, 2005). Risk değerlendirme komiteleri, akrilamid riskinin devam etmekte olan karsinojenite ve uzun-dönemli nörotoksisite çalışmaları ışığında tekrar değerlendirilmesini ve gıdalarda akrilamid oluşumunun azaltılmasına yönelik çalışmaların devam ettirilmesini tavsiye etmektedirler.

Türkiye açısından değerlendirildiğinde ise resmi makamlar tarafından bu konuya yönelik yapılmış herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Bu, ülkemizde yaşayan bireylere yönelik bir risk değerlendirmesinin henüz yapılmadığı anlamına gelmektedir. TÜBİTAK bünyesinde akrilamid analizlerine yönelik çalışmalar yapılmakla birlikte bilindiği kadarıyla akrilamid kaynaklı risklere yönelik bir rapor yayınlanmamıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, ülkemizde üretilen gıda maddelerinin akrilamid içeriğinin ele alınması yönünden yürütülmüş özgün bir çalışmadır. Foto diyot dizisi detektör ile tayin üzerine kurulu olan yöntem, basit ve hızlı işlem basamaklarına sahiptir ve öneriler doğrultusunda valide edilmiştir. Geliştirilen sıvı kromatografisi yönteminin başlıca avantajları kullanılan kimyasalların ucuzluğu ve kolay bulunabilir bir iç standarda sahip olmasıdır. İç standardın pik normalizasyonu ile birlikte kullanılması yöntemi dış faktörlerden kaynaklanan etkilere karşı daha dayanıklı bir hale getirmiştir. Hiçbir ön deriştirme ve türevlendirme işleminin yapılmadığı göz önüne alınırsa, yöntemin tayin ve saptama sınırlarının foto diyot dizisi dedeksiyona dayalı bir yöntem için oldukça iyi ve MS dedektörlü sistemler ile karşılaştırılabilir ölçüde olduğu sonucuna varılabilir. Deneysel ve istatistiksel incelemeler sonucunda, geliştirilen yöntemin, yalnızca birkaç ürüne değil birbirinden farklı birçok gıda çeşidine uygulanabilir olduğu da net bir şekilde gösterilmiştir.

Çalışmaya konu edilen ve insan sağlığı açısından zararları ispatlanmış olan akrilamidin, ülkemizde üretilen ve çokça tüketilen gıda maddelerinde yüksek oranlarda bulunması oldukça düşündürücüdür. Ne var ki, ülkemizde üretilen ve tüketilen tüm gıda maddelerinin akrilamid görüntüsünün çıkartılabilmesi için daha kapsamlı ve ileri teknoloji çalışmalara gerek olduğu açıktır. Bu açıdan bakıldığında sunulan tez, uzun soluklu bir araştırmalar zincirinin ancak ilk halkasını oluşturabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

Ahn, J.S., Castle, L., Clarke, D.B., Lloyd, A.S., Philo, M.R., Speck, D.R., Verification of the findings of acrylamide in heated foods, *Food Addit. Contam.*, 19 (12), 1116-1124 (2002).

Amrein, T.M., Bachmann, S., Noti, A., Biedermann, M., Barbosa, M.F., Biedermann-Brem, S., Grob, K., Keiser, A., Realini, P., Escher, F., Amado, R., Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (18), 5556-5560 (2003).

Amrein, T.M., Schonbachler, B., Escher, F., Amado, R., Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (13), 4282-4288 (2004).

Amrein, T.M., Lukac, H., Andres, L., Perren, R., Escher, F., Amado, R., Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (20), 7819-7825 (2005).

Andrzejewski, D., Roach, J.A., Gay, M.L., Musser, S.M., Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (7), 1996-2002 (2004).

Arisseto, A.P., Toledo, M.C., Govaert, Y., Van Loco, J., Fraselle, S., Weverbergh, E., Degroot, J.M., Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil, *Food Addit. Contam.*, 24 (3), 236-241 (2007).

Barber, D., Hunt, J., Ehrlich, M., Lehning, E., LoPachin, R., Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing, *Neurotoxicology*, 22, 341-353 (2001a).

Barber, D.S., Hunt, J., LoPachin, R.M., Ehrlich, M., Determination of acrylamide and glycidamide in rat plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 758 (2), 289-293 (2001b).

Bayer, O., Die chemie des acrylnitrils, *Angew. Chem.*, 61 (6), 229 - 241 (1949).

Becalski, A., Lau, B.P., Lewis, D., Seaman, S.W., Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (3), 802-808 (2003).

Becalski, A., Lau, B.P., Lewis, D., Seaman, S.W., Hayward, S., Sahagian, M., Ramesh, M., Leclerc, Y., Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars, *J. Agric. Food Chem.* 52 (12), 3801-3806 (2004).

Bergmark, E., Calleman, C., Costa, L., Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111 (2), 352-363 (1991).

Bergmark, E., Calleman, C.J., He, F., Costa, L.G., Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 45-54 (1993).

Bergmark, E., Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers, *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 78-84 (1997).

- Bermudo, E., Ruiz-Calero, V., Puignou, L., Galceran, M.T., Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food, *Electrophoresis*, 25 (18-19), 3257-3262 (2004).
- Bermudo, E., Nunez, O., Puignou, L., Galceran, M.T., Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1120 (1-2), 199-204 (2006a).
- Bermudo, E., Nunez, O., Puignou, L., Galceran, M.T., Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1129 (1), 129-134 (2006b).
- Besaratinia, A., Pfeifer, G.P., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide, *J. Natl. Cancer Inst.*, 96, 1023–1029 (2004).
- Betso, S.R., McLean, J.D., Determination of acrylamide monomer by differential pulse polarography, *Anal. Chem.*, 48 (4), 766-770 (1976).
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P., Mandli, H., Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitt. Lebensmitteluntersuchung Hyg.*, 93, 638-652 (2002).
- Blank, I., Current status of acrylamide research in food: measurement, safety assessment, and formation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 30-40 (2005).
- Bologna, L.S., Andrawes, F.F., Barvenik, F.W., Lentz, R.D., Sojka, E.R., Analysis of residual acrylamide in field crops, *J. Chromatogr. Sci.*, 37 (7), 240-244 (1999).
- Bull, R., Robinson, M., Laurie, R., Stoner, G., Greisiger, E., Meier, J., Carcinogenic effects of acrylamide in SENCAR and A/J mice, *Cancer Res.*, 44, 107-111, (1984a).
- Bull, R.J., Robinson, M. Stober, J.A., Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice, *Cancer Lett.*, 24, 209–212 (1984b).
- Burek, J.D., Albee, R.R., Beyer, J.E., Bell, T.J., Carreon, R.M., Morden, D.C., Wade, C.E., Hermann, E.A., Gorzinski, S.J., Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (5-6), 157-182 (1980).
- Calleman, C.J., Bergmark, E., Costa, L.G., Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 406–412 (1990).
- Calvin, E., Vinyl and related polymers, *J. Polym. Sci.*, 9 (6), 594 – 594 (1952).
- Canady, R., Toxicology Component of FDA’s Action Plan for Acrylamide, Food Advisory Committee Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee Meeting, US Food and Drug Administration (FDA) Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), 1-23, (2002).
- Carlson, G., Weaver, P., Distribution and binding of [¹⁴C]acrylamide to macromolecules in SENCAR and BALB/c mice following oral and topical administration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 79, 307–313 (1985).

Carpenter, E.L., Davis, H.S., Acrylamide-Its preparation and properties, *J. Appl. Chem.*, 7, 671-672 (1957).

Castle, L., Campos, M.J., Gilbert, J., Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography - mass spectrometry, *J. Sci. Food Agric.*, 54 (4), 549-555 (1991).

Castle, L., Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (8), 1261-1263 (1993).

Castle, L., Eriksson, S., Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods, *J. AOAC Int.*, 88 (1), 274-284 (2005).

Cavalli, S., Polesello, S., Sacconi, G., Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 1039 (1-2), 155-159 (2004).

Chapin, R.E., Fail, P.A., George, J.D., Grizzle, T.B., Heindel, J.J., Harry, G.J., Collins, B.J., Teague, J., The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27 (1), 9-24 (1995).

Collins, J.J., Swaen, G.M.H., Marsh, G.M., Utidjian, H.M.D., Caporossi, J.C. Lucas, J.J., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide, *J. Occup. Med.*, 31, 614-617 (1989).

Croft, M., Tong, P., Fuentes, D., Hambridge, T., Australian survey of acrylamide in carbohydrate-based foods, *Food Addit. Contam.*, 21 (8), 721-736 (2004).

Cutie, S.S., Kallos, G.J., Determination of acrylamide in sugar by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 58 (12), 2425-2428 (1986).

Delatour, T., Perisset, A., Goldmann, T., Riediker, S., Stadler, R.H., Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy, *Agric. Food Chem.*, 52 (15), 4625-4631 (2004).

Doerge, D., Young, J., McDaniel, L., Twaddle, N., Churchwell, M., Toxicokinetics of acrylamide and glycidide in B6C3F mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202, 258-267 (2005a).

Doerge, D., Young, J., McDaniel, L., Twaddle, N., Churchwill, M., Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 208, 199-209 (2005b).

Doerge, D., Costa, G., McDaniel, L., Churchwell, M., Twaddle, N., Beland, F., DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats, *Mutat. Res.*, 580, 131-141 (2005c).

Dunovska, L., Cajka, T., Hajslova, J., Holadova, K., Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 578 (2), 234-240 (2006)

Dybing, E., Sanner, T., Risk assessment of acrylamide in foods, *Toxicol. Sci.*, 75, 7-15 (2003).

- Fennell, T., Sumner, S., Snyder, R., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W., Friedman, M., Metabolism and haemoglobin adduct formation of acrylamide in humans, *Toxicol. Sci.*, 85, 447–459 (2005).
- Frantz, S., Dryzga, M., Freshour, N., and Watanabe, P. In vitro/in vivo determination of cutaneous penetration by residual acrylamide monomer from polyacrylamide water solutions, Dow Chemical Toxicology Research Laboratory, Midland, MI, USA (1995).
- Freshour, N.L., Langvardt, P.W., Frantz, S.W., Dryzga, M.D., Direct determination of acrylamide in tissue culture solution by liquid chromatography using column switching, *J. Chromatogr.* 346, 376-381 (1985).
- Friedman, M.A., Dulak, L.H., Stedham, M.A., A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27 (1), 95-105 (1995).
- Friedman, M., Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide: A review, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (16), 4504-4526 (2003).
- Fuhr, U., Boettcher, M.I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J., Sorgel, F., Schomig, E., Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15 (2), 266–271 (2006).
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M.I., Hamilton, L.P., von Tungeln, L.S., Beland, F.A., Marques, M.M., Doerge, D.R., DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1328–1337 (2003).
- Gokmen, V., Senyuva, H.Z., Acar, J., Sarioglu, K., Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1088 (1-2), 193-199 (2005).
- Granby, K., Fagt, S., Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee, *Anal. Chim. Acta*, 520, 177-182 (2004).
- Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P., Schieberle, P., Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – A minor but potent precursor in acrylamide formation, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4751-4757 (2004).
- Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosen, I., Bruze, M., Kautianen, A., Magnusson, A.L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A., Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose, *Scand. J. Work Environ. Health*, 27, 219-226 (2001).
- Hagmar, L., Wirfalt, E., Paulsson, B., Tornqvist, M., Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender, *Mutat. Res.*, 580 (1-2), 157-165 (2005).
- Hashimoto, K., Aldridge, W., Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent, *Biochem. Pharmacol.* 19 (9), 2591–2604 (1970).

Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W., Hartig, L., Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 520 (1-2), 207-215 (2004).

Hofler, F., Maurer, R., Cavalli, S., Schnelle Analyse von Acrylamid in Lebensmitteln mit ASE und LC/MS, *GIT Labor - Fachzeitschrift*, 48, 968-970 (2002).

Hogan, K.A., Scott, C.L.S., Mortality patterns and acrylamide exposure, *J. Occup. Med.*, 32, 947-949 (1990).

http-1 Besaratinia, A., Pfeifer, G.P., A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity, <http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/bgm006v1> (14.1.2007).

http-2 Environmental Protection Agency, Acrylamide by Gas Chromatography, Method 8032A, <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8032a.pdf> (14.3.2007).

http-3 Environmental Protection Agency (EPA), Acrylamide (CASRN 79-06-1), <http://www.epa.gov/iris/subst/0286.htm> (14.3.2007).

Husser, E.R., Stehl, R.H., Price, D.R., DeLap, R.A., Liquid chromatographic determination of residual acrylamide monomer in aqueous and nonaqueous dispersed phase polymeric systems, *Anal. Chem.*, 49 (1), 154-158 (1977).

Ikeda, G.J., Miller, E., Sapienza, P., Michel, T.C., King, M., Turner, V.A., Blumenthal, H., Jackson, W.E. 3rd., Levin, S., Distribution of ¹⁴C-labelled acrylamide and betaine in fetuses of rats, rabbits, beagle dogs and miniature pigs, *Food Chem. Toxicol.*, 21 (1), 49-58, (1983).

Ikeda, G., Miller, E., Sapienza, P., Michel, T., Inskeep, P., Comparative tissue distribution and excretion of [1-¹⁴C] acrylamide in beagle dogs and miniature pigs, *Food Chem. Toxicol.*, 25 (11), 871-875 (1987).

Inoue, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Development of high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with size-exclusion chromatography for determination of acrylamide in fried foods, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (12), 1877-1884 (2003).

International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 60: Some Industrial Chemicals, Geneva, Switzerland, 389-433, 1997.

JECFA - 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 (2005).

Jezussek, M., Schieberle, P., A new LC/MS-method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods, *J. Agric. Food Chem.* 51 (27), 7866-7871 (2003).

- Jiao, J., Zhang, Y., Ren, Y., Wu, X., Zhang, Y., Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1099 (1-2), 198-202 (2005).
- Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, C.H., Friedman, M.A., Mast, R.W., Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85 (2), 154-168 (1986).
- Kadry, A., Friedman, M., Abdel-Rahman, M., Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 7, 127-133 (1999).
- Kienzle, E., Ranz, D., Thielen, C., Jezussek, M., Schieberle, P., Carry over (transfer) of feed-borne acrylamide into eggs, muscle, serum, and faeces – a pilot study with Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 89, 79-83 (2005).
- Konings, E.J.M., Baars, A.J., van Klaveren, J.D., Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Hiemstra, M., van Kooij, J.A., Peters, P.W.J., Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks, *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1569-1579 (2003).
- Lagalante, A.F., Felter, M.A., Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 52 (12) 3744-3748 (2004).
- Lee, M.R., Chang, L.Y., Dou, J., Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–positive chemical ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 582 (1), 19-23 (2007).
- Leung, K.S., Lin, A., Tsang, C.K., Yeung, S.T.K., Acrylamide in Asian foods in Hong Kong, *Food. Addit. Contam.*, 20 (12), 1105-1113 (2003).
- LoPachin, R.M., Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561, 21-37 (2005).
- Ludwig, F.J., Besand, M.F., High performance liquid chromatographic determination of unreacted acrylamide in emulsion or aqueous homopolymers or emulsion copolymers, *Anal. Chem.* 50 (1), 185-187 (1977).
- MacWilliams, D.C., Kaufman, D.C., Waling, B.F., Polarographic and spectrophotometric determination of acrylamide in acrylamide polymers and copolymers, *Anal. Chem.*, 37 (12), 1546-1552 (1965).
- Maillard, L.C., Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoides par voie methodique, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 154, 66-68 (1912).
- Maniere, I., Godard, T., Doerge, D., Churchwell, M., Guffroy, M., Laurentie, M., Poul, J., DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide, *Mutat. Res.*, 580 (1-2), 119-129 (2005).

- Marlowe, C., Clark, M., Mast, R., Friedman, M., Waddell, W., The distribution of (14C) acrylamide in male and pregnant swiss-webster mice by whole body autoradiography, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 86, 457–465 (1986).
- Marsh, G.M., Lucas, L.J., Youk, A.O., Schall, L.C., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up, *Occup. Environ. Med.*, 56, 181–190 (1999).
- Mattocks, A.R., Spectrophotometric determination of pyrazolines and some acrylic amides and esters, *Anal. Chem.*, 40 (8), 1347-1349 (1968).
- McLean, J.D., Mann, J.R., Jacoby, J.A., A monitoring method for the determination of acrylamide in an industrial environment, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 39 (3), 247-250 (1978).
- Miller, M.J., Carter, D.E., Sipes, I.G., Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63, 36– 44 (1982).
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, 419, 448–449 (2002).
- Mucci, L.A., Dickman, P.W., Steineck, G., Adami, H.O., Augustsson, K., Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population-based study in Sweden, *Br. J. Cancer*, 88, 84–89 (2003).
- Mucci, L.A., Lindblad, P., Steineck, G., Adami, H.O., Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer, *Int. J. Cancer*, 109, 774–776 (2004).
- Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K., Maitani, T., Determination of acrylamide in foods by GC/MS using 13C-labeled acrylamide as an internal Standard, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 43 (6), 371-376 (2002).
- Norris, M.V., Acrylamide, In: *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, Snell, F.D., Hilton, C.L., (Eds.) Interscience, New York, 4, 106-168 (1967).
- NFCA - Norwegian Food Control Authority, Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority: Risk assessment of acrylamide intake from foods with special emphasis on cancer risk, Oslo, Norway (2002)
- Ohara-Takada, A., Matsuura-Endo, C., Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., Yoshida, M., Kobayashi, A., Tsuda, S., Takigawa, S., Noda, T., Yamauchi, H., Mori, M., Change in content of sugars and free amino acids in potato tubers under short-term storage at low temperature and the effect on acrylamide level after frying, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (7), 1232-1238 (2005).
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobayashi, H., Yoshida, M., Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods, *Food Addit. Contam.*, 20 (3), 215-220 (2003).
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development, Report on the application of biotechnology to industrial sustainability, Paris, France, 71, (2001).

- Pabst, K., Mathar, W., Palavinskas, R., Meisel, H., Blüthgen, A., Klaffke, H., Acrylamide – occurrence in mixed concentrate feed for dairy cows and carry-over into milk, *Food Addit. Contam.*, 22, 210-213 (2005).
- Pantusa, V.P., Stock, T.H., Morandi, M.T., Harrist, R.B., Afshar, M., Inhalation exposures to acrylamide in biomedical laboratories, *AIHA J.*, 63 (4), 468-473 (2002).
- Paulsson, B., Grawe, J., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment, *Mutat. Res.*, 516, 101–111 (2002).
- Paulsson, B., Athanassiadis, I., Rydberg, P., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (16), 1859-1865 (2003a).
- Paulsson, B., Kotova, N., Grawe, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B., Tornqvist, M., Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide, *Mutat. Res.*, 535 (1), 15-24 (2003b).
- Paulsson, B., Larsen, K., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts in the assessment of potential occupational exposure to acrylamides—three case studies, *Scand. J. Work Environ. Health*, 32 (2), 154–159 (2006).
- Pedersen, J.R., Olsson, J.O., Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips, *Analyst*, 128 (4), 332-334 (2003).
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K., Granby, K. "Color changes and acrylamide formation in fried potato slices" *Food Research International*, 38, 1-9, 2005
- Pelucchi, C., La Vecchia, C., Franceschi, S., Levi, F., Letter to the editor: fried potatoes and human cancer, *Int. J. Cancer*, 108, 636–637 (2004).
- Peng, L., Farkas, T., Loo, L., Teuscher, J., Kallury, K., Rapid and reproducible extraction of acrylamide in French fries using a single solid-phase sorbent, *Am. Lab.*, 35, 10-14 (2003).
- Perez, H., Cheong, H., Yang, J., Osterman-Golkar, S., Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 274, 59–68 (1999).
- Perez, H.L., Osterman-Golkar, S., A sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for detection of alkylating agents in water: application to acrylamide in drinking water, coffee and snuff, *Analyst*, 128 (8), 1033-1036 (2003).
- Pittet, A., Perisset, A., Oberson, J.M., Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1035 (1), 123-130 (2004).
- Poole, C.F., Sye, W.F., Zlatkis, A., Spencer, P.S., Determination of acrylamide in nerve tissue homogenates by electron-capture gas chromatography, *J. Chromatogr.*, 217, 239-245 (1981).

- Ramsey, J., Young, J., Gorzinski, S., Acrylamide. Toxicodynamics in the rat, Dow Chemical Company, Midland, MI, USA (1984).
- Raymer, J.H., Sparacino, C.M., Velez, G.R., Padilla, S., MacPhail, R.C., Crofton, K.M., Determination of acrylamide in rat serum and sciatic nerve by gas chromatography-electron-capture detection, *J. Chromatogr.*, 619(2), 223-234 (1993).
- Rice, J.M., The carcinogenicity of acrylamide, *Mutat. Res.*, 580, 3-20 (2005).
- Riediker, S., Stadler, R.H., Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1020 (1), 121-130 (2003).
- Roach, J.A., Andrzejewski, D., Gay, M.L., Nortrup, D., Musser, S.M., Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (26), 7547-7554 (2003).
- Robarge, T., Phillips, E., Conoley, M., Analysis of acrylamide in food by GC-MS, *LC-GC Eur.*, 2, 8-9 (2003).
- Rosen, J., Hellenas, K.E., Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analyst*, 127 (7), 880-882 (2002).
- Ruden, C., Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate, *Food Chem. Toxicol.*, 42, 335–349 (2004).
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Tornqvist, M., Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (24), 7012-7018 (2003).
- Schettgen, T., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J., A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 206, 9-14 (2003).
- Schulz, M.R., Hertz-Picciotto, I., van Wijngaarden, E., Hernandez, J.C., Ball, L.M., Dose–response relation between acrylamide and pancreatic cancer, *Occup. Environ. Med.*, 58, 609 (2001).
- Segeberck, D., Calleman, C.J., Schroeder, J.L., Costa, L.G., Faustman, E.M., Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide, *Carcinogenesis*, 16, 1161–1165 (1995).
- Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B., van Landingham, C., Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects, *Crit. Rev. Toxicol.*, 36 (6-7), 481-608 (2006).
- Skelly, N.E., Husser, E.R., Determination of acrylamide monomer in polyacrylamide and in environmental samples by high performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 50 (14), 1959-1962 (1978).
- Skoda, W., Schurz, J., Untersuchungen an hochpolymeren acrylderivaten. 7. Mitteilung: Spektren und Hitzeverfärbung von Polymethacrylnitril, *Makromol. Chem.* 29 (1), 156-163 (1959)

- Smith, E.A., Oehme, F.W., Acrylamide and polyacrylamide: A review of production, use, environmental fate and neurotoxicity, *Rev. Environ. Health*, 9, 215-228 (1991).
- Sobel, W., Bond, G.G., Parsons, T.W. Brenner, F.E., Acrylamide cohort mortality study, *Br. J. Ind. Med.*, 43, 785–788 (1986).
- Solomon, J.J., Fedyk, J., Mukai, F. Segal, A., Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide, *Cancer Res.*, 45, 3465–3470 (1985).
- Sorgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C., Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans, *Chemotherapy*, 48 (6), 267-274 (2002).
- Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M.C., Riedecker, S., Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, 419, 449–450 (2002).
- Stadler, R.H., Verzeegnassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S., Schilter, B., Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems, *Chem. Res. Toxicol.* 16, 1242-1250 (2003).
- (SFOPH) Swiss Federal Office of Public Health, Determination of Acrylamide in Food, 2002 – SFOPH, CH-3003 8.10.02, Swiss Federal Office of Public Health, Food Chemistry Section, Berne, 2003.
- Stadler, R.H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. Blank, I., In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5550-5558 (2004).
- Stadler, R.H., Acrylamide formation in different foods and potential strategies for reduction, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561, 157-169 (2005).
- Sumner, S.C., MacNeela, J.P., Fennell, T.R., Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 81–89 (1992).
- Sumner, S.C., Williams, C., Snyder, R., Krol, W., Asgharian, B., Fennell, T., Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure, *Toxicol. Sci.*, 75 (2), 260–270 (2003).
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas, K.E., Lind, Y., Rosen, J., Dietary intake of acrylamide in Sweden, *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1581–1586 (2003).
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44 (5), 323-347 (2004).

- Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., Maitani, T., Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 44 (2), 89-95 (2003).
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Acrylamide: a cooking carcinogen?, *Chem. Res. Toxicol.*, 13 (6), 517-522 (2000).
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (17), 4998-5006 (2002).
- Tateo, F., Bononi, M., GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food, *Ital. J. Food Sci.*, 15 (1), 149-151 (2003).
- Tateo, F., Bononi, M., Andreoli, G., Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market, *J. Food Compos. Anal.*, 20 (3-4), 232-235 (2007).
- Taubert, D., Harlfinger, S., Henkes, L., Berkels, R., Schomig, E., Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (9), 2735-2739 (2004).
- Tornqvist, M., Bergmark, E., Ehrenberg, L., Granath, F., Riskbedömning av akrilamid, *Kemikalieinspektionen*, 7, 1-28 (1998).
- Tornqvist, M., Acrylamide in food: The discovery and its implications, In: *Chemistry and safety of acrylamide in food*, Friedman, M., Mottram, D., Springer Science Business Media, Inc., New York, 1-19 (2005a).
- Tornqvist, M., Acrylamide in food: the discovery and its implications: a historical perspective, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561, 1-19 (2005b).
- Tseng, A.M., Determination of residual acrylamide monomer in solution and emulsion polymers by column-switching high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 519, 363-368 (1990).
- Twaddle, N., McDaniel, L., Costa, G., Churchwell, M., Beland, F., Doerge, D., Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F mice using LC-ES/MS/MS, *Cancer Lett.*, 207, 9-17 (2004).
- Tyl, R.W., Marr, M.C., Myers, C.B., Ross, W.P., Friedman, M.A., Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats, *Reprod. Toxicol.*, 14 (2), 147-157 (2000).
- USP - The United States Pharmacopeia 29 – National Formulary 25, System Suitability, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2647-2649 (2006).
- Ver Vers, L.M., Determination of acrylamide monomer in polyacrylamide degradation studies by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 37 (12), 486-494 (1999).
- Wenzl, T., De La Calle, M.B., Anklam, E., Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review, *Food Addit. Contam.*, 20 (10), 885-902 (2003).

White, E.L., Uhrig, M.S., Johnson, T.J., Gordon, B.M., Hicks, R.D., Borgerding, M.F., Coleman, W.M.3rd, Elder, J.F.Jr., Quantitative determination of selected compounds in a Kentucky 1R4F reference cigarette smoke by multidimensional gas chromatography and selected ion monitoring-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 28 (8), 393-399 (1990).

WHO - World Health Organization, Acrylamide, In: Guidelines for drinking water quality, health criteria and other supporting information, International Programme on Chemical Safety, Second ed., 2, Geneva, Switzerland, (1996).

WHO - World Health Organization, Health implications of acrylamide in food: Report of a joint FAO/WHO consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 1-39 (2002).

Wise, L.D., Gordon, L.R., Soper, K.A., Duchai, D.M., Morrissey, R.E., Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats, *Neurotoxicol. Teratol.*, 17 (2), 189-198 (1995).

Wnorowski, A., Yaylayan, V., Monitoring carbonyl-amine reaction between pyruvic acid and α -amino alcohols by FTIR spectroscopy – A possible route to Amadori products, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6537-6543 (2003).

Yaylayan, V.A., Wnorowski, A., Perez-Locas C., Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (6), 1753-1757 (2003).

Yaylayan, V.A., Perez-Locas, C., Wnorowski, A., O'Brien, J., Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids, In: Friedman, M., Mottram, D., Chemistry and safety of acrylamide in food, Springer Science Business Media, Inc., New York, US, 191-203 (2005a)

Yaylayan, V.A., Stadler, R.H., Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective, *J. AOAC Int.*, 88, 262-267 (2005b).

Young, M.S., Jenkins, K.M., Mallet, C.R., Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.*, 87 (4), 961-964 (2004).

Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, Y., Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments, *J. Chromatogr. A*, 1075, 1–21 (2005).

Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y., Zhang, Y., Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector, *J. Chromatogr. A*, 1116 (1-2), 209-216 (2006).

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., Acrylamide formation mechanism in heated foods, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4782-4787 (2003).

EK 1 Akrilamid standart maddesi analiz sertifikası

Certificate Of Analysis

Sayfa 1 / 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name Acrylamide,
electrophoresis grade, ≥99%
Product Number 148660
Product Brand Aldrich
CAS Number 79-06-1
Molecular Formula CH₂=CHCONH₂
Molecular Weight 71.08

TEST

APPEARANCE

INFRARED SPECTRUM

MISCELLANEOUS ASSAYS

SOLUBILITY

USE TEST

QUALITY CONTROL

ACCEPTANCE DATE

SPECIFICATION

WHITE POWDER, CRYSTALLINE
POWDER, CRYSTALS,

CONFORMS TO STRUCTURE.

99% (MINIMUM)

C = 250 MG/ML, H₂O;

SUITABLE FOR USE IN
ELECTROPHORESIS
AND/OR

REVISED FEBRUARY 2, 2005. RJM

LOT 02113EC RESULTS

WHITE CRYSTALS

CONFORMS TO STRUCTURE AND
STANDARD

99% *

250MG/ML, H₂O; CLEAR COLORLESS
SOLUTION

SUITABLE FOR USE IN
ELECTROPHORESIS

* SUPPLIER DATA

* SUPPLIER DATA

MAY, 2004

Ronnie J. Martin, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

EK 2 Metakrilamid standart maddesi analiz sertifikası

Certificate Of Analysis

Sayfa 1 / 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

| | |
|--------------------------|---|
| Product Name | Methacrylamide, purum, ≥98.0% (HPLC) |
| Product Number | 64090 |
| Product Brand | Fluka |
| CAS Number | 79-39-0 |
| Molecular Formula | $H_2C=C(CH_3)CONH_2$ |
| Molecular Weight | 85.10 |

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| TEST | LOT 1212682 RESULTS |
| APPEARANCE (COLOR) | WHITE |
| APPEARANCE (FORM) | CRYSTALS |
| ASSAY (HPLC) | 99.5 % rel |
| CARBON CONTENT | 56.41 % |
| HYDROGEN CONTENT | 8.17 % |
| NITROGEN CONTENT | 16.41 % |
| NMR SPECTRUM 1H | CORRESPONDS |
| DATE OF QC-RELEASE | 27/JUL/05 |

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, non-specified tests may be included as additional information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Dr. Gert van Look, Manager
Quality Control
Buchs Switzerland

EK 3 Butiramid standart maddesi analiz sertifikasi

Certificate Of Analysis

Sayfa 1 / 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

| | |
|--------------------------|---|
| Product Name | Butyramide, purum, ≥98.0% (T) |
| Product Number | 19240 |
| Product Brand | Fluka |
| CAS Number | 541-35-5 |
| Molecular Formula | CH ₃ CH ₂ CH ₂ CONH ₂ |
| Molecular Weight | 87.12 |

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| TEST | LOT 444984/1 RESULTS |
| TITRATION | 98.9 % |
| TITRATION (METHOD) | N-DETERMINATION ACCORDING TO KJELDAHL |
| APPEARANCE | WHITE FINE FLAKES |
| MELTING POINT | 114.5 C |
| SOLUBILITY (COLOUR) | COLOURLESS |
| SOLUBILITY (TURBIDITY) | CLEAR (<3.5 NTU) |
| SOLUBILITY (METHOD) | 1 G IN 10 ML MEOH |
| CARBON CONTENT | 54.72 % |
| HYDROGEN CONTENT | 10.35 % |
| NITROGEN CONTENT | 16.42 % |
| NMR SPECTRUM 1H | CORRESPONDS |
| DATE OF QC-RELEASE | 09/DEC/02 |

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, non-specified tests may be included as additional information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Dr. Gert van Look, Manager
Quality Control
Buchs Switzerland

EK 4 N,N-dimetilakrilamid standart maddesi analiz sertifikası

Certificate Of Analysis

Sayfa 1 / 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

| | |
|--------------------------|---|
| Product Name | N,N-Dimethylacrylamide, purum, ≥98.0% (GC) |
| Product Number | 38873 |
| Product Brand | Fluka |
| CAS Number | 2680-03-7 |
| Molecular Formula | CH ₂ =CHCON(CH ₃) ₂ |
| Molecular Weight | 99.13 |

| | |
|--------------------------------|---|
| TEST | LOT 402416/1 RESULTS |
| ASSAY (GC AREA %) | 99.9 % REL |
| APPEARANCE | VERY FAINTLY BROWNish-YELLOW CLEAR LIQUID |
| DENSITY D20/4 | 0.964 |
| REFRACTIVE INDEX N20/D | 1.475 |
| NMR SPECTRUM 1H | CORRESPONDS |
| DATE OF QC-RELEASE | 14/JUL/99 |
| DATE OF LAST QC-RECHECK | 12/AUG/05 |

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, non-specified tests may be included as additional information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Dr. Gert van Look, Manager
Quality Control
Buchs Switzerland

EK 5 Katı faz ekstraksiyon kartuşu analiz sertifikası



Certificate of Analysis

Oasis® HLB Extraction Cartridge

Sorbent: Oasis® HLB 30µm Cartridge Type: 1cc / 30µg
 Sorbent Batch #: 066A Cartridge Lot #: 066A36115A
 Part Number: WATO 94225

Sorbent Test Results (See reverse for description of tests)

| | Specification | Result |
|---|---------------|--------|
| Specific Surface Area (m ² /g) | 727 - 889 | 779 |
| Average Pore Diameter (Å) | 73 - 89 | 86 |
| Total Pore Volume (cm ³ /g) | 1.18 - 1.44 | 1.31 |
| Avg. Particle Diameter (µm) | 25.0 - 35.0 | 29.6 |
| Fines Content | ≤ 1.0% | 0.1 |
| Cleanliness Test | Proprietary | Pass |

| Solid Phase Extraction Recovery Test | | |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Compound | Avg. Recovery % (n=6) | Rel. Std. Deviation % (n=6) |
| Procainamide | 99 | 0.9 |
| Ranitidine | 98 | 0.7 |
| Acetaminophen | 100 | 0.8 |

Peak Identification

- Dihydroxyacetone
- Ranitidine
- Salicylic Acid
- Caffeine
- p-Toluamide

Sorbent Selectivity Test

| | Result | Chromatographic Conditions: |
|----------------------------|--------|--------------------------------------|
| k _p p-Toluamide | 23.7 | Column: 3.9 x 150mm |
| Relative Retention | | Flow Rate: 1.0 mL/min |
| Ranitidine/p-Toluamide | 0.0463 | Mobile Phase: 30:70 (v/v) Methanol / |
| Salicylic Acid/p-Toluamide | 0.200 | 0.1 M Ammonium Acetate pH 5.10 |
| Caffeine/p-Toluamide | 0.465 | Temperature: 30.0°C |

Cartridge Lot Test Results
 Average Sorbent Weight (g) 0.0300 Sorbent Weight Std. Deviation (g) 0.0003
 Average Air Flow Rate (L/min) 0.9

Material Approved: Jul Ferreira Date: 10 April 2006
 Quality Control

Oasis, Symmetry, and Waters are trademarks of Waters Corporation.
 © Waters Corporation 2000. Printed in the U.S.A.

Form #1160, Rev. 3

WAT056813

Oasis and Waters are trademarks of Waters Corporation. © 2004 Waters Corporation
 Waters Chromatography 34 Maple Street Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com

EK 6 Analiz kolonu performans raporu

Column Performance Report

Cat.No. 5020-01771

Serial No. 5J182477

Acquired : 05/10/31 15:38:05
User : TAHARA

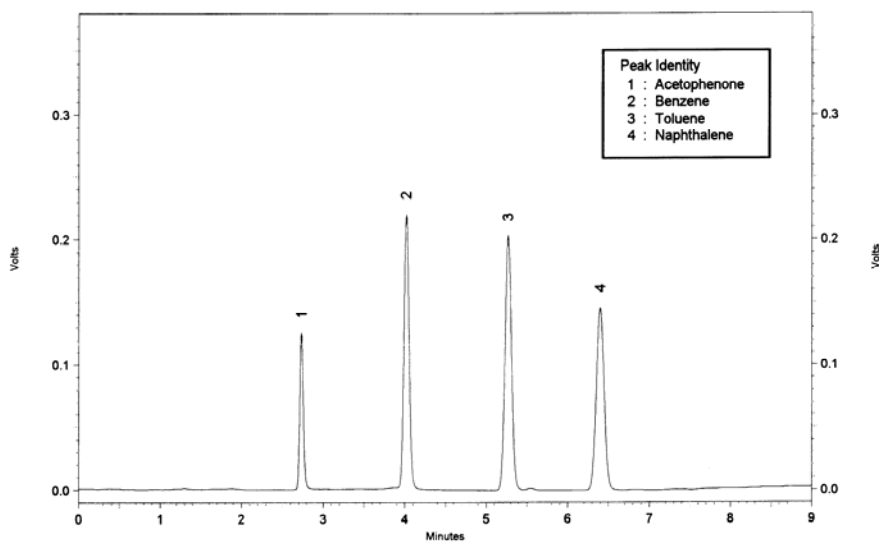
Channel A Method

Column Specification

Column Packing Inertsil ODS-3 3 [um]
Material Lot.No. TQ3-2272
Column Dimension 4.6 I.D. x 150 [mm]
Guarantee N = 19,000

Test Condition

Mobile Phase : CH3CN / H2O = 65 / 35
Flow Rate : 1.0 [ml/min]
Pressure : 8.8 [MPa]
Column Temp. : 40 [deg]
Detector UV : 254 [nm]
Sample Size : 1.0 [ul]



Channel A Results

| Peak No. | Name | Time | W1/2 | $N=5.54(t/W1/2)^2$ | $Asy=W0.05/2f$ |
|----------|-------------|------|-------|--------------------|----------------|
| 4 | Naphthalene | 6.40 | 0.104 | 20821 | 1.03 |

