

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÖRNEK SIKIŞTIRMA VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE
NİTRİT VE NİTRAT İYONLARININ BİR ARADA TAYİNİ: GIDA
ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep KALAYCIOĞLU

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÖRNEK SIKIŞTIRMA VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE
NİTRİT VE NİTRAT İYONLARININ BİR ARADA TAYİNİ: GIDA
ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep KALAYCIOĞLU

509121080

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

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

OCAK 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509121080 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Zeynep KALAYCIOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**ÖRNEK SIKIŞTIRMA VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE NİTRİT VE NİTRAT İYONLARININ BİR ARADA TAYİNİ: GIDA ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

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

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN

İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Aralık 2014

Savunma Tarihi : 23 Ocak 2015

Aileme,

ÖNSÖZ

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü yüksek lisans tezi olarak sunulmak üzere Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER danışmanlığında hazırlanmıştır.

Öncelikle bu tez çalışma konusunun belirlenmesinden başlamak üzere, çalışmanın her aşamasında karşılaştığım problemlerin çözümünde bana yol gösteren, aynı zamanda bilgi ve tecrübelerinden önemli derecede yararlanma imkanını benden esirgemeyen, çalışmam boyunca bana karşı hep motive edici yönde tavır sergileyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Deneyimleri ve bilgileriyle çalışmalarına desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e,

Tez çalışmam boyunca zor anlarımda beni yalnız bırakmayan ve manevi desteğini her zaman üzerimde hissettiğim hocam Dr. Filiz TEZCAN TEKELİ'ye,

Laboratuvarında birlikte çalışmayı keyifli bir deneyim olarak yaşadığım, her konuda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Araş. Gör. Hakan KAYGUSUZ'a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yanımda olan, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşım Ecem YELKENÇİ'ye, sevgilerini ve desteklerini her an hissettiğim değerli dostlarım Gülşah TÜRKKAN, Pınar Yeşim ÇENTİK, Ece ÖNCAN ve Merve BAŞ'a,

Hayatım boyunca attığım her adımda maddi ve manevi desteklerini hissettiğim, bu süreçte sabır ve moral desteği ile sürekli yanımda olan aileme ve her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan kuzenim Tolga SUBAŞI'na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Aralık 2014

Zeynep KALAYCIOĞLU
(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.KAPİLER ELEKTROFOREZ	5
2.1 Tarihsel Gelişimi	5
2.2Kapiler Elektroforezin Temel Prensipleri	5
2.3 Kapiler Elektroforez Terimleri	6
2.3.1 Elektroforetik mobilite.....	6
2.3.2 Elektroosmotik akış	7
2.3.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler.....	9
2.3.3 Görünen mobilite ve göç süresi	9
2.1.4 Ayırma etkinliği.....	10
2.3.5 Pik genişlemesi	10
2.3.6 Rezolüsyon.....	11
2.4 Kapiler Elektroforez Cihazı.....	11
2.4.1 Kapiler kolon	12
2.4.2 Yüksek voltajlı güç kaynağı	13
2.4.3 Örnek enjeksiyonu	13
2.4.4 Dedektör.....	14
2.4.4.1 UV dedektör.....	14
2.5 Kapiler Elektroforez Yöntemleri.....	15
2.5.1 Kapiler zon elektroforez	16
2.6 Örnek Sıkıştırma Metodu	17
2.6.1 Temel prensipleri	17
2.6.2 Örnek sıkıştırma metodu uygulamaları.....	18
3. NİTRİTLER VE NİTRATLAR.....	21
3.1 Nitratlar ve Nitritlerin Genel Özellikleri	21
3.2 Gıdalarda Nitrit ve Nitratlar	22
3.2.1 Doğal olarak yapısında nitrit ve nitrat içeren gıdalar	22
3.2.2 Gıda katkı maddesi olarak yapısında nitrit ve nitrat bulunan gıdalar	23
3.3 Nitrit ve Nitratların Sağlık Üzerine Etkileri	24
3.3.1 Methemoglobinemi	24
3.3.2 Karsinojenik etkileri	25
3.3.2.1 Nitrozamin oluşumu.....	24
3.4 Balık Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit	26
3.4.1 Balık aminlerinin nitrozlaşması	27

3.4.2 Balıklarda nitrozamin oluşumunu etkileyen faktörler	28
3.5 CE Yöntemiyle Nitrit ve Nitrat Tayinlerine İlişkin Literatür İncelemesi.....	28
4.DENEYSEL KISIM	31
4.1. Malzeme ve yöntemler	31
4.1.1 Malzemeler	31
4.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması.....	31
4.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları	31
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
5.1 Metod Optimizasyonu	33
5.1.1 Tampon çözeltinin optimizasyonu	33
5.1.2 Örnek sıkıştırma metodunun optimizasyonu	33
5.2 Metod Validasyonu	35
5.2.1 Kalibrasyon doğrusu	35
5.2.2 Tekrarlanabilirlik	35
5.2.3 LOD ve LOQ değerleri	36
5.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması	36
5.3.1 Metodun doğruluğu.....	36
5.4 Tartışma	38
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMALAR

CZE	: Kapiler Zon Elektroforezi
CE	: Kapiler Elektroforez
UV	: Ultraviyole
IC	: İyon Kromatografi
GC	: Gaz Kromatografi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
EOF	: Elektroosmotik Akış
HETP	: Teorik Plaka Genişliği
LIF	: Lazer İndüklenmiş Floresans
LLE	: Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
FASS	: Alan Güçlendirilmiş Örnek Sıkıştırma
LVSS	: Geniş Hacimde Örnek Sıkıştırma
M-FASI	: Matriks Alan Güçlendirilmiş Örnek Sıkıştırma
HC-FASI	: Baş-Sütun Alan Güçlendirilmiş Örnek Sıkıştırma
EKS	: Elektrokinetik Aşırı Yükleme
DMA	: Dimetilamin
TMA	: Trimetilamin
NDMA	: Nitrozometilamin
NPIP	: Nitrozopiperidin
NPYR	: Nitrozopirolidin
PEI	: Polietilenimin
CTAB	: SetiltriaminBromür
TTAB	: Tetradesiltrimetilamonyum Bromit
PB	: Polibren
ACN	: Asetonitril
CE	: Kapiler Elektroforez
UV	: Ultraviyole
IC	: İyon Kromatografi
GC	: Gaz Kromatografi
LOD	: Belirleme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: EOF'e etki eden faktörler	9
Çizelge 2.2: CE'de kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri.....	14
Çizelge 2.3: Kapiler elektroforez yöntemleri	15
Çizelge 2.4: Örnek sıkıştırma yöntemleri.....	18
Çizelge 3.1: Azot döngüsünde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar.	21
Çizelge 3.2: Nitrat ve nitritin özellikleri.....	22
Çizelge 3.3: Bazı sebze ve meyvelerdeki nitrat ve nitrit içerikleri.....	22
Çizelge 3.4: Bazı gıdalardaki nitrat ve nitrit miktarları	23
Çizelge 3.5: Kürlenmiş et ürünlerinde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar	24
Çizelge 3.6: Bazı kürlenmiş et ürünlerindeki ortalama nitrat ve nitrit değerleri	24
Çizelge 3.7: Nitrozamin oluşumunda meydana gelen kimyasal reaksiyonlar	26
Çizelge 3.8: Bazı balıklardaki nitrozamin miktarları	28
Çizelge 5.1: Tekrarlanabilirlik sonuçları	36
Çizelge 5.2: Balık örneklerindeki nitrat ve nitrit miktarları	36
Çizelge 5.3: Balık örneklerine ait geri kazanım değerleri	37

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Kapiler duvarı çift tabakası	7
Şekil 2.2: HPLC ve CE akış gösterimleri	9
Şekil 2.3: Kapiler elektroforez cihaz şeması	12
Şekil 2.4: Kapiler elektroforezde ayırım.....	16
Şekil 3.1: Azot döngüsü.....	21
Şekil 3.2: Balıklardaki aminlerin nitrozlaşması.....	27
Şekil 5.1: Örnek sıkıştırma (b) ile normal injeksiyonun (a) karşılaştırılması	35
Şekil 5.2: Bir ton balığı ekstreğine ait elektroforegram	37

ÖRNEK SIKIŞTIRMA VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE NİTRİT VE NİTRAT İYONLARININ BİR ARADA TAYİNİ: GIDA ÖRNEKLERİNE UYGULANMASI

ÖZET

Gıdalarda doğal olarak bulunan bazı maddeler, insan vücudunda gastrointestinal sistemde veya gıda ürünlerinin hazırlanma aşamasında yeni kimyasallara dönüşebilmektedir. Oluşan bu yeni bileşiklerin bir kısmı toksik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik özellikler göstermektedir. İnsan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olan gıda bileşenlerinin analizleri her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Etkin, hızlı ve ucuz analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu çalışmada, kimyasal reaksiyon sonucu toksik gıda bileşenlerini oluşturan, gıda içerisinde ilave katkı maddesi veya doğal olarak bulunan nitrit ve nitrat anyonlarının birarada analizi için yeni bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Nitrat ve nitritler azot döngüsünün nitrifikasyon aşamasında bakteriler aracılığıyla doğal olarak oluşan inorganik anyonlardır. Sebzeler ve içme sularında doğal olarak bulunurken, işlenmiş et ürünlerine ilave katkı maddesi olarak katılırlar. Nitratların, insan sağlığına olumsuz etkileri, gıdalardaki sekonder aminlerle birleşerek kanserojen nitrozaminleri meydana getiren nitritlere dönüşmesiyle gerçekleşir. Ayrıca nitritlerin, bebeklerde ölümcül mavi bebek sendromuna neden olduğu da bilinmektedir.

Balığın yapısında doğal olarak bulunan nitrat ve nitrit miktarı çok az olmasına rağmen, balık ürünlerinin işlenmesinde kullanılan tuzda nitrat ve nitrit tuzları bulunmaktadır. Ayrıca, balıktaki aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu biyojenik aminler oluşmaktadır. Bu şekilde meydana gelen biyojenik aminler ortamda bulunan nitrit iyonları ile reaksiyon vererek karsinojenik nitrozaminleri oluşturur. Özellikle konserve ton balığı gibi çocukların çok tükettiği, yetişkin diyetlerinde de sıkça tüketilen ürünlerde nitrat ve nitrit iyonlarının tayini önemli bir gıda kontrol konusudur.

Kapiler elektroforezin sunduğu analiz teknikleri küçük anorganik iyonlardan, DNA gibi büyük moleküllere kadar geniş bir aralıktaki bileşiklerin, uygulanan yüksek voltaj ile ayrılmasını ve dedekte edilmesini mümkün kılar. Etkin ayırma gücü nedeniyle özellikle gıda gibi karmaşık matrikse sahip numuneler için oldukça uygun bir yöntemdir. Bu amaçla örnek ön hazırlama basamaklarını en aza indirgeyen, uygulaması basit, hızlı ve düşük gözlenebilme sınırlarına sahip yeni kapiler elektroforez teknikleri geliştirilmektedir.

Bu tez çalışmasında, nitrat ve nitrit anyonlarının kalitatif ve kantitatif tayini için kapiler elektroforez-örnek sıkıştırma yöntemi geliştirilmiştir. Asidik bir ayırma ortamı seçilerek, EOF'un hızı düşürülmüş ve elektroforetik mobiliteleri çok yüksek olan bu anyonların kısa sürede dedeksiyonu sağlanmıştır. Analiz yönteminin esası, kapiler içinde bir elektrik alan farkı yaratarak ve normal CE injeksiyon hacmine göre

daha yüksek bir hacimde injeksiyon yaparak, kapiler üzerinde örneğin derişiklendirilmesine dayanmaktadır. Bu yolla, düşük hacimdeki injeksiyona oranla yöntemin hassasiyeti her iki anyon için de yaklaşık 30 kat arttırılmıştır. Yöntem konserve ton, konserve uskumru ve sardalya balık örneklerinde nitrit ve nitrat anyonlarının tayininde başarı ile uygulanmıştır.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF NITRITE AND NITRATE ANIONS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS-SAMPLE STACKING TECHNIQUE: APPLICATION TO FOOD SAMPLES

SUMMARY

Some components which naturally exist in food may form new chemicals in gastrointestinal system in human body or during food production processes. Some of these new chemical compounds which are formed may be toxic, carcinogenic, mutagenic and teratogenic. Analyses of food components which affect human health badly have an increasing importance in recent years.

Nitrite and nitrate are inorganic anions which are formed naturally by bacteria in nitrification step in nitrogen cycle. They exist in vegetables and drinking water naturally. On the other hand, they are added as additives into the cured meat products. Both anions are harmful to human health. Nitrate is reduced to nitrite by both microorganism and nitrate reducing bacteria. Nitrite combines with secondary amines in food products. They form nitrosamines which are carcinogenic together. Besides, it is known that nitrite results in blue baby syndrome. It is especially dangerous and even fatal for babies younger than 6 months.

Even though nitrate and nitrite are not added directly to canned fish products, nitrate exists in fresh fish. Nitrite forms through impure sea or rock salts or by bacterial reduction of nitrate. On the other hand, biogenic amines are formed by the decarboxylation of aminoacids in fish. Biogenic amines have an importance for biological functions of human and animals. But high doses of biogenic amines cause adverse health effects. Biogenic amines like putresine and cadaverine may react with nitrite anion and they form carcinogenic nitrosamines. Canned tuna, mackerel and sardine are food products that are frequently consumed by children and adults. Analysis of nitrate nitrite content of these products is an important food control matter.

In this thesis work, we aim to develop a new capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in canned fish products; tuna, mackerel and sardine.

It is possible to separate and detect of a wide spectrum of components from smallest inorganic ions to biggest molecules like DNA under high electrical field with capillary electrophoretic techniques. Capillary electrophoresis (CE) has a high separation power. Thus, it is especially suitable for complex matrices. There are several modes of capillary electrophoresis. Each of them offers solutions for analytical problems. Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the most useful modes of CE. In CZE, the separation is based on differences in electrophoretic mobilities of the separated ions. In capillary electrophoresis, all ions are injected from the anodic side. They are carried toward to cathodic side (the detector side) regardless of their charge by strong electroosmotic flow (EOF). But small anions like nitrite and nitrate have high electrophoretic mobility that cannot be easily swept. For

a fast separation, some modifications should be done. The first way is working with low pH buffers and making injection from the cathodic side changing the polarity. Thereby, small anions can migrate across reduced EOF. The other way is to reverse the direction of EOF by using an electroosmotic modifier in buffer or by coating the capillary with a positively charged polymer. With this way, small anions co-migrate with EOF.

In this thesis work, formic acid/formate buffer was selected as the low pH medium. EOF was reduced with this way. The conditions were optimized by changing the formic acid concentration. The resolution of nitrite and nitrate anions was checked at pHs between 3.5 and 4.2. Nitrate ion was not affected from pH changes. The best separation and determination conditions were selected as 30 mM formic acid/formate buffer at pH 4.0. But in earlier steps with fish samples, only nitrate anion was detected. Consequently, a sample stacking method was improved to increase the detection sensitivity of both anions for the fish samples.

Narrow injection zone applied in CE enables to obtain sharp peaks. If detection sensitivities of analytes are very low, it may be necessary to increase the breadth of injection zone. However, this approach causes broadened peaks. Therefore, instead of an increase in injection zone, some stacking techniques *i.e.* online concentration techniques are preferred in order to increase the sensitivities of analytes. In a stacking operation, the conductivity of separation buffer should be higher than the sample zone. This means that the electrical field in the sample zone is higher than that of separation buffer. The conductivity of the separation buffer was increased by the addition of sodium sulfate in this work. Optimum sodium sulfate concentration was fixed at 30 mM in 30 mM formic acid/formate buffer at pH 4.0. When the high voltage is applied, nitrite and nitrate ions in the low conductivity sample zone experience higher field strength than those in the high-conductivity separation buffer. Thus the both ions move quickly through the sample matrix and slow down when they reach the boundary of separation electrolyte. Consequently, sample ions stack as a narrow zone at the boundary of the sample and buffer solutions. When this concentrated zone reaches the detector, sharp peaks are observed and the detection sensitivities of ions improve. The second parameter is to control the injection condition in sample stacking technique. Injection times were changed between 60-280 s. When the injection time exceeded 160 s, peak broadening was seen for both anions. Finally, the optimum injection condition was selected as 160 s at 50 mbar.

It was added acetonitrile to fish samples to remove protein. Acetonitrile has low conductivity. So, the presence of acetonitrile in the sample zone improved the stacking effect. The effect of acetonitrile concentration was studied, but it was not observed any improvement for peak shape and signal by increasing ACN content. Excellent separation efficiency was observed when the sample solution contained 7.5 % (v/v) ACN. The same amount of ACN was added to nitrate and nitrite solutions when constructing the calibration curves of both anions.

When detection limits of both ions are compared between normal capillary electrophoresis mode and sample stacking mode, it was seen that the stacking mode improved the detection sensitivity as thirtyfold for both anions.

The calibration curves show linear dynamic ranges from 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with correlation coefficients of 0.998 and 0.999 for nitrate and nitrite ions, respectively. The limit of detections, LOD ($S/N=3$), were found to be 0.550 and 0.824 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the limit of quantifications, LOQ ($S/N=10$)

were 1.82 and 2.75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for nitrate and nitrite, respectively. The method ensures very short analysis time, good accuracy and reproducibility. The precision of the method was performed in terms of inter-day and intra-day repeatability as RSD%. Interday repeatability was calculated by injecting both anions on three different days. Intra-day analyses were determined by injecting the anions seven times in the same day. The relative standard deviation was smaller than 3 for intra-day analysis and inter-day analysis for both anions.

Nitrate and nitrite anions were determined in nine canned fish samples using the optimized CE-sample stacking method. Fish samples were homogenized in a laboratory blender and 0.5 g of the blended portions was extracted twice with 5 mL of deionized water. The suspensions were stirred for 10 min at 75⁰C and then ultrasonicated for 15 min. The supernatants were combined after being filtered through a Whatman 41 filter paper and defatted with hexane. Acetonitrile was added to extract and the final extract was diluted to 10 mL with deionized water. The resulting solution containing 7.5% (v/v) ACN was filtered from 0.45 μm micro filters and directly injected.

Separations were carried out in uncoated fused silica capillaries with 50 μm i.d. (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). The total length of capillary was 65 cm and the length to detector was 50 cm. The separation voltage was -25 kV, and measurements were performed at 25 ⁰C. The UV detection was carried out at 210 nm.

Recoveries of the anions were calculated by using the standard addition method. Different fish samples chosen were fortified with the analyte ions, each at three different concentrations corresponding to 50%, 100% and 200% of the real sample concentrations. Good results of recovery were obtained, with values ranging between 90% and 99%.

Except for mackerel and one tuna sample, all fish samples contain nitrite. Peaks are seen clearly and there are no unknown peaks in this region for all fish samples. As a result of the deproteinization before injection, proteins likely to adsorb onto the capillary wall were removed, so that efficient results of samples were obtained.

Although there are few studies in the literature on the nitrate and nitrite contents of fresh fish products, we could not find any report on canned fish products. A capillary electrophoresis-sample stacking method was developed for the simultaneous analysis of nitrate and nitrite ions in this work. The method has very short analysis time, good accuracy and reproducibility. By the on-line sample stacking technique, the sensitivity of the method was improved for both nitrate and nitrite ions in canned fish samples.

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez, yüksek elektrik alan altında analitlerin yük/büyükölük oranlarına göre göç etmesi prensibine dayanan bir ayırma ve analiz tekniğidir. Hızı ve yüksek ayırma gücü ile pek çok uygulama alanında süratle yaygınlaşan bir yöntemdir. Gıda analizlerinde, gıda kalite kontrol ve güvenilirliğinde, gıda kimyasal bileşenlerinin tayininde diğer kromatografik yöntemlere göre daha avantajlıdır. Ayırım, kromatografik kolonlara göre çok daha ucuz olan silika kapiler kolonlarda gerçekleştirilir. Uzun örnek ön hazırlama basamaklarını ortadan kaldırarak doğrudan injeksiyon yapabilme avantajı ise analiz zamanını ve kimyasal tüketimini önemli ölçüde ortadan kaldırır [1].

Nitrat ve nitritler azot döngüsünün nitrifikasyon aşamasında azot tutucu bakteriler aracılığıyla doğal olarak oluşan, suda yüksek çözünme özelliğine sahip inorganik iyonlardır [2]. Nitratlar, sebzeler ve içme suları aracılığıyla vücuda alınır. Ayrıca nitrat ve nitritler işlenmiş et ürünlerinde koruyucu ve renk arttırıcı olarak kullanılırlar. Nitratlar sağlık üzerine olumsuz etkilerini, mikroorganizmalar aracılığıyla nitritlere indirerek gösterirler [3]. Nitritler, kandaki hemoglobini methemoglobine dönüştürerek, kanın oksijen taşıma kapasitesini azaltır veya yok ederler. Bu da bebeklerde mavi bebek sendromu olarak da bilinen methemoglobinemiye neden olur [4-6]. Ayrıca nitritler, hayvansal gıdalardaki sekonder aminler ile birleşerek karsinojenik nitrozaminleri meydana getirirler. Literatürde nitrozaminler ile özellikle mide ve bağırsak kanserleri arasındaki ilişiyi inceleyen çok sayıda makale bulunmaktadır [7-10]. Nitrat ve nitritlerin olumsuz sağlık etkilerini ortaya çıkmasını önlemek amacıyla uluslararası sağlık kuruluşlarınca bir takım sınır değerler belirlenmiştir [11-13].

Çeşitli gıdalardaki nitrit ve nitrat anyonlarının analizi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalar bazı derleme makalelerde toplanmıştır [14, 15]. Yapılan analizlerin büyük bir çoğunluğu, HPLC, GC, IC gibi kromatografik yöntemlere dayanmaktadır. Ancak gıda kontrol laboratuvarlarında nitrit ve nitrat analizi, AOAC Uluslararası Resmi Analiz Metodları tarafından kabul edilen nitratın

kadmiyumla nitrite indirgenmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntemle gerçekleştirilmektedir [16]. Bu yöntem rutin analizler için zaman alıcı örnek hazırlama işlemleri gerektirmesinin yanısıra nitrat ve nitritin birarada tayinine izin vermez. Özellikle işlenmiş et ürünlerinde ilave katkı maddesi olarak kullanılan nitrat ve nitrit dozunun kontrolü insan sağlığı açısından çok önemlidir.

CE'de silika kolonda çok yüksek elektrik alan altında oluşturulan elektroosmotik akış sayesinde yüklerine bakılmaksızın bütün türler, katoda ve bu yöne yerleştirilmiş dedektöre doğru hareket ederler. Elektroforetik mobilite farklılıklarına göre ayrılarak dedekte edilirler. Ancak nitrit ve nitrat gibi küçük anyonların elektroforetik mobilitesi çok yüksek olduğu için elektroosmotik akış ile birlikte negatif elektroda doğru sürüklenmekte zorlanırlar. Bu iyonları ayırmak ve dedekte etmek için bazı modifikasyonlar yapılmalıdır. Bunlardan biri silika kapiler kolonu pozitif yükle kaplayarak elektroosmotik akışın yönünü negatif elektrottan pozitif çevirmektir. İnjektasyon negatif kutuptan yapılarak elektroosmotik akış ile anyonların elektroforetik aynı yöne çevrilir ve dedeksiyon pozitif kutup tarafından yapılır. Diğer bir yöntem ise ayırma elektrolitinin pH'ını düşürerek elektroosmotik akış hızını çok düşürmek ve anyonların kendi elektroforetik mobiliteleri ile elektroosmotik akışa karşı pozitif kutup yönündeki detektöre ilerlemelerini sağlamaktır. Bu yöntemde de injeksiyon negatif kutuptan yapılır. Her iki yöntemin de nitrit ve nitrat dahil olmak üzere birçok anyonun analizinde başarılı ile uygulandığı örnekler literatürde mevcuttur [17-20].

Balığın yapısında önemli miktarda nitrat ve nitrit bulunmamasına rağmen işlenmiş balık ürünlerinde kullanılan ham tuzun yapısında nitrat ve nitrit tuzları bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca, balığın yapısındaki ilgili aminoasitlerin dekarboksilasyonu ile biyojenik aminler oluşmaktadır [21]. Biyojenik aminler proteince zengin balık ürünlerinde yüksek miktarda bulunduklarında bozulma göstergesi olarak kabul edilmektedir [22]. Eğer balık ürünü, biyojenik amin içeriyorsa, tuzda bulunan nitrit ve biyojenik aminler arasındaki reaksiyonla kanserojen nitrozaminler oluşur [21]. Bu nedenle, balık ürünlerinde biyojenik amin ile nitrat ve nitrit tayinleri önemli bir gıda kontrol konusudur. Literatürde işlenmiş balık ürünlerindeki biyojenik amin miktarları ile ilgili çok sayıda analitik çalışma bulunmasına rağmen nitrat ve nitrit içerikleri konusunda çalışma yok denecek kadar azdır [23-25].

CE'de normal injeksiyonla nitrat ve nitrit için elde edilen dedeksiyon limitleri, nitrat ve nitritin ilave katkı maddesi olarak içeren işlenmiş et ürünlerinde ve bu iki anyonu yüksek oranda içeren sebzelerde tayini için yeterli olmasına rağmen [19], ilave katkı maddesi olarak bulunmadığı balık ürünlerinde yetersiz kalmaktadır. Kapiler elektroforezde örnek sıkıştırma metodundan yararlanarak normal kapiler elektroforezde kullanılan injeksiyon hacmi arttırılabilir. Buna karşılık ayırma elektroliti ve örnek bölgesinin kondüktivitesinde bazı değişiklikler yapılarak analitin örnek zonu ile tampon bölgesi arasında sıkışarak konsantre olması sağlanır. Böylece dik pikler elde edilir ve dedeksiyon limitleri önemli ölçüde düşürülür [26].

Bu tez çalışmasında, nitrat ve nitrit anyonlarının ayrımı ve miktar tayini için yeni bir kapiler elektroforez-örnek sıkıştırma yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen örnek sıkıştırma yöntemi ile nitrat ve nitrit için CE dedeksiyon limitleri önemli ölçüde düşürülmüştür. Düşük pH'a sahip bir ayırma ortamında çalışarak elektroosmotik akış hızı düşürülmüş ve bu anyonların elektroosmotik akışa karşı ilerlemeleri sağlanmıştır. Ancak elektroosmotik akış hızı injeksiyon yönüne doğru az da olsa mevcut olduğu için örnek matriksi kapiler dışına itilerek kapiler içinde tekrar homojen bir elektrik alan sağlanarak dedektöre ulaşan konsantre bölge, dik pikler halinde görülebilmektedir. Analiz yönteminin validasyonu yapılmış, yöntem ton, uskumru ve sardalya balık örneklerinde nitrat ve nitrit tayinlerine başarı ile uygulanmıştır.

2.KAPİLER ELEKTROFOREZ

2.1 Tarihsel Gelişimi

Elektroforez, tampon çözelti içerisindeki yüklü türlerin, elektriksel alan varlığında diferansiyel göç hızlarının farklılığı esasına dayanan bir ayırma tekniğidir. Bu yöntem ilk olarak 1937 yılında İsveçli bilim adamı Tiselius tarafından serum proteinleri çalışmasında kullanılmış ve 1948 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [27].

Elektroforez tekniği ile yapılan yapılan çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorunlardan biri difüzyon ve Joule ısınmasının sonucu olarak serbest çözeltide meydana gelen bant genişlemesi olmuştur. Bu nedenle uzun yıllar elektroforez kağıt veya jel gibi antikonvektif ortamlarda uygulanmıştır. Teknolojinin gelişimi ile gittikçe daha dar kolonların üretimi ile elektroforezin tekrar açık çözeltide yapılabilmesi arayışları başlamıştır [28].

1967 yılında Hjerten 1-3 mm iç çaplı kolonlarda proteinler, virüsler, organik ve inorganik iyonlar gibi pek çok analitin ayrılmasını ve UV dedektör ile tayinini gerçekleştirmiştir [29]. 1974'te Virtanen ve Mikkers tüp çapını 200 µm'ye indirerek ısı kaybından kaynaklanan problemleri ortadan kaldırmıştır [30-32]. 1981 yılında Jorgenson ve Lukacs kapiler çapını 75 µm'ye indirerek 30 kV gibi çok yüksek ayırma voltajı ile çalışılmasını mümkün kılmıştır [33]. 1989 yılında Beckman Coulter tarafından ilk ticari kapiler elektroforez sisteminin üretilmesiyle kapiler elektroforez, genetik, biyokimya, adli tıp ve mikrobiyoloji gibi pek çok alanda geniş bir kullanım alanı bulmuştur [28].

2.2Kapiler Elektroforezin Temel Prensipleri

Kapiler elektroforezde ayırım, uygulanan yüksek elektrik alan altında taneciklerin farklı hızlarda göç etmesi esasına dayanır. Bu elektroforetik ayırım, iki ucu açık, yaklaşık 30- 100 cm uzunluk ve 25-100 µm iç çapa sahip silindirik kapiler kolonlarda gerçekleştirilir. Kapiler kolon elektrotları ve ayırma elektroliti de denen tampon çözeltiyi içeren iki hazne arasına yerleştirilmiştir. Çok az miktarda (1-50 nL)

örnek farklı tekniklerle kapilerin bir ucuna yüklenir. Ayrım 5-30 kV gibi yüksek voltaj uygulanarak, 200-500 V/cm elektrik alan altında sağlanır. Farklı ayırma mekanizmaları ve seçicilik sağlayan ayırma tipleri ile kapiler elektroforez önemli bir ayırma ve analiz tekniği olarak gelişmektedir [28].

2.3 Kapiler Elektroforez Terimleri

2.3.1 Elektroforetik mobilité

İyonlar, bir elektrik alan içerisinde sabit hızla hareket ederler. Potansiyelin artması, dolayısıyla elektrik alan etkisinin kuvvetlenmesiyle iyonların hızı artar ve daha hızlı bir şekilde analiz yapılır. İyonların elektroforetik mobiliteleri, elektroforetik hız ve elektrik alanla doğrudan ilişkilidir [27].

Elektroforetik ayırım, sadece iyonların mobilitelerinin aralarındaki farkla mümkündür.

$$v = \mu_e E \quad (2.1)$$

$$v = \mu_e V L^{-1} \quad (2.2)$$

Burada,

v = iyonun hızı,

μ_e = elektroforetik mobilité

E = elektrik alan

V = uygulanan voltaj

L = kapiler uzunluğu

Elektirik kuvveti,

$$F_E = qE \quad (2.3)$$

Bir iyonun sürtünme kuvveti,

$$F_F = - 6\pi\eta r v \quad (2.4)$$

eşitliği ile verilir.

q = iyonun yükü

η = çözeltinin viskozitesi

r = iyonun yarıçapı

v = iyonun hızı

Elektroforez esnasında iki kuvvet de dengede olur.

$$F_F = - 6\pi\eta r v \quad (2.5)$$

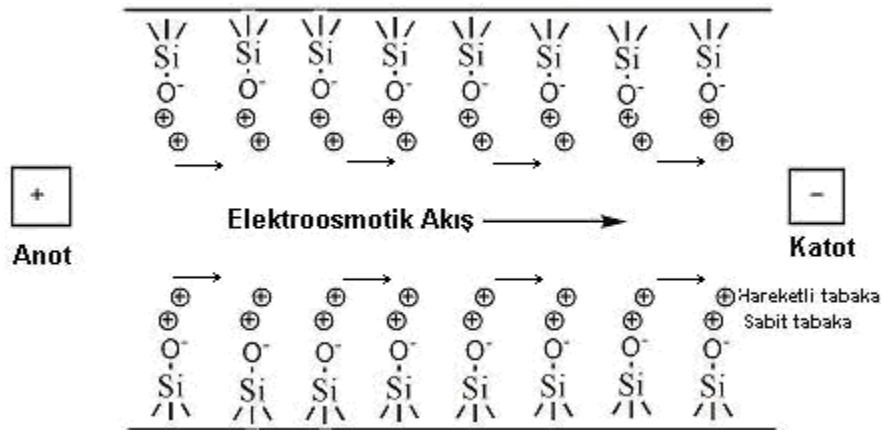
$$qE = 6\pi\eta r v \quad (2.6)$$

$$\mu_e = q/6\pi\eta r \quad (2.7)$$

Eşitliğe göre, mobilite taneciğin boyutu ile ters orantılı iken, taneciğin yükü ile doğru orantılıdır [27].

2.3.2. Elektroosmotik akış

Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır ve pH 3.0' ün üzerinde SiO^- ya iyonize olurlar. Elektroosmotik akışın nedeni, kapilerin iç çeperinde ayırma elektroliti ile SiO^- grupları arasında oluşan elektriksel çift tabakadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Kapiler duvarı çift tabakası [34].

Ayırma elektrolitindeki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşırlar. Çepere çok yakın olan pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve bu pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa EOF denir.

Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}), formül 2.8'de açıklanmaktadır.

$$v_{\text{EOF}} = E \cdot \mu_{\text{EOF}} \quad (2.8)$$

v_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı;

μ_{EOF} : Elektroosmotik mobilite;

E : Elektriksel alan kuvveti

Kapiler çeperine yakın olan hareketsiz tabaka ile merkeze yakın olan hareketli tabakanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir ve formül 2.9 ile gösterilir.

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (2.9)$$

δ : Difüzyon tabakası kalınlığı,

e : Yüzey alana düşen yük,

ε : Tamponun dielektrik sabiti

Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}) formül 2.10 ile gösterilebilir.

$$v_{EOF} = \varepsilon \xi E / 4 \pi \eta \quad (2.10)$$

η : Tamponun viskozitesi

Elektriksel alan altında tampon içindeki elektriksel yüklü maddeler elektroforetik hızla hareket ederler. Elektroforetik hız (v_{EOF}) formül 2.11'e göre hesaplanır.

$$v_{EOF} = E \mu_{EP} \quad (2.11)$$

v_{EP} : Elektroforetik hız,

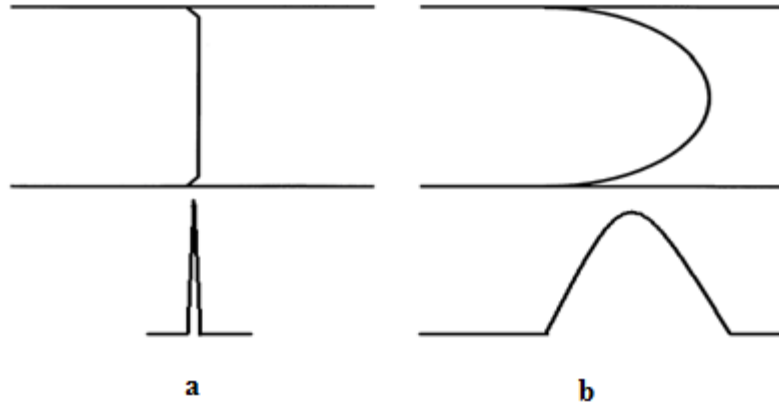
μ_{EP} : Elektroforetik hareketlilik

Maddeler kapiler boyunca farklı hızlarda hareket ettiklerinden ayırım gerçekleşir.

Elektroforetik hareketlilik formül 2.12'ye göre verilir.

$$\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta r \quad (2.12)$$

Elektroosmotik akışı iletken kuvvet kapiler içerisinde düzenli dağılmıştır. Herhangi bir basınç değişimi olmadığı için düz kesitli bir yığın akışına neden olur (Şekil 2.2a). Düz akış, analitlerin kapiler içinde dağılımına neden olmadığı için dik ve simetrik pikler elde edilir. İtici gücün dış basınç olduğu sıvı kromatografisinde ise parabolik kesitli bir akış gözlenir ve pik genişlemesine neden olur (Şekil 2.2b). CE'de akış profilinin düz olmasından ötürü ayırım etkinliği yüksektir [35-37].



Şekil 2.2: (a) Elektroosmotik düz akış, (b) Basınç ile sağlanan parabolik akış [34].

2.3.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler

Elektroosmotik akış hızına etki eden faktörler Çizelge 2.1’de verilmiştir [37].

Çizelge 2.1: Elektroosmotik akış hızına etki eden faktörler.

Ayrırma ortamındaki değişiklik	EOF'e etkisi
Tamponun pH değerinin artışı	EOF ↑
Elektrik alan artışı	EOF ↑
Tampon konsantrasyonu artışı	EOF ↓
Sıcaklık artışı	EOF ↑ (η değişimi nedeniyle)
Organik çözücü ilavesi	EOF ↓ (su fazında çalışıldığında)
Pozitif yüklü yüzey aktif madde ilavesi	EOF'un yönü terse çevrilir
Negatif yüklü yüzey aktif madde ilavesi	EOF ↑

2.3.3 Görünen mobilite ve göç süresi

Bir analitin detektöre ulaşana kadar geçirdiği süreye göç süresi (t) denir. Analitin görünen mobilitesi ise, göç süresi ve diğer deneysel veriler de kullanılarak hesaplanabilir [17].

$$\mu_g = l/(tE) = lL/(tV) \quad (2.13)$$

$$\mu_g = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (2.14)$$

V: Uygulanan voltaj

l: Kapilerin etkin uzunluğu

L: Kapilerin toplam uzunluğu

t: Göç süresi

E: Elektrik alan

Elektroosmotik akış varlığında ölçülen mobiliteye görünen mobilité (μ_a) denir. Elektroforetik mobilité (μ_e) ise EOF hızı belirlenerek hesaplanır. EOF'u ölçmek için formamid, aseton, mesitil oksit gibi kapiler duvarı ile etkileşmeyen bir bileşik seçilir.

Kapilerin etkin uzunluğu, kapilerin enjeksiyon noktasından dedekte edilen kısma kadar olan uzaklıktır.

2.3.4 Ayırma etkinliği

Ayırma etkinliği (N), teorik tabaka sayısı ile ifade edilir.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.15)$$

l = kapiler uzunluğu

σ = pikin standart sapması

Teorik plaka genişliği (HETP);

$$H = (l/N) \quad (2.16)$$

olarak ifade edilir.

N değeri, ayrılan piklerin elektroferogramı kullanılarak, genellikle cihazların veri değerlendirme programları ile hesaplanır. Ayrıca teorik plaka sayısı değeri bir elektroferogramdan da yararlanılarak belirlenebilir [27]. Bunun için kullanılan eşitlik formül 2.17'de verilmiştir.

$$N = 5,54 (t/ w_{1/2}) \quad (2.17)$$

T = göç süresi

$w_{1/2}$ = yarı yükseklikteki pikin genişliği

2.3.5 Pik genişlemesi

Enjekte edilen örneğe ait bantların genişleme olmadan dedektöre ulaşması istenir.

Pik genişlemesinin başlıca sebepleri şunlardır;

a) Boylamsal difüzyon: Analiz süresiyle ve difüzyon katsayısıyla doğru orantılı olup, molekül ağırlığıyla ters orantılıdır [34]. Aşağıdaki formül ile ifade edilir:

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (2.18)$$

D = analitin difüzyon katsayısı

t = pikin geliş süresi

b) Joule ısısı: Elektrik akımının geçişi ile üretilen ısıya joule ısısı denir. Sıcaklık artışı uygulanan voltaj ve tampon iletkenliğinin artışı ile artar. Sıcaklık değişimi akış profilini etkileyen bir viskozite değişimi meydana getirir. Sonuçta çözelti, kapiler duvarında kapiler merkezinde olduğundan daha yavaş bir şekilde göç edecektir. Kapiler duvarında viskozite yüksek, kapiler merkezinde ise viskozite düşük olur ve bu farktan dolayı pik genişlemesi ortaya çıkar [34,37].

c) Enjeksiyon uzunluğu: Örnek difüzyona sebebiyet vermeyecek şekilde, ince bir zon halinde sisteme injekte edilmelidir [37].

d) Örneğin duvar adsorpsiyonu: Kuyruklu piklere ve göç süresinin tekrarlanırlığının azalmasına sebep olur. Kapiler yüzeyinin analit moleküllerini adsorbe etme eğilimi, özellikle proteinler gibi makro moleküller için CE’de pik şekillerinde bozulmaya yol açabilir. Özellikle silika kapilerinin yüzeyinin negatif yüklü olmasından ötürü, pozitif yüklü proteinin kapiler duvarına adsorbe olması muhtemel bir hal alır [34, 35].

e) Elektrodispersiyon: Örnek iyonları, tampon çözeltinin iyonları ile aynı mobiliteye sahip olmadığından, göç eden çözelti onu çevreleyen tampon ile aynı elektriksel iletkenliğe sahip olmayabilir. Eğer örnek iletkenliği tamponunkinden büyükse, örneğin önde giden kısmı difüzyona uğrar ve pik önden kuyruklanır. İletkenlikler eşit ise, pikte herhangi bir kuyruklanma şekli gözlenmez [37].

2.3.6 Rezolüsyon

Rezolüsyon, iki pikin birbirinden ayrılmasının ölçüsü olarak bilinir. Bir ayırma yönteminde temel amaç, örnek bileşenlerinden elde edilen piklerin tam olarak birbirinden ayrılmasıdır. Rezolüsyon (R) aşağıdaki eşitlik ile gösterilir [34]:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (2.19)$$

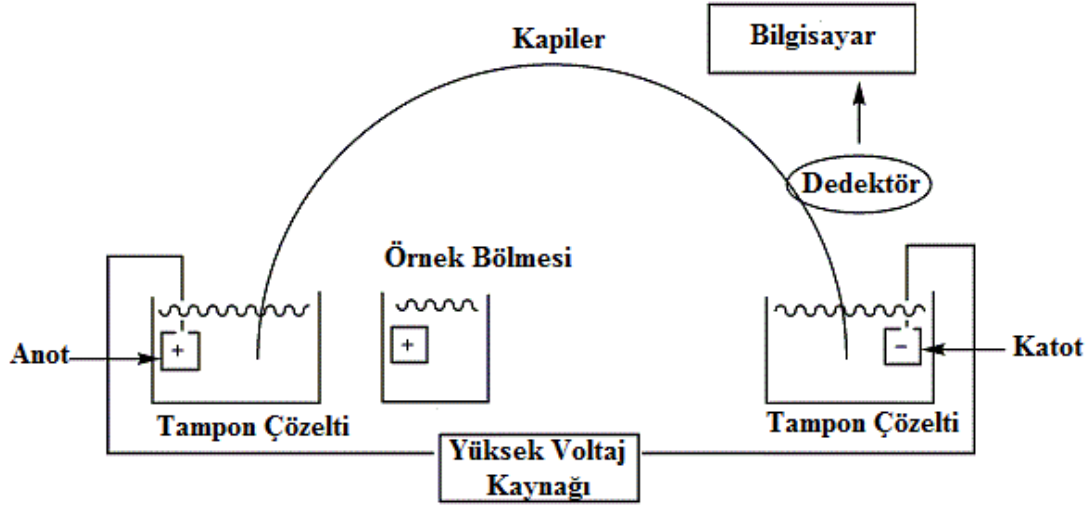
t = göç süresi

w = süre olarak pikin taban genişliği

2.4 Kapiler Elektroforez Cihazı

Tipik bir kapiler elektroforez cihazı, yüksek voltaj güç kaynağı, giriş ve çıkış tampon kapları, kapiler kolon, dedektör ve integratör veya bilgisayardan oluşmaktadır. Birçok sistemde kapilerdeki ısınmayı soğutmak ve kapiler sıcaklığını kontrol etmek için termostat bulunmaktadır. Kapilerin iki ucu, giriş ve çıkış tampon kaplarına

batırılır ve bu iki tampon kabında bulunan elektrotlar arasına dış kaynaktan yüksek voltaj uygulanması ile örnek, dar bir bant veya bölge olarak kapilerin bir ucundan (anot) enjekte edildiğinde diğer ucuna (katot) doğru harekete başlar ve bu uçta dedeksiyon gerçekleşir. Veriler, dedektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar şeklinde elde edilmektedir [38]. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi Şekil 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.3: Kapiler elektroforez cihazı [34].

2.4.1 Kapiler kolon

Eritilmiş silika en çok kullanılan kapiler materyalidir. Kapilerin dış kısmı koruyucu tabaka olarak poliimid ile kaplanmış olup, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplamanın bir kısmı bu bölgeden yakılarak kaldırılır ve dedeksiyon penceresi oluşturulur. Kapiler elektroforezde kullanılacak kapiler kolonun türü ve boyutu, analiz edilecek numune, analit, uygulanacak yöntem ve uygun analiz süresine göre seçilir. İdeal bir kapiler kolonun elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması, detektörle uyumlu olması, sağlam ve esnek olması gerekmektedir. Kapiler elektroforezde genellikle iç çapı 25-75 μm , dış çapı 350-400 μm , boyu ise 50-75 cm arasında olan eritilmiş silika kapiler kolon kullanılır. Kapiler kolon ilk defa kullanılacaksa 1 M NaOH, su ve ardından çalışma tamponu geçirilerek şartlandırılır. Şartlandırma işlemi ile kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı ve dolayısıyla EOF her analizde aynı olur [38].

2.4.2 Yüksek voltajlı güç kaynağı

Yüksek voltajlı güç kaynağı ile elektroforez için gerekli olan voltaj, akım ve güç sağlanmaktadır. Çoğu CE sisteminde, voltaj en fazla 30 kV'dur. Akım 300 μ A ve güç 6 W'a kadar uygulanabilir. Uygulanan voltaj ile elektrik alan meydana gelir. Formül 2.2'de de görüldüğü üzere voltaj değişimi elektrik alanı da etkiler. Elektrik alan değişimi ise göç zamanı ve alan tekrarlanırlılığının değişmesine sebep olur. Bazı durumlarda uygulanan elektrik alanın yönü değiştirilebilir [38].

2.4.3 Örnek enjeksiyonu

Kapiler elektroforezde tipik enjeksiyon hacmi 1-50 nL'dir. Örnek enjeksiyonu iki farklı şekilde yapılır.

a) Hidrodinamik Enjeksiyon

Hidrodinamik enjeksiyon CE'de en çok kullanılan enjeksiyon türü olup üç farklı şekilde yapılmaktadır. Bunlardan biri kapilerin enjeksiyon kısmına basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında basınç uygulandıktan sonra voltaj uygulanarak analize devam edilir. İkinci yolu kapilerin dedektör tarafına vakum uygulanmasıdır. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde ise enjeksiyon kabının yükseltilmesi ile sifon etkisi yaratılarak enjeksiyon yapılır. Hidrodinamik enjeksiyonda, enjeksiyon hacmi Poiseuille denklemi kullanılarak hesaplanabilir [39].

$$V = \Delta P \pi r^4 / 8 \eta L \quad (2.20)$$

ΔP = Kapiler boyunca basınç farkı (dyn.cm^{-2})

t = enjeksiyon süresi (s)

η = tamponun viskozitesi (dyn.s.cm^{-2})

L = kapilerin boyu

Sifon etkisiyle yapılan basınç farkı için;

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (2.21)$$

ρ = örneğin yoğunluğu (kg.m^{-3})

g = yerçekimi ivmesi katsayısı ($9,82 \text{ N.kg}^{-1}$)

Δh = Örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı (m)

Elektrokinetik enjeksiyonda örnek kabı ile çıkış tampon kabı arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak numune yüklenir. Örnek elektroosmotik akış ve iyonik göçün etkisi ile kapiler içine girer. Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik enjeksiyona göre daha azdır.

2.4.4 Dedektör

Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.2: CE’de kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri [37].

Dedektör	Dedeksiyon Limiti (mol/L)
UV absorpsiyon	$10^{-7} - 10^{-4}$
Floresans	$10^{-9} - 10^{-4}$
Lazer indüklenmiş floresans	$10^{-13} - 10^{-7}$
Amperometrik dedektör	$10^{-8} - 10^{-6}$
İletkenlik dedektörü	$10^{-7} - 10^{-5}$
Potansiyometrik dedektör	10^{-8}
Kütle spektrometre dedektörü	10^{-8}

2.4.4.1 UV dedektör

CE'de en sık kullanılan dedektörlerden biri UV dedektör olup tek bir dalgaboyunda veya dizi diyot ile geniş bir aralıkta birçok dalgaboyunda absorbands ölçümü yapılabilir. Analit tarafından absorplanan ışının miktarı Lambert-Beer yasası ile hesaplanır.

$$A = \epsilon cl \quad (2.22)$$

A: Absorbans

ϵ : Analitin molar absorptivitesi

l: Işın yolunun uzunluğu

Eşitlik 2.21'de görüldüğü gibi, belli bir konsantrasyondaki analitin absorpladığı ışının miktarı, ışın yolunun uzunluğuna bağlıdır. Kapiler elektroforezde, kapiler kolon dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için silika kapilerin dışındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakılarak veya kazınarak uzaklaştırılır ve dedeksiyon penceresi oluşturulur. Ancak bu durumda, ışın yolunun uzunluğu yaklaşık olarak kapilerin iç çapına (50-75 μm) eşittir. Bu da dedeksiyon hassasiyetini azaltarak analitin gözlenebilme sınırını kısıtlar. Hassasiyet 'z' veya baloncuk şeklinde dedektör

hücrelerine sahip kapillerler kullanılarak ışın yolunun uzunluğu arttırılması ile iyileştirilebilir. Ancak bu yöntem rezolüsyonun azalmasına neden olur. Duyarlılık, kütle spektrometri, lazer indüklenmiş floresans dedektör (LIF), amperometrik dedektör gibi daha hassas dedektörler kullanılarak da arttırılabilir. Ancak bunların da bazı dezavantajları vardır. Örneğin, doğal floresans olmayan maddelerin LIF dedektör ile tayininde zaman alıcı bir örnek türevlendirme işlemi gerekmektedir. Bunun yanı sıra, bu dedektörler birçok araştırma ve analiz laboratuvarları için pahalıdır. Dedeksiyon hassasiyetini arttırmanın diğer bir yolu ise sıvı-sıvı faz ekstraksiyonu (LLE) ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) gibi örnek zenginleştirme metodlarından birini kullanarak analitin konsantrasyonunu arttırmaktır. Ancak bu teknikler zaman alıcı birçok basamaktan oluştuğu için sistematik hatanın artma olasılığı fazladır. Kapiler elektroforezde, dedeksiyon hassasiyetini arttırmanın en kolay ve güvenilir yolu analitin kapiler içerisindeyken konsantrasyonunu arttırmaktır [40].

2.5 Kapiler Elektroforez Yöntemleri

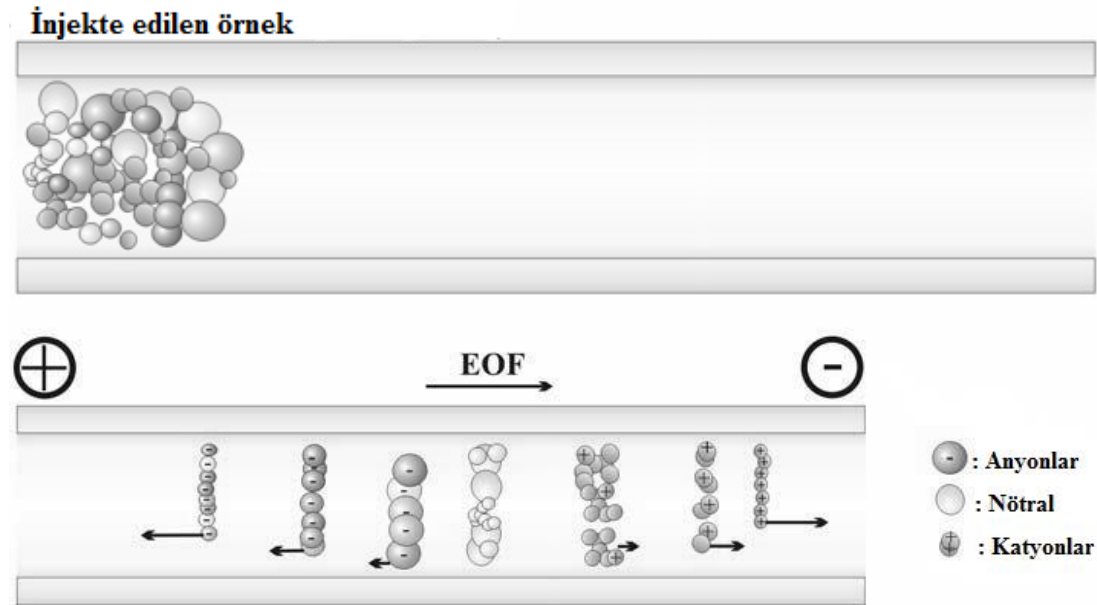
Kapiler elektroforezin benzer cihaz tasarımını kullanan, farklı analit türlerine uygulanabilen çok farklı modları vardır. Bu yöntemler ve ayırma esasları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.3: Kapiler elektroforez yöntemleri [36].

Yöntem	Ayrırmanın Temeli
Kapiler Zon Elektroforez	Analitlerin yük/büyükölük oranlarının farklılıkları
Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin ayırma tamponuna ilave edilen katkı maddesi ile farklı etkileşimi
Misel Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin misel ile farklı hidrofilik-hidrofobik etkileşimi
Kapiler Jel Elektroforez	Analitlerin büyükölük farklılıklarına göre jel gözeneklerinden geçişi
İzoelektrik odaklanma	Analitlerin izoelektrik nokta farklılıkları
İzotakoforez	Analitlerin yük/büyükölük oranlarının farklılıklarının farklı mobilitedeki iki tampon arasında gerçekleşmesi
Elektrokromatografi	Analitlerin kapiler içine doldurulan sabit faz ile sıvı faz arasındaki dağılım farkı

2.5.1 Kapiler zon elektroforez

Bu çalışmada nitrat ve nitrit iyonlarının ayrılmasında CE in en basit ve yaygın modu olan kapiler zon elektroforez (CZE) yöntemi kullanılmıştır. CZE’de ayırma yukarıdaki başlıklarda açıklanan prensiplere göre analitlerin yük/büyüklik oranlarının farklı olmasına dayanır. Örnek çözelti, kapiler içine dar bir zon halinde genellikle pozitif kutup yönünden verilir. Detektör negatif elektrot yakınına yerleştirilir. Pozitif yüklü iyonlar kendi elektroforetik mobiliteleri ile negatif elektrot yani detektör yönüne yönlenirken, negatif yüklü iyonlar kendi elektroforetik mobiliteleri ile enjeksiyon yönüne yani pozitif elektrota doğru hareket ederler. Ancak önceki bölümlerde açıklandığı gibi kolon içinde negatif elektrot yönüne doğru oluşan güçlü EOF nedeniyle tüm türler negatif kutba yani detektör yönüne doğru sürüklenirler. Bu göç esnasında yük/büyüklik farklılıkları oluşursa ayırım gerçekleşir ve detektöre farklı zamanlarda ulaşarak detekte edilirler. CZE ile ayırmanın temeli şekil 2.3’de gösterilmiştir [41].



Şekil 2.4:CZE’de ayırım [41].

Küçük anorganik anyonlar ve küçük organik asitlerin kendi elektroforetik mobiliteleri çok yüksek olduğu için bunlar EOF bunları sürüklemekte zorlanır. Bu nedenle daha önceki bölümlerde açıklandığı gibi bu iyonlar pozitif kutup yerine negatif kutup tarafından enjekte edilirler. Bu durumda detektör pozitif kutup yönündedir. Ya kapiler duvarını pozitif yüklerle kaplayarak kapiler içindeki EOF un yönü değiştirilerek iyonların ve EOF’un aynı yönde olması ya da düşük pH larda

çalışılarak ve EOF'un hızı azaltılarak anyonların EOF'a karşı hareket etmesi sağlanır. Bu çalışmada ayrılan nitrat ve nitrit iyonları küçük anyonlar olduğundan ayrılmaları için EOF'un hızı düşürülmüştür.

2.6 Örnek Sıkıştırma Metodu

2.6.1 Temel Prensipleri

İdeal bir ön zenginleştirme işlemi rezolüsyon kaybı olmaksızın hassasiyetin artırılmasına dayanmaktadır. CE'de örnek sıkıştırma teknikleri bu iki prensibi temel olarak oluşturulmuştur. CE'de örnek injeksiyonu nL boyutundadır. Uygulanan 30 kV civarında voltaj ile ayırma zamanı çok kısa olduğundan çok ince bir zon olarak injekte edilen örnek zon genişlemeye zaman bulamadan çok dik pikler halinde görülür. Yüksek hacimde örnek injeksiyonu genişlemiş ve overload olmuş piklere sebep olur. Örnek sıkıştırma yöntemleri ile geniş bir zon halinde injekte edilen örnek dedektöre ulaşmadan sıkıştırılarak dik pikler elde edilir ve dedeksiyon hassasiyeti önemli ölçüde artırılır [26].

Simpson et al. [40] örnek sıkıştırma metodunun prensibini, iki çözelti arasındaki elektrik alan farkına dayandırmıştır. Bu elektrik alan farkı ile çözeltiler arasında iletkenlik farkı meydana gelir. Analitin elektroforetik mobilitesi eşitlik 2.23'de verilmiştir:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \mu_{ep} V / L \quad (2.23)$$

E: elektrik alan kuvveti

L: kapiler uzunluğu

Bu eşitliğe göre kapiler içerisinde elektrik alan kuvveti homojendir. Analitin örnek sıkıştırma metodu ile hassasiyetinin artırılması için kapiler boyunca elektrik alan farkı yaratılmalıdır. Farklı elektriksel iletkenliğe sahip iki bölge arasında, iyonların elektroforetik hızlarının oranı eşitlik 2.24'de gösterilmiştir:

$$\gamma = v_{ep1} / v_{ep2} = E_1 / E_2 = \rho_1 / \rho \quad (2.24)$$

Bu eşitlikte γ , iyonların elektroforetik hızlarının oranı ve ρ , özdirençtir. 1 ve 2 alt indisleri ise örnek zon ve ayırma tamponu gibi iki ayrı bölgeye işaret etmektedir [40].

Ayırma tamponunun kondüktivitesi artırılarak bu bölgede elektrik alan azaltılır. Buna karşılık örnek bölgesindeki kondüktive azaltılarak elektrik alan artırılır. Normal kapiler elektroforezde kullanılan injeksiyon hacmi artırılır. İnjesiyon bölgesinde yüksek elektrik alan altındaki iyonlar hızla hareket ederler. Elektrik alanın düşük olduğu ayırma tamponu bölgesine ulaştıklarında aniden hızları düşer ve örnek zonu ile tampon bölgesi arasında sıkışarak konsantre olurlar. Bu şekilde konsantre olan diğer bir deyişle sıkışan analitin konsantrasyonu, $C_{\text{sıkışan}}$, formül 2.25'de verilmiştir [40].

$$C_{\text{sıkışan}} = C_{\text{injekte edilen}} \gamma \quad (2.25)$$

$C_{\text{injekte edilen}}$, injekte edilen analitin başlangıçtaki konsantrasyonu olup, öz direnç ayırma elektrolit konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Kapiler içinde tekrar homojen bir elektrik alan sağlamak için gerekirse elektrik alanın yönü değiştirilerek, konsantre örnek zonu dışında kalan seyreltik örnek bölgesi EOF ile birlikte kapiler dışına atılmalıdır. Bu bölümde anlatılan, normal örnek sıkıştırma metodu uygulama kolaylığı ve geniş kullanım alanı ile en yaygın örnek sıkıştırma metodudur [40]. Diğer örnek sıkıştırma metotları, sıkıştırma faktörleri ve LOD değerleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4: Örnek Sıkıştırma Yöntemleri [26].

Yöntem	Sıkıştırma Faktörü	LOD
FASS	10-100	$\mu\text{g/mL}$
LVSS	100-1000	$\mu\text{g/mL}$
M-FASI	100-10.000	ng/mL
HC-FASI	100-10.000	ng/mL
EKS	10.000-1.000.000	ng/mL-pg/mL

2.6.2 Örnek sıkıştırma metodu uygulamaları

Kapiler elektroforezde örnek sıkıştırma metodunun farklı uygulama alanları [40]:

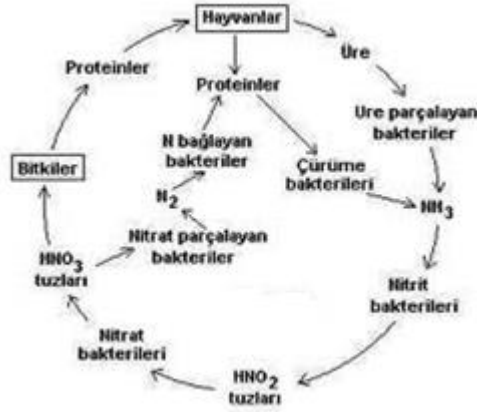
1. Biyolojik uygulamalar: Temel biyolojik araştırmalar, biyomedikal ve klinik araştırmalar
2. Çevresel uygulamalar: Kimyasal kontaminantlar, anyonik/katyonik türler gibi çevresel örnek bileşenleri
3. Gıda analizleri: Gıdalarda ve içeceklerde kalite-kontrol analizleri

4. Farmasötik uygulamalar: İlaç kalite-kontrolü ve araştırma-geliştirme, canlılardaki biyoaktif bileşikler
5. Toksikolojik uygulamalar: Psikotropik ilaçlar, toksik bileşikler ve türevleri

3. NİTRİTLER VE NİTRATLAR

3.1 Nitratlar ve Nitritlerin Genel Özellikleri

Nitratlar ve nitritler azot döngüsünün (Şekil 3.1) nitrifikasyon aşamasında azot tutucu bakteriler aracılığıyla doğal olarak oluşan, suda yüksek çözünme özelliğine sahip inorganik iyonlardır [42]. Azot döngüsündeki kimyasal reaksiyonlar Çizelge 3.1'de toplu halde verilmiştir.



Şekil 3.1: Azot döngüsü [43].

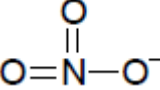
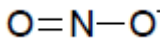
Çizelge 3.1 Azot döngüsünde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar [42].

Azot fiksasyonu:	$N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$
Amonifikasyon:	$NH_3 + O_2 + 2e^- \rightarrow NH_2OH + H_2O$ $NH_2OH + H_2O \rightarrow NO_2^- + 5H^+ + 4e^-$
Nitrit oksidasyonu:	$NO_2^- + 1/2O_2 \rightarrow NO_3^-$
Amonyak oksidasyonu:	$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$
Denitrifikasyon:	$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO + N_2O \rightarrow N_2$ $2NO_3^- + 10e^- + 12H^+ \rightarrow N_2 + 6H_2O$

Başlıca nitrat kaynakları gübre ve kanalizasyon olmakla birlikte, doğal sulardaki azot içeren materyallerin çoğu nitrata dönüşüm gösterir. Toprak, mineral depozitleri, deniz suyu ve atmosfer de nitratların diğer kaynakları olup, nitratlar bu kaynaklar

sayesinde çevrede doğal olarak bulunabilmektedir [44]. Nitrat ve nitritin kimyasal yapıları ve özellikleri Çizelge 3.2’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 3.2: Nitrat ve nitritin özellikleri.

	Molekül Formülü	Kimyasal Yapı	Molekül Ağırlığı	pKa
Nitrat	NO ₃ ⁻		62,005 g/mol	1,3
Nitrit	NO ₂ ⁻		45,995 g/mol	3,4

3.2 Gıdalarda Nitrit ve Nitratlar

3.2.1 Doğal olarak yapısında nitrit ve nitrat içeren gıdalar

Nitrat ve nitritler azot döngüsünün doğal bir sonucu olarak çevrede yaygın olarak bulunan iyonlardır. Ayrıca, 1900'lerin başından itibaren, nitrat, tarımda özellikle suni gübre olarak kullanılmaktadır. Sebzelerdeki nitrat ve nitrit miktarı sebzenin cinsine, üretim metoduna, gübre kullanımına ve mevsime bağlı olarak değişmektedir [45]. Çizelge 3.3'de nitrat ve nitritlerin bulunduğu bazı sebze ve meyveler ile nitrit ve nitrat miktarları verilmiştir. Nitrat ve nitritin birarada veya ayrı ayrı bulunduğu diğer gıdalar ve Food Standard Agency tarafından bildirilen ortalama değerleri Çizelge 3.4'de verildiği gibidir.

Çizelge 3.3: Bazı sebze ve meyvelerdeki nitrat ve nitrit içerikleri [46].

	Nitrat (mg/100g)	Nitrit (mg/100g)
Meyve		
Elma	0,3	0,008
Muz	4,5	0,009
Portakal	0,8	0,02
Sebzeler		
Brokoli	39,5	0,07
Havuç	0,1	0,006
Lahana	55,9	0,07
Patates	2,0	0,17
Hardal otu	116,0	0,003
Ispanak	741,0	0,02
Domates	39,2	0,03

Çizelge 3.4:Bazı gıdalardaki nitrat ve nitrit miktarları [47].

	Nitrat (mg/kg)	Nitrit (mg/kg)
Tahıl	7,2-11,0	1,8
Süt	3,9-5,3	
Sütlü ürünler	27,0	
Yumurta	4,4-5,4	
Balık	5,0-19,0	<0,6

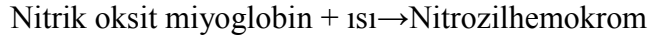
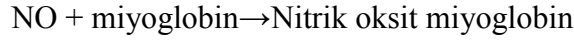
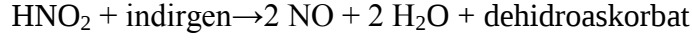
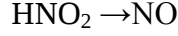
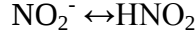
3.2.2 Gıda katkı maddesi olarak yapısında nitrit ve nitrat bulunan gıdalar

Et ve balık ürünlerinin tuzlanması antik çağlarda önemli bir saklama ve koruma yöntemi olarak kullanılmıştır. Doğal tuzun yapısında bulunan sodyum/potasyum nitrat ve nitrit bileşiklerinin etin muhafaza edilmesinden doğrudan sorumlu olduğu ortaya konulmuştur [48]. Günümüzde et ürünlerinde lezzet geliştirme, renk oluşturma ve dayanma süresini uzatmak amacıyla etin tuz, renk sabitleyici (nitrat, nitrit, askorbik asit) ve baharat gibi katkılarla muamele edilmesine kürleme denir. Et ürünlerine tuz, tatlandırıcılar ve nitritin ilave edilmesiyle gerçekleştirilen kürleme işlemi ile ürüne kendine has renk, aroma ve tekstür özellikleri kazandırılır [49, 50].

Nitrit, Clostridium Botulinum sporlarının gelişimini inhibe eden antimikrobiyal ajan işlevi görür. Bunun için 40-80 ppm nitritin yeterli olduğu bildirilmiştir [51]. Aynı zamanda lipidlerin oksidasyon oranını düşürerek, ürünün raf ömrünün artmasını sağlar. Nitrit kürlenmiş et ürünlerindeki parlak kırmızı rengin oluşmasından sorumludur ve et ürünlerinde lipid oksidasyonunu stabilize ederek oluşabilecek kötü lezzeti engeller. Sadece nitrat kullanılarak gerçekleştirilen kürleme işleminde, ilave edilen nitrat, indirgeyici bakteriler sayesinde nitrite dönüşür. Etin karakteristik pembe rengini koruyabilmesi için nitrat veya nitrit nitrozilhemokroma dönüşmelidir. Bu sürecin ilk basamağı, nitratın, nitrat indirgeyici bakteriler vasıtasıyla nitrite indirgenmesidir [52]. Bu, her ikisi de nitrat redüktaz enzimi üreten Micrococcaceae ailesinden Kocuria Varians ya da Staphylococcus ailesinden Staphylococcus carnosus bakterilerini içeren başlangıç kültürleri ile sağlanır [53]. Oluşan nitrit, nitroz asit ile dengededir. Reaksiyon, nitroz asidin nitrik aside çevrilmesi yönüne itilir. Eritorbat ve askorbat gibi indirgeyicilerin varlığında nitrik oksit oluşumu hızlanır [54]. Daha sonra, nitrik oksit miyoglobindeki demire bağlanır ve parlak kırmızı renk pigmentine sahip, kararsız bir molekül olan nitrik oksit miyoglobin üretilir [55]. Et ürününün minimum 65.6°C'ye ısıtılması ile nitrik oksit miyoglobindeki globin denatüre olur ve kürlenmiş ete kalıcı pembe rengini veren nitrozilhemokrom meydana gelir [56].

Çizelge 3.5: Kürlenmiş et ürünlerinde meydana gelen reaksiyonlar [56].

Bakteriyel indirgenme: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$



Pastırma, sucuk, jambon, salam ve sosis gibi gıda maddeleri, kendine has tadı, rengi, uzun raf ömrü ile yaygın tüketilen kürlenmiş et ürünleri arasındadır. Bu ürünlerde bulunan ortalama nitrat ve nitrit değerleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

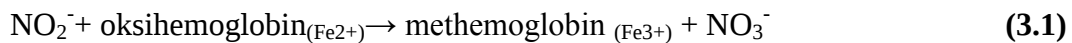
Çizelge 3.6: Bazı kürlenmiş et ürünlerindeki ortalama nitrat ve nitrit değerleri [57].

	Nitrat (mg/100 g)	Nitrit (mg/100 g)
Sucuk	5,5	0,38
Sucuk (nitritsiz)	3	0,68
Jambon	0,9	0,89
Sosis	9	0,05
Domuz filetosu	3,3	0

3.3 Nitrit ve Nitratların Sağlık Üzerine Etkileri

3.3.1 Methemoglobinemi

Kandaki hemoglobin, dokulara oksijen taşıma görevini üstlenmektedir. Nitratların indirgenmesiyle oluşan nitrit, hemoglobinin yapısında değişiklik meydana getirerek, methemoglobine dönüştürür. Bu kimyasal tepkime 3.1'de gösterildiği gibidir. Methemoglobin oksijene bağlanamaz ve kanın akciğerlerden dokulara oksijen taşıma kapasitesini düşürür veya yok eder. Bunun sonucunda çocuklarda ‘mavi bebek sendromu’ olarak da bilinen methemoglobinemi meydana gelir [58].



6 aylığa kadar olan bebeklerde methemoglobinemiye karşı duyarlılık, mide asiditesinin yüksek olmasından ötürü daha fazladır. Çünkü bu asidik ortam, nitratların nitrite dönüşüm oranını arttırır [58].

Methemoglobinemi riski altındaki bir diğerk grup ise hamile kadınlardır. Hamileliğin 30. haftasından sonra kanın methemoglobin seviyesinde artış gözlenir ve doğal olarak nitratlara karşı duyarlılık artar. Bunun sonucunda doğuştan sakatlıklar ve düşükle sonuçlanan doğumlar meydana gelir [59].

Methemoglobineminin semptomları arasında, nefes almada zorluk, baş ağrısı, baş dönmesi, enerji kaybı, kusma, ishal, ciltte mavi-gri renk değişimi görülür. Genellikle geçici olan bu kan hastalığı tedavi edilemediği takdirde kalıcı beyin hasarına ve ölüme yol açmaktadır [58].

3.3.2 Karsinojenik etkileri

Et ve balık gibi gıdaların içinde yer alan nitritler sindirim sonrası midede, hayvansal ürünlerdeki sekonder aminlerle birleşerek nitrozaminleri oluşturur. Nitrozaminlerin karsinojenik, mutajenik ve teratojenik tesirli olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Gıdalarla yüksek miktarda nitrat ve nitrit alımı ile kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar pankreas, mide, lenf ve bağırsak kanseri ile doğrudan bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur [60].

3.3.2.1 Nitrozamin oluşumu

Nitritlerle birleşerek nitrozaminleri meydana getiren sekonder aminler proteinlerin parçalanma ürünlerinden kaynaklanmaktadır. Bakteriler, ortamın pH değeri ve sıcaklık (100-185 °C) da nitrozamin oluşumunda rol oynayan etkenlerdir [60]. Kürlenmiş etlerin pH değeri normalde nitrozamin oluşumuna pek uygun olmamasına rağmen, kızartma gibi yüksek sıcaklıklarda bu ürünlerde nitrosoprolidin oluşumu gözlenmektedir [50]. Nitrozamin oluşumunda gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sadece sekonder aminler kararlı nitrozaminleri oluşturur. Primer aminler anında alkol ve azota indirgenir, tersiyer aminler ise reaksiyon vermez.

N-Nitrosodipropilamin, N-Nitrosodietilamin, N-Nitrosodipropilamin, N-Nitrosopirrolidin, N-Nitrosopiperidin, N-Nitroso-N-metil-üre, N-Nitrosodietanalamin, N-Nitrososarcocin, N-Nitrosoprolin, N-Nitrososarcocin başlıca nitrozaminler arasındadır [50, 61].

Çizelge 3.7: Nitrözamin oluşumunda meydana gelen kimyasal reaksiyonlar[62].

(M/M ⁺ , Fe/Fe ⁺² vb. gibi geçiş metal iyonlarıdır)	
	$\text{NaNO}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{Na}^+$
	$\text{HNO}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}$
	$2\text{HNO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$
	$\text{N}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{NO} + \text{NO}_2$
	$\text{NO} + \text{M}^+ \rightarrow \text{NO}^+ + \text{M}$
Primer amin:	$\text{RNH}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{RNH-N}=\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ROH} + \text{N}_2$
Sekonder amin:	$\text{R}_2\text{NH} + \text{NO}^+ \rightarrow \text{R}_2\text{N-N}=\text{O} + \text{H}^+$
Tersiyer amin:	$\text{R}_3\text{N} + \text{NO}^+ \rightarrow \text{nitrozamin oluşmaz}$

3.4 Balık Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit

Balıklar sahip oldukları nötral pH ve içerdikleri yüksek oranda nem ve serbest aminoasitlerle mikrobiyal bozulmalara açıktır. Balık ürünlerinde balığın yapısında bulunan aminoasitlerin mikroorganizmalar tarafından dekarboksilasyonu sonucu biyogenik aminler oluşmaktadır [22]. Uskumru, ton balığı ve sardalya gibi balıklarda histamin, putresin, kadaverin gibi pek çok farklı biyogenik amin tespit edilmiştir [63]. Histamin, kadaverin ve putresin gibi biyogenik aminler, gıdalarda ve özellikle balıklarda tazelik ve bozulma indikatörü olarak değerlendirildiği için önem taşımaktadır [22]. Balıkta bakteriyel bozulmanın başlamasıyla putresin ve kadaverin üretiminin sürekli olarak artmaya başladığı [63] ve bu aminlerin histaminin toksisitesini arttırdığı bildirilmiştir [64].

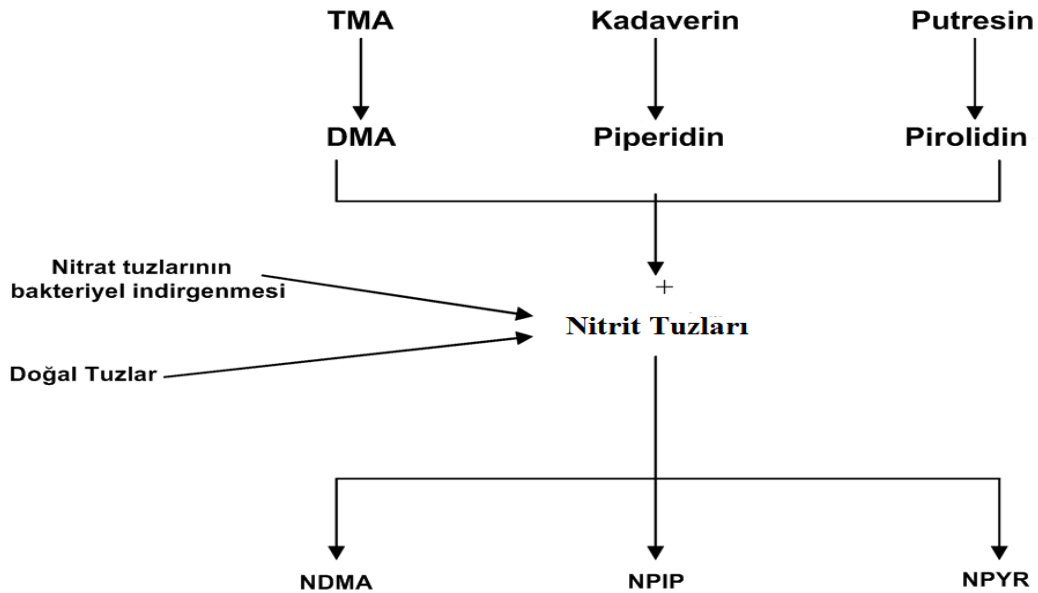
Balığın yapısında önemli miktarda nitrit ve nitrat bulunmamasına rağmen, balık ürünlerinde kullanılan doğal tuzda önemli miktarda nitrat ve nitrit tuzları olduğu bilinmektedir. Balık, biyogenik amin içeriyorsa, nitrit ve biyogenik aminler arasındaki reaksiyonla nitrözamin oluşumu gerçekleşmektedir. Buna rağmen, balık ürünlerinde nitrözamin oluşumu ve bu oluşumu etkileyen faktörler aydınlatılamamıştır [21]. Güney Çin’de yapılan bir çalışma [66], artan üst yutak kanseri vakalarının yüksek miktarda nitrözamin içeren tuzlanmış balık tüketimi ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Japonya’da yapılan çalışmalar da havyar, kurutulmuş balık ve tuzlanmış balık tüketiminin artan gastrit kanseri riski ile doğrudan ilgili olduğunu göstermektedir [67, 68].

3.4.1 Balık aminlerinin nitrozlaşması

Nitrözaminler daha önce de belirtildiği gibi uygun koşullarda sekonder aminlerle nitritler arasındaki reaksiyonla meydana gelir. Özellikle dimetilamin (DMA) gibi sekonder aminler ve trimetilamin (TMA) gibi tersiyer aminler nitrözamin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Tuzlanmış, tütsülenmiş, konserve ve salamura balık ürünlerinde DMA ve nitritin reaksiyona girmesiyle nitrozodimetilamin (NDMA) oluşumu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [69, 70].

Putresin ve kadaverin gibi primer aminler sıcaklık etkisiyle, nitrit ile reaksiyona girerek nitrözamin oluşturan pirolidin ve piperidin gibi sekonder aminlere dönüşmektedir [71, 72]. Nomura et al. [73] piperidinin in vitro olarak kadaverinden meydana geldiğini bildirmiştir. Warthesen et al. [72] ise putresinin nitritle nitrozopirolidin (NPYR), kadaverinin ise nitrozopiperidin (NPIP) meydana getirdiğini bildirmiştir.

NDMA, NPYR ve NPIP'in karsinojenik etkileri pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur [74-76]. Balıklardaki aminlerin nitrozlaşması şekil 3.2'de görüldüğü gibidir. Bazı balık ürünlerindeki nitrözamin seviyeleri ise Çizelge 3.7'de verilmiştir.



NDMA=Nitrozometilamin NPIP:Nitrozopipenidin NPYR:Nitrozopirolidin

Şekil 3.2: Balıklardaki aminlerin nitrozlaşması [21].

Çizelge 3.8: Bazı balıklardaki nitrozamin miktarları.

Balık	Nitrozamin seviyesi, µg/kg			Kaynak
	NDMA	NPIP	NPYR	
Tuzlanmış balık (Çin)	322.92	-	-	[77]
Fermente balık (Tayvan)	7.95	8.7	12.2	[75]
Kurutulmuş balık (Kuzey Kore)	1.2	-	-	[78]
Konserve balık (Polonya)	8.21	-	-	[75]
Tuzlanmış ringa balığı (Estonya)	1.2	0.42	0.91	[79]
Salamura ringa balığı (Estonya)	1.12	1.3	2.1	[79]

3.4.2 Balıklarda nitrozamin oluşumunu etkileyen faktörler

Yapılan in vitro çalışmalar nitrit, sıcaklık, pH ve sodyum klorürün balıklarda nitrozamin oluşumunu etkilediğini ortaya koymasına rağmen, bu faktörlerin etkileri hakkındaki in-vivo çalışmalar yok denecek kadar azdır. Balığın cinsi, işlenme öncesi balığın kalitesi ve proses aşaması gibi nitrozamin oluşumunu etkileyebilecek diğer faktörler hakkındaki çalışmalar yine çok azdır [21].

Sodyum nitrit gibi nitrit tuzları balık ürünlerinde nitrozamin oluşumunu etkileyen en önemli faktördür. Nitritler, balık ürünlerinde ilave katkı maddesi olarak kullanılmamasına rağmen, tuzlanmış balıklarda kullanılan ham tuz aracılığıyla veya nitratların bakteriyel indirgenmesi ile üründe bulunabilir [21]. Pek çok gelişmekte olan ülkede balıkların tuzlanmasında kullanılan kaya veya deniz tuzunun 28-249 mg/kg nitrat ve 0,1-0,5 mg/kg nitrit içerdiği tespit edilmiştir [80]. İşlenmiş tuz ile muamele edilen balıklardaki NDMA seviyeleri 24-40 µg/kg arasında değişirken, katkısız tuz ile muamele edilen balıklarda bu seviye sadece 6-7 µg/kg arasındadır [81].

3.5 Kapiler Elektrophorez Yöntemiyle Nitrit ve Nitrat Tayinlerine İlişkin Literatür İncelemesi

Merusi ve grubu [82], nitrit, nitrat ve okzalatlara kapiler zon elektrophorez yöntemi ile birarada tayini için yeni bir yöntem geliştirmiştir. Asidik ortamda çalışarak, elektroosmotik akışın hızı azaltılmıştır. 50 mM fosfat tamponu (pH:2,5) en iyi ayırma ortamı olarak belirlenmiştir. Nitrit, nitrat ve okzalik asit için minimum deteksiyon sınırları sırasıyla, 0,8 mg/L, 0,3 mg/L ve 4,5 mg/L'dir. Yöntem, ıspanak, havuç ve pazıya uygulandığında, nitrat değerlerinin 77-1272 mg/kg, okzalik

değerlerinin 7848-19765 mg/kg arasında değiştiği, nitritin ise tayin limitinin altında kaldığı tespit edilmiştir.

Erim ve grubu [19], et ve sebze ürünlerinde nitrit ve nitratın yanyana tayini için yeni bir kapiler elektroforetik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin esası, kapiler kolonu pozitif yüklü bir polimerle kaplayarak, kapiler içindeki elektroosmotik akışın yönünü tersine çevirmeye dayanmaktadır. PEI kaplı kapilerde nitrit ve nitrat iyonu için ayırma 2.7 dakikada gerçekleştirilmiştir. Nitrit ve nitrat için minimum deteksiyon sınırları sırasıyla, 0,105 µg/mL ve 0,099 µg/mL'dir. Bu yöntem ile salam, sucuk, sosis ve jambonda nitrit ve nitrat tayini yapılmıştır. Sebze örneklerinde nitrit tespit edilememiş ancak ıspanak, maydanoz ve dereotunda nitrat miktarlarının yüksek olduğu görülmüştür.

Pereira ve grubu [83], bu çalışmada geliştirdikleri kapiler elektroforez yöntemini salam, sosis ve sucuk gibi et ürünlerindeki nitrit ve nitratın tayinine uygulamışlardır. Geliştirilen yöntemin esası ayırma ortamına kritik misel konsantrasyonundan düşük konsantrasyonda yüzey aktif madde katarak, kapiler içindeki elektroosmotik akışın yönünü tersine çevirmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, optimum ayırma ortamı olarak 0,2 mM CTAB içeren 60 mM tetraborat belirlenmiştir. Nitrit için LOD değeri, 0,15 mg/L iken, nitrat için 0,17 mg/L'dir. Farklı et ürünlerindeki nitrit değerleri 17,3-46,4 mg/kg; nitrat değerleri ise 69,9-198,1 mg/kg aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Della Betta ve grubu [18], nitrit ve nitratın birarada tayini için geliştirdikleri kapiler elektroforetik yöntem ile bu iki anyonu 0.5 dakika gibi kısa bir süreden az zamanda tayin etmişlerdir. Ayırma tamponu olarak pH:3,96'da 10 mM perklorik asit ve 40 mM β-alanin ile çalışılmıştır. LOD değerleri nitrat ve nitrit için sırasıyla 0.30 ve 0.49 mg/L'dir. Geliştirilen yöntem, 14 farklı bebek mamasında bu iki anyonun tayini için uygulanmıştır.

Alonso ve arkadaşları [84], silikat, nitrit, nitrat ve fosfatın birarada tayini için yeni bir kapiler elektroforez yöntem geliştirilmiştir. Ayırım, 0.2 mM TTAB içeren sodyum kromat tamponunda (pH:11), 10 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltiye katılan TTAB sayesinde kapiler içindeki elektroosmotik akışın yönü tersine çevrilmiştir. Tayin limitleri nitrit, nitrat, fosfat ve silikat için sırasıyla; 0.73, 1.13, 0.60 ve 1.32 µM'dir.

4.DENEYSEL KISIM

4.1. Malzeme ve yöntemler

4.1.1 Malzemeler

Formik asit, potasyum nitrat, sodyum nitrit, sodyum sülfat ve sodyum hidroksit Merck marka (Darmstadt, Almanya), asetonyril (ACN) ve hekzan J. T. Baker (Deventer, Hollanda) markadır. Tüm çözeltiler Elga Purelab Option-7-15 model sistemi ile edilen deiyonize su ile hazırlanmıştır.Çalışmada kullanılan balık örnekleri konserve ton balığı, konserve uskumru ve sardalyadır. Bütün balık örnekleri İstanbul'daki marketlerden temin edilmiştir.

4.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması

Stok nitrat ve nitrit standart çözeltileri konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde hazırlanmış ve 4⁰C'de buzdolabında saklanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri bu ana çözeltilerden deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

4.1.3 Balık örneklerinin hazırlanması

Balık örnekleri el blendırında parçalandıktan sonra 0.5 gramlık kısım 5 mL 75 ⁰C'deki deiyonize su ile ekstrakte edilmiştir. Süspansiyonlar 75 ⁰C'de 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda ve ardından 15 dakika ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Whatman No: 41 filtre kâğıdından geçirildikten sonra, kalan katı kısma aynı işlem tekrar uygulanmıştır. Toplanan süpernatantların önce hekzan ile yağı alınmıştır. ACN ile muamele edildikten sonra 10 mL hacme deiyonize su ile tamamlanmıştır.

4.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları

Ayrımlar Agilent kapiler elektroforez sisteminde (Waldbronn, Almanya) gerçekleştirilmiş ve UV detektör ile 210 nm'de dedekte edilmiştir. Veri eldesi ve değerlendirmesi Agilent ChemStation programında yapılmıştır. Ayrım -25 kV potansiyel uygulanarak 25 ⁰C'de, enjeksiyonlar 50 mbar basınçta 160 saniyede gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan silika kapiler kolon 50 μm iç çapına sahiptir ve Polymicro Technologies'den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir. Toplam uzunluğu 65 cm ve etkin uzunluğu 50 cm'dir. Yeni silika kapiler ilk kullanımda 1 M NaOH ile 30 dakika, su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Gün başlarında kapiler kolon 0,1 M NaOH ile 10 dakika, su ile 2 dakika ve tampon çözelti ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Enjeksiyonlar arasında 2 dakika 0.1 M NaOH ve 2 dakika su ardından 2 dakika süreyle tampon çözelti ile yıkama yapılmıştır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1 Metod Optimizasyonu

5.1.1 Tampon çözeltinin optimizasyonu

Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı üzere CE’de bütün iyonlar yüklerine bakılmaksızın güçlü EOF ile katoda ve bu yöne yerleştirilmiş detektöre doğru hareket ederler. Ancak nitrit ve nitrat gibi küçük anyonik türler güçlü elektroforetik mobilitelerinden dolayı katoda doğru sürüklenmekte zorlanırlar. Bu anyonların kapiler içerisinde hızlı bir şekilde hareket etmeleri bir yol için düşük pH’a sahip bir ayırma tamponu ile çalışmak ve EOF’un hızını düşürmektir. Elektrik alanın yönü tersine çevrilerek örnek injeksiyonu katottan yapılır. Böylece, bu anyonlar, düşük hızlı EOF’a karşı güçlü elektroforetik mobiliteleri ile hareket ederler.

Bu tez çalışmasında düşük pH’a sahip bir ayırma ortamı olarak formik asit/format tamponu seçilmiştir. Nitrit ve nitrat anyonlarının optimum rezolüsyonunu elde etmek için pH 3.5 ve 4.2 aralığında ön çalışmalar yapılmıştır. Nitrat iyonunun gelme süresinin pH değişikliğinden etkilenmediği görülmüştür. Ancak nitrit iyonunun gelme süresi ve dolayısıyla iki anyon arasındaki rezolüsyonun pH ile değiştiği görülmüştür.

Her iki anyonun da gelme süreleri ve rezolüsyon göz önüne alınarak 30 mM formik asit tamponunda pH 4.0 ile çalışmaya devam edilmiştir. Örnekler 50 mbar basınçla, 6 saniyede hidrodinamik olarak enjekte edilmiştir. Bu ayırma koşullarında balık örnekleri ile yapılan ilk denemelerde sadece nitrat anyonu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, gerçek örneklerdeki nitrit ve nitrat anyonlarının tayini için dedeksiyon limitini düşürerek hassasiyeti arttıracak bir örnek sıkıştırma yöntemi geliştirilmiştir.

5.1.2 Örnek sıkıştırma metodunun optimizasyonu

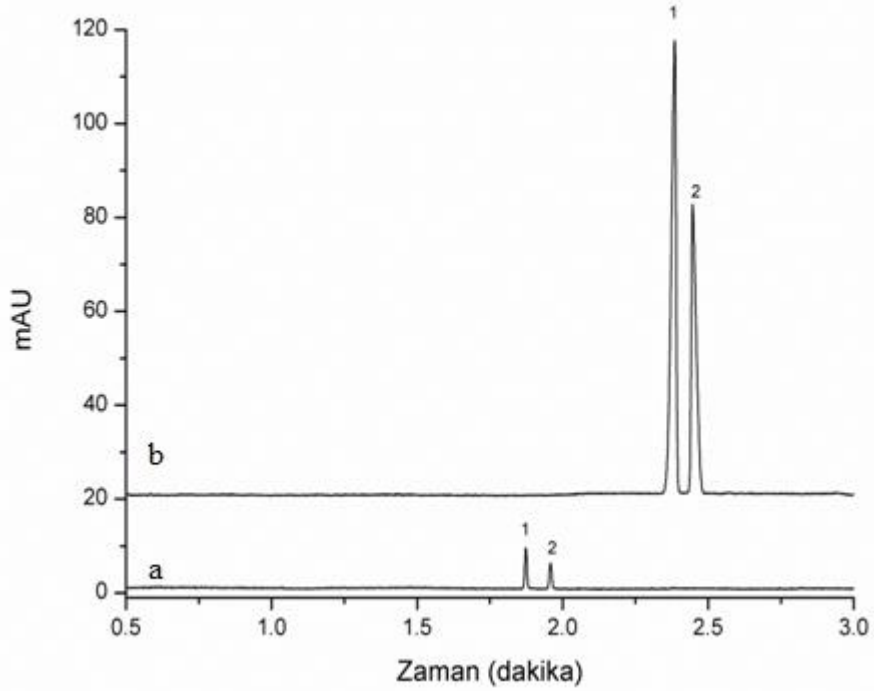
Bu çalışmada nitrit ve nitrat anyonlarının dedeksiyon limitlerini düşürmek için kapiler elektroforez-örnek sıkıştırma metodu uygulanmıştır. Normal kapiler elektroforezde kullanılan injeksiyon hacmi arttırılmıştır. Bölüm 2.8’de anlatıldığı

üzere, örnek sıkıştırma metodu ile geniş hacimde injekte edilen analit, tampon çözelti ile örnek bölgesi arasında sıkışarak dar ve dik pikler elde edilmiştir. Bu amaçla, ayırma tamponunun kondüktivitesi artırılarak örnek bölgesinden daha düşük birelektrik alana maruz kalmaları sağlanmıştır. Yüksek voltaj uygulandığında geniş hacimde injekte edilen nitrit ve nitrat anyonları yüksek elektrik alan altında hızla hareket ederler. Tampon çözelti ile örnek sınırına ulaştıklarında aniden yavaşlarlar ve konsantre olarak dar ve dik pikler halinde gözlenirler. Bu prensipten faydalanarak bu çalışmada tampon çözeltinin kondüktivitesini arttırmak için önceden optimize edilmiş 30 mM formik asit tamponuna sodyum sülfat ilave edilmiştir. Tampon çözeltiye farklı konsantrasyonlarda sodyum sülfat ilavesi sonucu 30 mM konsantrasyonda optimum şart sağlanmıştır.

Son olarak örnek injeksiyon süresi optimize edilmiştir. Örnekler 50 mbar basınç ile 60-280 saniye aralığında farklı sürelerde sisteme injekte edilmiştir. İnjesiyon süresi 160 saniyenin üzerine çıktığında iki anyon için de pik genişlemesi gözlenmiştir. Buna dayanarak optimum injeksiyon koşulları 50 mbar basınç ile 160 saniye olarak belirlenmiştir.

Bölüm 4.1.3’de anlatıldığı gibi, balık örnekleri hazırlanırken, balıktaki proteinleri çöktürmesi amacıyla asetonitril ilave edilmiştir. Aynı miktardaki asetonitril, ilk örnek sıkıştırma metodu denemelerinde standart nitrit ve nitrat çözeltilerine de ilave edilmiştir. Asetonitril düşük kondüktiviteye sahip olduğu için, örnekteki asetonitril varlığının sıkıştırma etkisini arttırdığı görülmüştür. ACN konsantrasyonun etkisi incelenmiş ancak artan ACN konsantrasyonun pik yükseklikleri veya pik şekillerinde herhangi bir değişime sebep olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak ayırma tamponu 30 mM formik asit ve 30 mM sodyum sülfat (pH:4.0) olarak belirlenmiştir. Örnekler 50 mbar basınçta 160 saniyede injekte edilmiştir. Normal kapiler elektroforez ile geliştirilen örnek sıkıştırma metodu karşılaştırılmıştır. Kapiler elektroforez-örnek sıkıştırma metodu ile her iki anyon için de dedeksiyon hassasiyetinin yaklaşık 30 kat arttırıldığı görülmüştür (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Örnek sıkıştırma yöntemi (b) ile düşük hacimde injeksiyonun (a) karşılaştırılması. İnjesiyon: (a) 50 mbar, 6 s; Tampon: 30 mM HCOOH, pH:4,0 (b) 50 mbar, 160 s; Tampon: 30 mM HCOOH, 30 mM Na₂SO₄, Dedeksiyon: 210 nm, Pikler: (1) Nitrat, (2) Nitrit.

5.2 Metod Validasyonu

5.2.1 Kalibrasyon doğrusu

En uygun koşullarda (30 mM formik asit ve 30 mM sodyum sülfat, pH:4,0) düzeltilmiş pik alanlarına göre nitrat için 4-24 µmol/L, nitrit için 4-18 µmol/L konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Nitrat ve nitrite ait kalibrasyon denklemleri sırasıyla $y=0.00846095x-0.0022946$ ve $y=0.00549769x+0.0013279$; korelasyon değerleri (r^2) ise sırasıyla 0,998 ve 0,999 olarak tespit edilmiştir.

5.2.2 Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği 8 µmol/L nitrat ve nitrit standartlarının aynı gün içinde ardarda yedi kez injeksiyonu ile kontrol edilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik için ise aynı standart üç farklı günde ardarda yedi kez injekte edilmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri düzeltilmiş pik alanları ve gelme zamanlarına göre Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1: Tekrarlanabilirlik sonuçları.

	% RSD Gelme Zamanı	% RSD Düzeltilmiş Alan (A/t)
	Gün İçi (n=7)	
Nitrat	1.23	0.99
Nitrit	1.31	2.74
	Günler Arası (n=21)	
Nitrat	1.60	0.93
Nitrit	1.25	2.29

5.2.3 LOD ve LOQ değerleri

LOD (dedeksiyon sınırı) değeri 2 farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün üç katı, LOQ (tayin sınırı) değeri ise on katı olarak hesaplanmıştır. Nitrat ve nitrit için LOD değerleri sırasıyla 0,55 µmol/L ve 0,82 µmol/L, LOQ değerleri ise sırasıyla 1,82 µmol/L ve 2,75 µmol/L olarak bulunmuştur.

5.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması

Balık örnekleri Bölüm 4.1.3’de anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 0.45 µm çapındaki mikrofiltrelerden geçirilerek direkt olarak sisteme injekte edilmiştir. Balık örneklerindeki nitrit ve nitrat miktarları Çizelge 5.2’de verilmiştir. Şekil 5.2’de, optimize edilmiş şartlar altında bir ton balığı ekstresine ait elektroferogram görülmektedir.

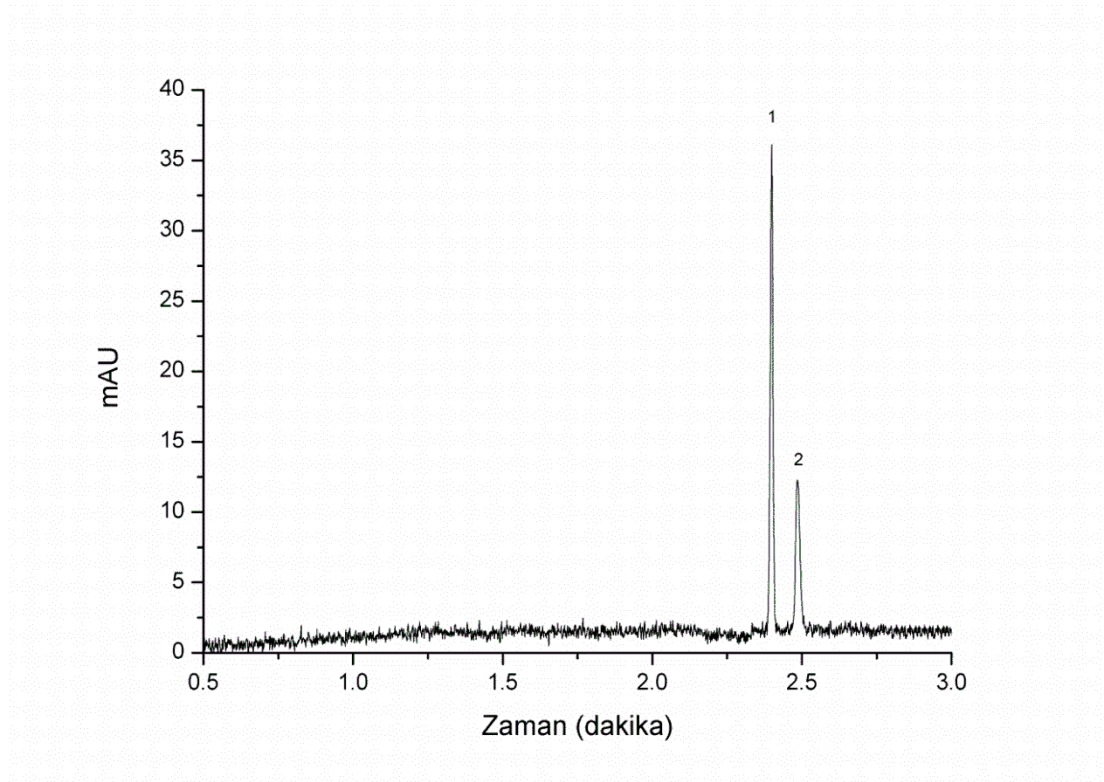
Çizelge 5.2: Balık örneklerindeki nitrat ve nitrit miktarları.

Örnek	Nitrat (mg kg ⁻¹ ± SD)*	Nitrit (mg kg ⁻¹ ± SD)*
T1	22.49±0.11	10.85±0.24
T2	20.09±0.39	11.78±0.36
T3	12.64±0.49	5.312±0.20
T4	6.971±0.22	-
T5	9.213±0.10	4.357±0.12
T6	11.81±0.16	6.375±0.14
U1	18.19±0.39	-
U2	17.39±0.34	-
S	11.88±0.08	6.063±0.13

*n=2

T: ton balığı,

U: uskumru, S:sardalya



Şekil 5.2: Bir ton balığı ekstresine ait elektroforegram. Tampon: 30 mM HCOOH, 30 mM Na₂SO₄, pH:4.0, İnjektasyon: 50 mbar, 160 s; Dedeksiyon: 210 nm, Pikler: (1) Nitrat, (2) Nitrit.

5.3.1 Metodun Doğruluğu

Geri kazanım çalışmaları, balık örneklerine üç farklı konsantrasyonda nitrat ve nitrit standartı eklenerek yapılmıştır. Geri kazanım sonuçları üç balık örneği için toplu olarak Çizelge 5.3’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 5.3: Balık örneklerine ait geri kazanım değerleri.

		Geri Kazanım (%)		
		Ton	Uskumru	Sardalya
Nitrat	50%*	93.69	97.12	95.48
	100%*	100.6	97.33	97.90
	200%*	98.77	98.26	93.77
Nitrit	50%*	96.12		90.25
	100%*	104.6		88.66
	200%*	97.53		92.47

5.4 Tartışma

Bu çalışmada, nitrit ve nitrat anyonlarının bir işlenmiş balık ürünleri içinden ayrımı ve kantitatif tayini için yeni bir kapiler elektroforez metodu geliştirilmiştir. CE’de normal injeksiyonla elde edilen deteksiyon limitlerinin konserve balık ürünlerindeki nitritin tayini için yeterli olmadığı görülmüştür. Ancak geliştirilen örnek sıkıştırma metodu ile deteksiyon limitleri 30 kat düşürülerek balık örneklerinde nitrit ve nitrat tayini bir arada yapılmıştır. Doğrusal kalibrasyon aralığı her iki anyon için de yüksek regresyonla belirlenmiştir. Yöntemin tekrarlanırlık değerleri CE için kabul edilen sınırlar içerisinde bulunmuştur. Çalışılan örneklerle yapılan geri kazanım sonuçları ile yöntemin doğruluğu ispatlanmıştır.

Geliştirilen örnek sıkıştırma yönteminin en büyük avantajı hiçbir ön zenginleştirme veya türevlendirme işlemleri uygulanmaksızın, basit bir ekstraksiyon işleminin ardından örneklerin kolona doğrudan enjeksiyonu sonucu ayırma işleminin etkinliği, kısa süresi ve yüksek hassasiyetidir. Ayrıca uzun ve zahmetli ön zenginleştirme işleminin ortadan kalkması ile kimyasal ekonomi de sağlanmıştır. Tampon bölgenin kondüktivitesini arttırmak amacıyla ayırma ortamına katılan sodyum sülfat ile tuzun olumsuz matriks etkisi ortadan kaldırılmıştır. Balık örneklerinde protein çöktürüldüğü için pikler daha temiz ve kısa sürede elde edilmiştir. Proteinin çöktürülmesi için örneğe ilave edilen ACN aynı zamanda, örnek bölgesindeki kondüktiviteyi azalttığı için sıkıştırma işleme katkıda bulunmuştur.

Bu çalışmada ilk defa bir kapiler elektroforez yöntemi ile balık ürünlerindeki nitrit ve nitrat miktarları tayin edilmiştir. Yöntem, gıda kalite kontrol laboratuvarlarında ve rutin analizlerde balık ürünleri ve diğer gıda ürünlerine kolaylıkla uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- [1]Erim, F. B. (2006). "Gıda Analizlerinde Yeni Bir Analitik Yöntem: Kapiler Elektroforez," Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- [2]Bernard, A. (2010). "The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact," *Nature Education Knowledge*,10, 25.
- [3]Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C. (2012). "Et ürünlerinde nitrat ve nitrite alternatif doğal kütleme maddeleri, " *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7, 46-58.
- [4] Acar, J.(1975). "Zum Problem der nitritbildung bei tiefgefrier-gemuseprodukten unter besonderer berücksichtigung der temperatur und der nitritbilden den mikroorganismen, diss. beim Fachbereich Umweltsicherung der Justus Liebig-Universitaet Giessen, Ills.
- [5] Klettner, P.G. (1979). "Verminderung der zugabe von nitrat und nitrit zu gökelfleischvaren,"*Fleischvirtschaft*,59, 178-181.
- [6] Turner, C.A. ve Keinbolz, E.W. (1964) "Nitrate toxicity," *Feedstufs*, 27, 28-3.
- [7]Kahraman, M. (1988). "Nitrat ve nitritin farelerde immunosupresif etkileri üzerine araştırmalar," *A.Ü.Vet. Fak.Derg.*
- [8]Kaya, S. (1987). "Yem ve yem hammaddeleri ile bazı biyolojik sıvılarda nitrit ve nitrat analizi," *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*,31,15-27.
- [9]Pirinçci, İ. ve Acet, A.(1984). "Yemlerde nitrat ve nitrit düzeyleriyle ilgili çalışmalar," *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*31, 41-52.
- [10] Tesch, J.W., Rehg, W. R. ve Sievers, R. E. (1976). "Microdetermination of nitrates and nitrites in saliva, blood. water and suspended particulates in air by gas chromatography," *J. Chromatography*, 112, 719-727.
- [11] Öztan, H. ve Vural, H. (1991). "Et ürünlerinde nitrozamin oluşumunun laktik asit bakterileri kullanımıyla önlenmesi," *Gıda*,16, 237-240.
- [12] Wirth, F. (1986). "Curing: colour formation and colour retention in frankfurter type sousages," *Fleischvirtschaft*,66, 354-358.
- [13]Anonim, (1990).Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. 20541 sayılı Resmî Gazete.
- [14] Moorcroft, M. J., Davis, J. ve Compton, R. G. (2001). "Detection and determination of nitrate and nitrite: a review,"*Talanta*, 54, 785-803.
- [15] Sadecka, J. ve Polonsky, J. (1999). "Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography A*, 834, 401-417.

- [16] **AOAC, Method 933.03.** (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- [17] **Alonso, M. C. B. ve Prego, R.** (2000). "Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis," *Analytica Chimica Acta*, **416**, 21-27.
- [18] **Betta, F. D., Vitali, L., Fett, R. ve Costa, A. C. O.** (2014). "Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in baby foods," *Talanta*, **122**, 23-29.
- [19] **Öztekin, N., Nutku, M. S. ve Erim, F. B.** (2002). "Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis," *Food Chemistry*, **76**, 103-106.
- [20] **Tanaka, Y., Naruishi, N., Fukuya, H., Sakata, J., Saito, K., ve Wakida, S.** (2004). "Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone electrophoresis and its application to the study of daily variations," *Journal of Chromatography A*, **1051**, 193-197.
- [21] **Al Bulushi, I. N., Poole, S., Deeth, H. C. ve Dykes, G. A.** (2009). "Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation: A review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**, 369-377.
- [22] **Başkan, S.** (2012). Akrilamid ve Biyogenik Aminler için Gıda Örneklerine Yönelik Kapiler Elektroforetik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi.
- [23] **Iammarino, M., Taranto, A. D. ve Cristino, M.** (2013). "Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring," *Food Chemistry*, **140**, 763-771.
- [24] **Karl H.** (1998). "Nitrate and nitrite content in edible part of fishes, crustaceans and molluscs," *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **94**, 17-20.
- [25] **Monser, L., Sadok, S., Greenway, G. M., Shah, I. ve Uglow, R. F.** (2002). "A simple simultaneous flow injection method based on phosphomolybdenum chemistry for nitrate and nitrite determinations in water and fish samples," *Talanta*, **57**, 511-518.
- [26] **Lian, D. S., Zhao, S. J., Li, J. ve Li, B. L.** (2014). "Progress in stacking techniques based on field amplification of capillary electrophoresis," *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 6129-6150.
- [27] **Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E. ve Yalçın, İ.** (2004). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
- [28] **Lee, I. S. L.** (2012). Development of Capillary Electrophoresis for the Analysis of Phenolics and Glucoraphanin in Brassica oleracea, Doktora Tezi, Edith Cowan University, Faculty of Computing, Health and Science School of Natural Sciences, Australia.
- [29] **Hijerten, S.** (1967). *Chromatographic Reviews*, **9**, 122-219.

- [30] **Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. ve Verheggen, T. P. E. M.** (1979). *Journal of Chromatography*, **169**, 11-20.
- [31] **Virtanen, R.** (1974) *Acta Polytechnica Scandinavica - Chemical Technology Series*, **123**, 1-67.
- [32] **Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. ve Verheggen, T. P. E. M.** (1979). *Journal of Chromatography*, **169**, 1-10.
- [33] **Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D.** (1981). *Analytical Chemistry*, **53**, 1298-1302.
- [34] **Uzaşçı, S.** (2011). Misel Elektrokinetik Kromatografi-LIF Yöntemiyle Şarap ve Nar Ekşisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini, Yüksek Lisans Tezi
- [35] **Li, S. F. Y.** (1992). *Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam
- [36] **Skoog, Holler, Nieman.** *Enstrümental Analiz İlkeleri*, 5. Baskı.
- [37] **Heiger, D.** (2000). *High Performance Capillary Electrophoresis*, CRC Press, USA.
- [38] **Büyükağa, M.** (2010). Bazı Benzoksolon Türevlerinin Asitlik Sabitlerinin Ultraviyole Spektroskopisi, Potansiyometri ve Kapiler Elektroforez Teknikleri ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi.
- [39] **Petr, J. ve Günther, B.** (1993). *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*.
- [40] **Simpson, S. L., Quirino, J. P. ve Terabe, S.** (2008). "On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications," *J. Chromatogr. A*, **1184**, 504–541.
- [41] **Fekete, A. ve Schmitt-Kopplin, P.** (2007). "Capillary electrophoresis," *Food Toxicant Analysis*, 561-597.
- [42] **Bernard, A.** (2010). "The nitrogen cycle: processes, players, and human impact," *Nature Education Knowledge*, **3**, 25.
- [43] **Url-1** <<http://biyolojidunyasi.net/ekoloji>> 30.11.2014
- [44] **Pokorny, L., Maturana I. ve Bortle, W.H.** (2006). "Sodium nitrate and nitrite. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th Ed., New York, John Wiley&Sons [Online version].
- [45] **Schuddeboom, L. J.** (1993). "Nitrates and nitrites in foodstuffs," *Council of Europe Press*.
- [46] **Hord, N. G., Tang, Y. ve Bryan, N. S.** (2009). "Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits," *Am J Clin Nutr*, **90**, 1-10.
- [47] **Food Standards Agency.** (1998b). Survey of Nitrite and Nitrate in Bacon and Cured Meat Products (Food Surveillance Information Sheet No.142), London.
- [48] **Parthasarathy, D. P. ve Bryan, N. S.** (2012). "Sodium nitrite: The cure for nitric oxide insufficiency," *Meat Science*, **92**, 274-279.
- [49] **Sindelar, J.J., Cordray, J.C., Sebranek, J.G., Love, J. A. ve Ahn, D.U.** (2007). "Effects of varying levels of vegetable juice powder and

incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham," *Journal of Food Science*, **72**, 388-395.

- [50] **Anar, Ş.** (2010). Et ve Et Ürünleri Teknolojisi. Dora Yayınları, Bursa.
- [51] **Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard D.E., Mills, E.W., Hedrick, H.B., Judge, M. D. ve Merkel R. A.** (2001). Principles of Meat Science, 4th edition. Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque, IA.
- [52] **Shank, J.L., Silliker, J. H. ve Harper, R. H.** (1962). "The effect of nitric oxide on bacteria," *J. Appl. Microbiol.*, **10**, 185-189.
- [53] **USDA-FSIS(United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service).** (2005a). Microbiology- shelf-stable dried meats. Washington, D.C.
- [54] **Borchert, L.L. ve Cassens, R. G.** (1998). Chemical hazard analysis for sodium nitrite in meat curing. American Meat Institute. Washington, D.C.
- [55] **Fennema, O.R.** (1996). Food chemistry, 3rd edition. CRC Press. New York City, NY.
- [56] **Fox, J.B. Jr.** (1966). "The chemistry of meat pigments," *J. Agr. Food Chem.* **14**, 207-210.
- [57] **Santamaria, P.** (2006). "Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation," *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 7.
- [58] **Abu-Dayeh, A.G.H.** (2006). "Determination of nitrite and nitrate content in several vegetables in Tulkarm district," Yüksek Lisans Tezi, An-Najah National University Faculty of Graduate Studies.
- [59] **Umah, J. A., Ketiku, A. O ve Sridhar, M. K. C.** (2003). "Nitrate, nitrite and ascorbic acid content of commercial and home-prepared complementary, infant foods," *African Journal of Biomedical Research*, **6**, 15-20.
- [60] **Bayraktar, N., Gökçe, R. ve Ergün, Ö.** (1998). "Gıdalarda nitrat ve nitrit kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri," *Ekoloji*, **28**, 28-30.
- [61] **Gökalp, H.Y.** (1983). "Et ürünlerinde nitrat, nitrit kullanımı ve nitrit zehirlenmesi," *Gıda*, **8**, 239-243.
- [62] **Honikel, K. O.** (2008). "The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products," *Meat Science*, **78**, 68-76.
- [63] **Santos, S.** (1996). "Biogenic amines: their importance in foods," *Int.J.Food Microbiol.*, **29**, 213-231.
- [64] **Fernandez, S. J. ve Mackie, I. M.** (1987). "Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of spanish canned fish," *Int. J. Food Sci. Technol.*, **22**, 409-412.
- [65] **Rawles, D. D. ve Flick, G. J.** (1996). "Biogenic amines in fish and shellfish," *Adv. Food Nut. Res.*, **39**, 329-365.
- [66] **Zou, X., Lu, S. ve Liu, B.** (1994). "Volatile N-nitrosamines and their precursors in Chinese salted fish - a possible etological factor for NPC in China," *Int. J.Canc.* **59**, 155-158.

- [67] **Tsugane, S., Sasazuki, S., Kobayashi, M. ve Sasaki, S.** (2004). "Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women,"*Brit. J. Canc.* **90**, 128–134.
- [68] **Tsugane, S.** (2005). "Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: Epidemiologic evidence,"*Canc. Sci.*,**96**, 1–6.
- [69] **Gough, T., Webb, K. ve Coleman, R.** (1978). "Estimate of the volatile nitrosamine content of UK food,"*Nature*,**272**, 161–163.
- [70] **Mitacek, E., Brunnemann, K., Suttajit, M., Martin, N., Limsila, T., Ohshima, H. ve Caplan, L.** (1999). "Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai foods,"*Food Chem. Toxicol.* **37**, 297–305.
- [71] **Lijinsky, W. ve Epstein, S.** (1970). "Nitrosamines as environmental carcinogens,"*Nature*,**225**,21–23.
- [72] **Warthesen, J., Scanlan, R., Bills, D. ve Libbey, L.** (1975). "Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids,"*J. Agric. Food Chem.* **23**, 898–902.
- [73] **Nomura, Y., Schmidt-Glenewinkel, T., Giacobini, E. veOrtiz, J.** (1983). "Metabolism of cadaverine and pipecolic acid in brain and other organs of the mouse,"*J. Neuroscience Res.*,**9**, 279–289.
- [74] **Lin, J., Lee,Y. ve Chang, H.** (1983). "High concentrations of dimethylamine and methylamine in squid and octopus and their implications in tumour aetiology,"*Food Chem. Toxic.* **21**, 143–149.
- [75] **Domanska-Blicharz, K., Rachubik, J. veKowalski, B.** (2005). "Occurrence of volatile N-nitrosamines in Polish tinned foods,"*Bull. Vet. Inst. Pulawy.*,**49**, 319–322.
- [76] **Wong, H., Murphy, S., Wang, M. ve Hecht, S.** (2003). "Comparative metabolism of N-nitrosopiperidine and N-nitrosopyrrolidine by rat liver and esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3,"*Carcinogenesis*,**24**, 291–300.
- [77] **Zou, X., Li, J., Lu, S., Song, X., Wang, X., Guo, L., Li, J., Lin, Q. veYe, J.** (1992). "Volatile N-nitrosamines in salted fish samples from high- and low-risk areas for NPC in China,". *Chin. Med. Sci. J.*,**7**, 201–204.
- [78] **Lee, S., Shin, J., Sung, N., Kim, J. ve Hotchkiss, J.** (2003). "Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products,"*Food Add. Contam.* **20**, 31–36.
- [79] **Yurchenko, S.,Molder, U.** (2006). "Volatile N-Nitrosamines in various fish products,"*Food Chem.* **96**, 325–333.
- [80]**Migasena, P., Reaunsuwan, W. ve Changbumrung, S.** (1980). "Nitrates and nitrites in local Thai preserved protein foods,". *J. Med. Assoc. Thailand.*,**63**, 500–505.

- [81] **Cohen, A. ve Roe, F.** (1997). "Review section: Evaluation of the aetiological role of dietary salt exposure in gastric and other cancers in humans,"*FoodChem. Toxicol.*,**35**, 271–293.
- [82] **Merusi, C., Corradini, C., Cavazza A., Borromei, C. ve Salvadeo, P.** (2010). "Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal,"*Food Chemistry*, **120**, 615-620.
- [83]**Pereira, E. A., Petrucci, J. F. S. ve Cardoso, A. A.** (2012). "Determination of nitrite and nitrate in brazilian meats using high shear homogenization,"*Food Analytical Methods*, **5**, 637-642.
- [84] **Alonso, M. C. B. ve Prego, R.** (2000). "Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis," *Analytica Chimica Acta*, **416**, 21-27.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Zeynep Kalaycıoğlu

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 10.07.1989

E-posta : kalayciogluz@itu.edu.tr

Yüksek Lisans : Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2015

Lisans : Yıldız Teknik Üniversitesi, 2013

Sunumlar :

1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi

Z. Kalaycıoğlu, F. B. Berker: Nitrit ve Nitrat İyonlarının Tayini İçin Kapiler Elektroforez-Örnek Sıkıştırma Yönteminin Geliştirilmesi: Gıda Örneklerine Uygulanması (Sözlü Sunum)

10-14 September 2013, Trabzon 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry

Z. Kalaycıoğlu, Ö. Dülger, M. Özgür: Simultaneous Spectrophotometric Determination of Phenolic Antioxidants (BHA and BHT) in Capsules and Chewing Gums by Using H-Point Standard Addition Method (Poster Presentation)

Z. Kalaycıoğlu, Ö. Dülger, M. Özgür: Quantification of Synthetic Phenolic Antioxidants in Capsules and Chewing Gums by Derivative Differential UV Spectrophotometry (Poster Presentation)