

İŞINLANMIŞ SOMON BALIĞINDA 2-ALKİLSİKLOBÜTANONLARIN GC/MS İLE BELİRLENMESİ

Ayça AYLANGAN

Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi,
Kazan-ANKARA

Özet

Işınlama teknolojisi günümüzde birçok ülkede yasal olarak uygulanmakta ve buna bağlı olarak ışınlanmış gıdaların uluslar arası ticareti son yıllarda artış göstermektedir. Uluslar arası ticaretin artmasına paralel olarak yasal düzenlemeler, ürün etiketine uygunluğun denetlenmesi, tüketicinin doğru ve yeterli bilgilendirilmesi amacıyla ışınlanmış gıdaların tespiti önemli hale gelmiştir. Bu çalışmada somon balığı örnekleri 3 farklı dozda (0.5; 1.0 ve 3.0 kGy) ışınlanmışlardır. Işınlamanın tespit edilmesi amacıyla yağ içeriği %1'den yüksek olan ışınlanmış gıdalarda oluşan 2-alkilsiklobütanonlar (2-ACB) gaz kromatografi/kütle spektrometri (GC/MS) ile analiz edilmiştir. Örneklerle ait kromatogramlar incelendiğinde ışınlanmamış kontrol örneğinde 2-ACB pikine rastlanmamıştır. Düşük dozlarda (≤ 0.5 kGy) oluşan 2-ACB'lerin tespiti amacıyla özütleme işleminde hızlandırılmış çözücü özütlemesi, süper kritik akışkan özütlemesi veya katı faz özütlemesi gibi alternatif tekniklerin kullanılması önerilmektedir. Sonuç olarak, 2-ACB'lar yağ içeren gıdalarda ışınlamanın indikatörü olarak kullanılabilirler.

1. Giriş

Mikroorganizmaları ve parazitleri etkisiz hale getirmek amacıyla gıdaların ışınlanması ve bu sayede raf ömürlerinin arttırılması uzun zamandır gıda koruma tekniği olarak kabul edilmektedir. 19. yüzyılda radyoaktivitenin keşfedilmesinden ve savaş amaçlı kullanılmasından sonra, nükleer enerjinin barışçıl amaçlarla kullanımı programı dahilinde gıda ışınlamanın önemi tüm dünyada artmaya başlamıştır. Işınlama işlemi gıdaların korunması amacıyla alternatif ve güvenli bir yöntem olmasına rağmen, tüketicilerin önemli bir bölümü hâlâ bu yöntemi güvenli bulmamakta ve kullanılmasını istememektedirler (1, 2). Gıda ışınlama ile ilgili olarak Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization, FAO), Uluslar arası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency, IAEA) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından kurulan komite toksikolojik, mikrobiyolojik ve beslenme açısından 10 kGy'e kadar gıdalara uygulanan dozların güvenli olduğunu belirtmiştir (1). Ayrıca, 1 – 7 kGy arasındaki ışınlama dozlarının gıdalarda bozulma yapan, patojen mikroorganizmaları etkisiz hale getirdiği belirtilmiştir (2, 3).

Balık ve balık ürünlerinin ışınlanmasıyla hem mikroorganizma inaktivasyonu sağlanmakta hem de buna bağlı olarak ürün raf ömrü uzatılmaktadır (4). 06.11.1999 tarih ve 23868 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Gıda Işınlama Yönetmeliği'nde çiğ balık, kabuklu deniz hayvanları ve bunların taze veya dondurulmuş ürünleri için bazı patojenik mikroorganizmaları azaltmak için maksimum 5 kGy, raf ömrünü uzatmak için maksimum 3 kGy ve parazitler enfeksiyonların kontrolü amacıyla maksimum 2 kGy'e kadar ışınlama yapılmasına izin verilmektedir (5, 6, 7).

%1'den fazla yağ içeren gıdalarda ışınlama sonucunda 2-alkilsiklobütanoanlar (2-ACB) oluşmaktadır. 2-ACB'lar oluştuğu yağ asidi ile aynı sayıda karbon atomuna sahip halka yapısındaki bileşiklerdir ve alkil grubu halkanın 2 pozisyonunda oluşmaktadır (8, 9). Yağ asidi veya trigliseritin karbonil grubundaki oksijenden (açıl-oksijen bağı) bir elektron çıkışı ile halkalı yapı oluşumu gerçekleşmektedir (10, 11, 12). 2-ACB'lar sadece ışınlamaya özgü bileşiklerdir, ışınlanmış yağ içeren gıdalarda bulunmaktadır. Bu bileşikler dondurma, ısıtma, mikrodalga ısıtma, UV ışınlama, yüksek basınç uygulamaları veya temel gıda koruma yöntemlerinin etkisiyle oluşmamaktadırlar (13). Ayrıca, uzun depolama süreleri, hava, vakum veya karbondioksit atmosferinde ambalajlama ile de oluşmamaktadırlar ve bu yöntemlerin oluşan 2-ACB miktarı üzerine önemli bir etkisi bulunmamaktadır (10, 14). 2-ACB'lar gıda ışınlamanın kimyasal indikatörü olarak tanımlanabilmektedirler (11, 12, 15, 16, 17, 18, 19). Ayrıca, lipitlerin bu radyolitik ürünleri ile gıda tarafından absorblanan doz tahmin edilebilmektedir (11). Yapılan çalışmalarda yüksek ışınlama dozlarında, absorblanan ışınlama dozu ile oluşan 2-ACB miktarı arasında doğrusal ilişki olduğu bulunmuştur (20).

Ortalama 10 kGy'lik doza kadar yapılan gıda ışınlamasının toksikolojik olarak herhangi bir tehlike oluşturmayacağı ve besleyici veya mikrobiyolojik açıdan problem olmayacağı belirlendikten sonra dünya çapında ışınlanmış gıda tüketimi artış göstermiş, buna paralel olarak uluslararası ticaret yaygınlaşmıştır (21). Gıdalara ışınlama uygulamasının kontrol edilmesi ışınlanmış gıdaların uluslar arası ticaretini kolaylaştırmak amacıyla oldukça önemlidir. Ayrıca, bu kontrol tüketicinin güveninin artırılması ve tüketicinin serbestçe seçme hakkını kullanabilmesi ve ürün etiketinin kontrolü açısından da önem taşımaktadır (22).

Bu çalışmanın amacı ışınlanmış gıdaların tespitinde Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) tarafından kabul edilen ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından da yürürlüğe konulan yağ içeren gıdalarda ışınlamayı tespit etmek amacıyla kullanılan "TS EN 1785 Gıda maddeleri - Katı yağ içeren ışınlanmış gıdaların belirlenmesi - 2-Alkilsiklobütanonların gaz kromatografik / kütle spektrometrik analizi" kapsamında ışınlanmış somon balığında 2-ACB'ların tespit edilmesidir (8).

2. Materyal Metod

2.1 Işınlama kaynağı

Işınlama işlemi, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Ankara Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde (SANAEM) bulunan ve Teknoloji Bölümü, Dozimetre Birimi tarafından işletilen Gama Işınlama Tesisi bünyesindeki, deneysel amaçlar için kullanılan Gama-hücresinde yapılmıştır. Bu çalışmada, uygulanan ışınlama dozlarını tespit edebilmek amacıyla 0,1 – 3 kGy'lik doz aralığında ölçüm yapabilen Harwell perspex dozimetreler (Harwell Gammachrome YR[®], Perspex Dosimeter, Batch 62, Harwell, UK) kullanılmıştır.

2.2 2-ACB'ların gaz kromatografik/kütle spektrometrik (GC/MS) analizi

0.5 kGy, 1 ve 3 kGy'lik üç farklı dozda ışınlanan somon balığı örnekleri ile birlikte kontrol örneği TS EN 1785 "Gıda maddeleri - Katı yağ içeren ışınlanmış gıdaların belirlenmesi 2-Alkilsiklobütanonların gaz kromatografik / kütle spektrometrik analizi" standartına göre analiz edilmiştir (8).

2.2.1 Örneklerin hazırlanması ve yağ analizi : Homojen hale getirilmiş örneklerden 3 g tartılarak yağ özütleme kartuşuna yerleştirilmiş, üzerine 5 g kadar susuz sodyum sülfat

konulmuş ve pamuk ile kartuşun ağzı kapatılmıştır. Yarı otomatik yağ özütleme ünitesine (Soxtec Avanti – 2055 Soxtec, Foss Tecator) yerleştirilen örneklerden n-heksan ile yağ özütlemesi yapılmıştır. Elde edilen yağ 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmış, üzerine 5 – 10 g susuz sodyum sülfat ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye n-heksan ile tamamlanmıştır. İçerik iyice karıştırılmış ve gece boyunca bekletilmiştir. Bu karışımdaki n-heksan döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılmış ve böylece Florisil kolona verilmek üzere yağ özütü hazırlanmıştır.

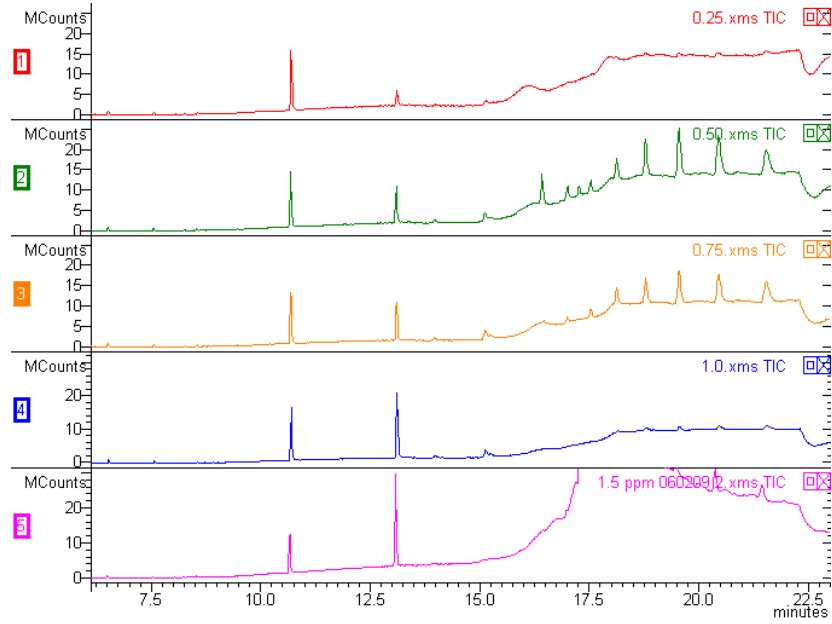
2.2.2 Florisil kolon kromatografisi: Kromatografik kolon (20 – 21 cm), etkinliği giderilmiş Florisil ve n-heksan kullanılarak hazırlanmıştır. Yaklaşık olarak 200 mg yağ içerecek bir hacimde yağ özütü alınıp 5 mL'den fazla olmayan n-heksanda çözülmüştür. Yağ özütü nicel olarak kolona uygulanmış, n-heksan seviyesi tam florisilin tepesinin hemen üzerine damlayacak şekilde ayarlanmış, 5 – 10 mL n-heksan ilave edilmiştir. Kalan n-heksan (toplam 150 mL) kolonun üzerindeki bir ayırma hunisine konulmuş, 2 – 5 mL/dk akış hızında geri alma işlemi yapılmış ve geri alınan kısım uygun bir balona (250 mL'lik) toplanmıştır. Ayırma hunisi boşaldığında, kolonun kurumamasına dikkat edilerek toplama balonu değiştirilmiş ve n-heksanda hazırlanmış % 1'lik dietil eter çözeltilisinden 150 mL ile geri alma işlemi yapılmıştır. % 1'lik dietil eter çözeltisi kısmı, döner buharlaştırıcıda, 40 °C'da, en düşük vakumda 5 – 10 mL'ye kadar buharlaştırılmış ve bir deney tüpüne aktarılmıştır. Deney tüpüne aktarılan kısım, 40 °C'da, azot akımı altında kuruluğa kadar deriştirilmiş ve azot akımı altında kuru haldeyken geride örnek kalmadığından emin olunarak, bu kısım, 200 µL 2-sikloheksilsikloheksanon (iç standart) çözeltilisine alınmış ve analiz için gaz kromatografisi örnek şişelerine (vial) aktarılmıştır.

2.2.3 GC/MS analiz: Çalışmada Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Ankara Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Analitik Ölçüm ve Analiz Birimi'nde bulunan GC-MS ile 2-ACB'lar Varian Marka CP 3800 Gaz Kromatografi ve buna bağlı Varian 1200 L Quadrupole MS/MS kullanılmıştır. Ayırmada kullanılan kolon Varian Factor Four, VF 5MS, 30 mx0,25mm ID, 0,25µm, % 95 dimetil, % 5 difenil polisiloksan'dır. Helyum taşıyıcı gazının akış oranı 1mL/dk'dır. GC sıcaklık programı: Enjektör sıcaklığı: 250 °C; bağlantı hattı sıcaklığı: 280 °C; kolon fırını sıcaklık programı; başlangıç sıcaklığı: 55 °C, 1 dakika süreyle; sıcaklık artış hızı: 300 °C'a kadar 15 °C/dk; son sıcaklık ve bekleme süresi: 300 °C'da 5 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolona enjekte edilen miktar 1 µL ve bölmesiz enjeksiyon şekli ile çalışılmıştır. Kütle spektrometresi ile "Selected ion monitoring" SIM modunda çalışılmış ve 2-dodesilsiklobütanon (2-DCB) ve 2-tetradesilsiklobütanon (TCB)'nun kütle / yük (m/z) 98 ve m/z 112'deki iyon akımları ölçülmüştür. Standart çözeltiler 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.5 ppm'lik konsantrasyonlarda hazırlanmış ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Örnekler, 2-DCB ve 2-TCB standartının alıkonma süresi ve iyon oranları karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

2.2.4 Işınlanmış örneklerin teşhisi: En az bir 2-ACB pozitif olarak teşhis edildiğinde ve hesaplanan derişim, en zayıf iyonda 3:1'lik bir sinyal / gürültü oranını veren derişimi geçtiğinde örnekler ışınlanmış olarak kabul edilmektedirler.

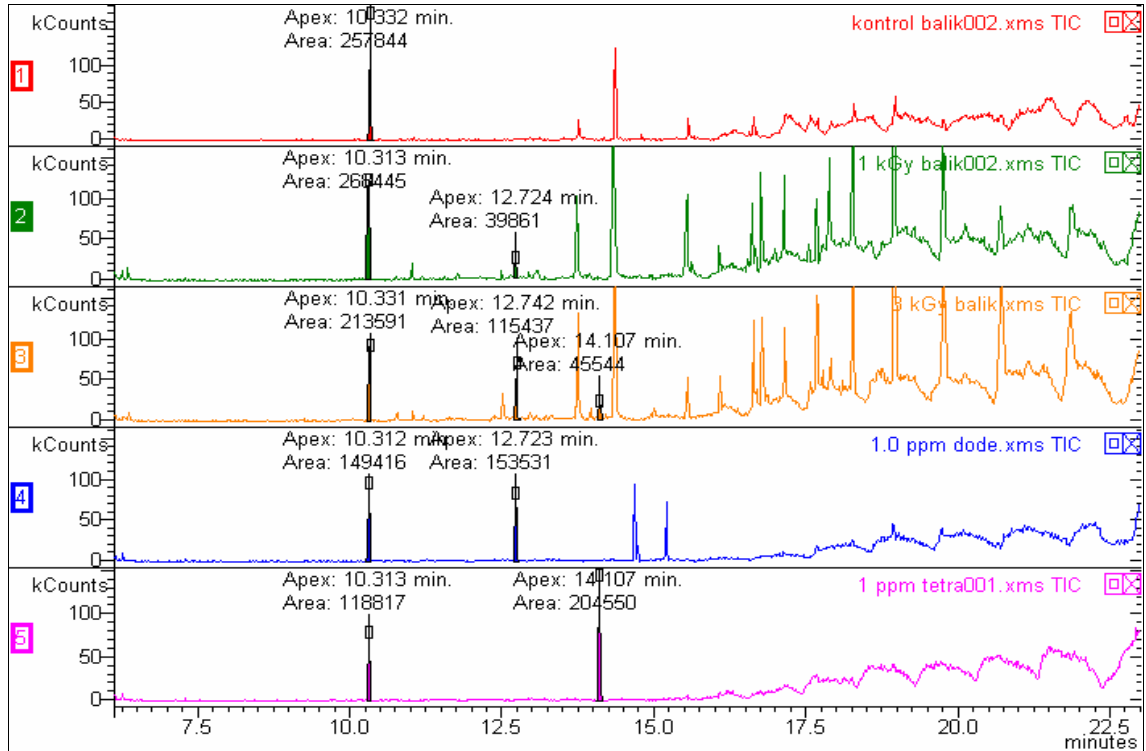
3. Sonuçlar ve tartışma

Şekil 1'de farklı konsantrasyonlarda (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.5 ppm) hazırlanan 2-DCB standartının GC/MS spektrumu görülmektedir. 10,50 – 10,75. dakikada gözlenen ilk pik iç standart olan 2-sikloheksilsikloheksanona ait iken, 13,0 – 13,25. dakika arasında gözlenen ikinci pik 2-DCB standartına aittir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 2-DCB standartlarının GC/MS kromatogramı ve alıkonma süreleri

Şekil 2’de ışınlanmamış kontrol örneği ile birlikte 1 ve 3 kGy dozlarda ışınlanan somon balığına ait kromatogramlar verilmiştir. Işınlanmamış kontrol örneğine ait kromatogram incelendiğinde 2-ACB pikleri tespit edilememiştir. Bunun aksine 1 ve 3 kGy dozda ışınlanan örneklerde sırasıyla 12.724 dakika ve 12.742 dakikalık alıkonma sürelerinde 2-DCB pikleri çok net bir şekilde elde edilmiştir. Ayrıca, 3 kGy dozda ışınlanan balık örneğinde 14.107 dakikalık alıkonma süresinde 2-TCB piki de tespit edilmiştir.



Şekil 2. Değişik dozlarda ışınlanan somon balığına ait GC/MS kromatogramları

Birçok araştırmacı gıdalarda ışınlama ile oluşan 2-ACB'ların, gıdanın içeriğine bağlı olmadan en az % 1 oranında yağ içeren ve 0.5 kGy'lik doza kadar yapılan ışınlama dozlarında teşhis edilebildiğini doğrulamışlardır (23). Bu çalışmada, 0.5 kGy'lik dozda ışınlanan somon balığı örneklerinde de herhangi bir 2-ACB piki tespit edilememiştir. Analiz sırasında somon balığı örneklerinden 2-DCB ve 2-TCB'nun özütlemesi için Florosil kolon kromatografisi kullanılmıştır. Bu yöntem ile özütleme işlemi zaman olarak oldukça uzun sürmesinin yanısıra, fazla miktarda çözelti harcanmakta ve analiz maliyeti oldukça yüksek olmaktadır. Özütleme işlemi daha kısa sürede yapmak amacıyla süper kritik akışkan özütlemesi, katı faz özütleme yöntemi, hızlandırılmış çözücü özütlemesi gibi alternatif tekniklerin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca, bu teknikler ile düşük doz uygulamaları sonucu gıdalarda oluşan 2-ACB'ların tespiti daha başarılı sonuçlar verdiği belirtilmektedir.

4. Kaynaklar

1. Lara JD, Fernandez PS, Periago PM, Palop A. 2002. Irradiation of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with electron beams. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 379 – 384.
2. Aylangan Y.A. 2010. Işınlamanın hamburger köftelerin kalite kriterleri, raf ömrü üzerine etkisinin incelenmesi ve hamburger köftelerde ışınlamanın tespiti. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 146 s.
3. Anonim. 1999. Facts about food irradiation, International Consultative Group on Food Irradiation.
4. Erkan N, Özden Ö. 2007. The changes of fatty acid and amino acid compositions in sea bream (*Sparus aurata*) during irradiation process. *Radiat. Phys. Chem.*, 76, 1636-1641.
5. Anonim.1999. Gıda Işınlama Yönetmeliği. 06.11.1999 tarih ve 23868 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
6. Anonim. 2002. Gıda Işınlama Yönetmeliğinde değişiklik yapılması hakkında yönetmelik. 15.10.2002 tarih ve 24907 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
7. Anonim. 2003. Gıda Işınlama Yönetmeliğinde değişiklik yapılması hakkında yönetmelik. 19.12.2003 tarih ve 25321 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
8. Anonim. 2005. Türk Standardı, TS EN 1785 Gıda maddeleri – Katı yağ içeren ışınlanmış gıdaların belirlenmesi–2-Alkilsiklobütanonların gaz kromatografik/kütle spektrometrik analizi.
9. Tewfik IH, Ismail HM, Sumar S. 1998. A rapid supercritical fluid extraction method for the detection of 2-alkylcyclobutanones in gamma-irradiated beef and chicken. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 31, 366 – 370.
10. Stevenson MH. 1996. Validation of the cyclobutanone protocol for detection of irradiated lipid containing foods by interlaboratory trials, *Detection methods for irradiated foods, Current Status*, Edited by: McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., Pearce, J., Published by The Royal Society of Chemistry, UK, 431 p.
11. Kim KS, Lee JM, Seo HY, Kim JH, Song HP, Byun MW, Kwon JH. 2004. Radiolytic products of irradiated authentic fatty acids and triacylglycerides. *Radiat.Phys. Chem.*, 71, 45–49.
12. Knoll N, Weise A, Claussen U, Sendt W, Marian B, Gleis M, Pool-Zobel BL. 2006. 2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. *Mutat. Res.*, 594, 10 – 19.
13. Hartwig A, Pelzer A, Burnouf D, Titeca H, Delincee H, Briviba K, Soika C, Hodapp C, Raul F, Miesch M, Werner D, Horvatovich P, Marchioni E. 2007. Toxicological potential of 2-alkylcyclobutanones–specific radiolytic products in irradiated fat-containing food–in bacteria and human cell lines. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 2581-2491.

14. Stewart EM. 2009. Detection of irradiated ingredients, Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis, Edited by, Leo ML Nollet, Fidel Toldra, CRC Pres, Taylor&Francis Group, 763 p.
15. Delincee H, Pool-Zobel BL. 1998. Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. *Radiat. Phys. Chem.*, 52, 39 – 42.
16. Miesch M, Ndiaye B, Hasselmann C, Marchioni E. 1999. 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs- I. Synthesis of saturated and unsaturated standards. *Radiat. Phys. Chem.*, 55, 337 – 344.
17. Miesch M, Miesch L, Horvatovich P, Burnouf D, Delincee H, Hartwig A, Raul F, Werner D, Marchioni E. 2002. Efficient reaction pathway for the synthesis of saturated and mono-saturated 2-alkylcyclobutanones. *Radiat. Phys. Chem.*, 65, 233 – 239.
18. Gadgil P, Smith JS. 2004. Mutagenicity and acute toxicity evaluation of 2-dodecylcyclobutanone. *J. Food Sci.*, 69, 9, C713-C716.
19. Gadgil P. 2006. Evaluation of toxicity, mutagenicity, metabolism and formation of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated ground beef, PhD. Thesis, Kansas State University, Food Science Graduate Program College of Agriculture, Manhattan, Kansas, 122 s.
20. Marchioni E, Raul F, Burnouf D, Miesch M, Delincee H, Hartwig A, Werner D. 2004. Toxicological study on 2-alkylcyclobutanones – results of a collaborative study. *Radiat. Phys. Chem.*, 71, 145 – 148.
21. Cerda H, Delincee H, Haine H, Rupp H. 1997. The DNA ‘comet assay’ as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 375, 167 – 181.
22. Khan AA, Khan HM, Delincee H. 2003. DNA comet assay – a validity assessment for the identification of radiation treatment of meats and seafood. *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 88–92.
23. Ndiaye B, Jamet G, Miesch M, Hasselmann C, Marchioni E. 1999. 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. *Radiat. Phys. Chem.*, 55, 437-445.