

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOJENİK AMİNLERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE
TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ KULLANILARAK AYRILMASI VE
FERMENTE GIDALARDA TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veselina ADIMCILAR

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

HAZİRAN 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOJENİK AMİNLERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE
TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ KULLANILARAK AYRILMASI VE
FERMENTE GIDALARDA TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veselina ADIMCILAR

(509141030)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

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

HAZİRAN 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509141030 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Veselina ADIMCILAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “BİYOJENİK AMİNLERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ KULLANILARAK AYRILMASI VE FERMENTE GIDALARDA TAYİNİ” 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. Ayşen YARAT**
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 29 Nisan 2016
Savunma Tarihi : 08 Haziran 2016





Aileme,



ÖNSÖZ

Kendisinin öğrencisi olma şansına sahip olduğum ilk günden bu yana, bana duyduğu güveni ve aşıladığı çalışma isteğiyle beraber benim için çok kıymetli bu tez çalışmasının ortaya çıkmasına olanak sağlayan, tüm çalışmalarım sırasında çok kıymetli bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan ve her zaman destekleyen, değerli hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e,

Çalışmamın her aşamasında yanımda desteğini hissettiğim, tüm bilgi birikimini benimle paylaşan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum değerli hocam Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e,

Aynı ortamda beraber çalışma fırsatı bulduğum, bu zamanı keyifli kılan ve tanıdığımı çok mutlu olduğum, bana pek çok konuda yardımcı olan değerli arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan ve bundan sonra da olacaklarını bildiğim bana daima destek olup, hiçbir zaman yalnız bırakmamış olan çok kıymetli dostlarıma,

Beni her konuda koşulsuz destekleyen ve hep bir adım arkamda olduklarını bildiğim; tüm başarı ve güzelliklerde en büyük paya sahip olan ve onlara sahip olduğum için kendimi oldukça şanslı hissettiğim çok kıymetli anneme, babama ve dayıma, sonsuz teşekkürler etmek isterim.

Nisan 2016

Veselina ADIMCILAR
(Kimyager)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

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 Kapiler Elektroforezin Tarihsel Gelişimi	5
2.2 Kapiler Elektroforez İle Klasik Elektroforezin Farkları	6
2.3 Kapiler Elektroforezde Kullanılan Terimler	7
2.3.1 Elektroforetik mobilite	7
2.3.2. Elektroosmotik akış.....	9
2.3.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler	11
2.3.3 Göç süresi ve görünen mobilite	13
2.4 Kapiler Elektroforezde Kromatografik Parametreler	15
2.4.1 Ayırma etkinliği	15
2.4.2 Bant genişlemesi ve etki eden faktörler	16
2.4.3 Rezolüsyon	18
2.5 Kapiler Elektroforezin Modları	18
2.5.1 Kapiler zon elektroforez.....	19
2.6 Kapiler Elektroforez Cihaz Tasarımı.....	20
2.6.1. Yüksek voltaj güç kaynağı	21
2.6.2. Kapiler kolon	22
2.6.3 Örnek enjeksiyon sistemleri	22
2.6.3.1 Elektrokinetik enjeksiyon	23
2.6.3.2 Hidrodinamik enjeksiyon.....	24
2.6.3.3 Örnek sıkıştırma.....	25
2.7 Kapiler Elektroforezde Dedektörler	26
2.7.1 İletkenlik dedektörü ile deteksiyon	26
2.7.2 Temassız iletkenlik dedektörü	27
2.7.2.1 Temassız iletkenlik dedektörünün avantaj ve dezavantajları.....	28
2.7.2.2 Temassız iletkenlik dedektörünün kullanıldığı alanlar.....	29
3.BİYOJENİK AMİNLER	31
3.1 Biyojenik Aminlerin Genel Özellikleri	31
3.2 Biyojenik Aminlerin Fizyolojik Etkileri.....	33
3.3 Biyojenik Aminlerin Toksik Özellikleri	34
3.3.1 Biyojenik aminlerin farmakolojik özellikleri	34
3.3.2 Biyojenik aminler için yasal limitler.....	36
3.4 Fermente Gıdalarda Bulunan Biyojenik Aminler	36

3.4.1 Peynir, yoğurt ve kefir	37
3.5 Fermente Gıdalarda Biyojenik Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	39
3.6 Gıdalarda Biyojenik Amin Analizi	40
3.6.1 Kapiler elektroforez ile yapılan biyojenik amin araştırmaları üzerine literatür incelemesi.....	41
4. DENEYSEL KISIM.....	43
4.1. Malzeme ve Yöntemler	43
4.1.1 Kullanılan kimyasallar	43
4.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması	43
4.1.3 Gıda örneklerinin hazırlanması	43
4.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları	44
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
5.1 Metot Optimizasyonu	45
5.1.1 Tampon çözeltinin kompozisyonunun optimizasyonu	45
5.1.2 Tampon çözelti pH değerinin belirlenmesi	46
5.2 Metot Validasyonu	47
5.2.1 Kalibrasyon doğrularının çizilmesi.....	47
5.2.2 Tekrarlanabilirlik çalışmaları	48
5.2.3 LOD ve LOQ değerleri	48
5.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması	48
5.4 Metodun Doğruluğunun Tespit Edilmesi	51
5.5 Sonuçların Yorumlanması	52
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMALAR

CE	: Kapiler Elektroforez
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
C⁴D	: Temassız İletkenlik Dedektörü
EOA	: Elektroosmotik Akış
UV	: Ultraviyole
HIS	: Histamin
CAD	: Kadaverin
SPD	: Spermidin
PUT	: Putresin
AC	: Alternatif Akım
İC	: İyon Kromatografi
GC	: Gaz Kromatografi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HETP	: Teorik Tabaka Genişliği
MAO	: Monoamin oksidaz
DAO	: Diamin oksidaz
HNMT	: N-metil transferaz
PVP	: Polivinilpirolidon
MES	: 2-(N-morfolin)etansülfonik asit
HIBA	: α -hidroksiizobütirik asit
HPMC	: Hidroksipropilmetil selüloz
HEC	: Hidroksietil selüloz
TRIS	: Tris (Hidroksietil)aminometan
TCA	: Trikloroasetik asit
LOD	: Belirleme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Klasik elektroforez ile CE arasındaki temel farklar.....	7
Çizelge 2.2: Kapiler elektroforez uygulama şekilleri ve ayırım mekanizmaları.....	19
Çizelge 2.3: CE için kullanılan dedektörler ve deteksiyon limitleri	26
Çizelge 2.4: C ⁴ D Deteksiyonu için avantaj ve dezavantajlar.....	29
Çizelge 3.1: Biyogenik aminleri meydana getiren öncü amino asitler	32
Çizelge 3.2: Vücuda alınan histamin miktarına bağlı toksik etkileri.....	35
Çizelge 3.3: Peynirden izole edilen mikroorganizmalar ve biyogenik aminler.....	37
Çizelge 5.1: Biyogenik aminlerin kalibrasyon doğrusu verileri.....	47
Çizelge 5.2: Biyogenik aminlere ait LOD ve LOQ değerleri.....	48
Çizelge 5.3: Fermente gıdalarda tespit edilen biyogenik amin miktarları.....	49
Çizelge 5.4: Fermente gıdalarda biyogenik aminlere ait geri kazanım değerleri.....	51



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kapiler duvarındaki elektriksel çift tabaka ve EOA.....	9
Şekil 2.2: (a) EOA profili(b) Basınçla meydana gelen laminar akış profili.....	10
Şekil 2.3: pH ile silanol gruplarının iyonizasyon derecesi ilişkisi.....	11
Şekil 2.4: İyonların kapiler kolonda hızlarıyla bağlantılı geliş sırası.....	14
Şekil 2.5: CZE ile tüm yüklü türlerin ayrılması mekanizması.....	20
Şekil 2.6: CE cihazı şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.7: Elektrokinetik enjeksiyon.....	23
Şekil 2.8: Hidrodinamik ve sifon etkisiyle enjeksiyon.....	24
Şekil 2.9: (a) C ⁴ D hücresi (b) Dedektör hücresinin temsil ettiği elektrik devresi	28
Şekil 3.1: Biyogenik aminler ve yapıları.....	31
Şekil 3.2: Dekarboksilasyon reaksiyonu.....	32
Şekil 3.3: Biyogenik aminlerin oluşum reaksiyonları.....	33
Şekil 3.4: Putresin öncülüğünde N-nitrözamin oluşum reaksiyonu.....	35
Şekil 5.1: 1 mg/L standart biyogenik aminlere ait elektroferogram	47
Şekil 5.2: 1/25 oranında seyreltilmiş beyaz peynir elektroferogramı.....	49
Şekil 5.3: 1/25 oranında seyreltilmiş hazır yoğurt elektroferogramı.....	52
Şekil 5.4: 1/25 oranında seyreltilmiş ev yapımı yoğurt elektroferogramı.....	50
Şekil 5.5: 1/25 oranında seyreltilmiş ev yapımı kefir elektroferogramı.....	51
Şekil 5.6: (a) 1/25 seyreltilmiş peynire 2 mg/L olacak şekilde eklenen standart elektroferogramı (b) 1/25 seyreltilmiş beyaz peynir elektroferogramı.....	52



BİYOJENİK AMİNLERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TEMASSIZ İLETKENLİK DEDEKTÖRÜ KULLANILARAK AYRILMASI VE FERMENTE GIDALARDA TAYİNİ

ÖZET

Gıda analizleri; gıda içeriklerinin belirlenmesi, gıda ürününün güvenilir olup olmadığının anlaşılması ile toksisitelerinin belirlenmesi, son ürünün ve kullanılan tüm ham maddelerin kalitesi ile üretim sürecinin ürün üzerindeki etkisinin kontrol edilmesi gibi amaçlarla gerçekleştirilir. Biyojenik aminler olarak adlandırılan; yüksek oranda azot içeren, biyolojik olarak aktif, küçük molekül ağırlıklı bileşikler gıda ürününün kalitesi ve toksisitesi hakkında bilgi vermekte, aynı zamanda ürününün tazeliğini göstermektedir. Biyojenik aminler, protein içeren gıda ürünlerinin hijyenik olmayan ortamlarda üretilip saklanması durumunda, mikroorganizmaların etkisiyle oluşur. Yüksek miktarlarda alınan biyojenik aminlerin, baş ağrısı, mide bulantısı ve daha ciddi gıda zehirlenmelerine sebebiyet verdiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin gıdalarda en çok rastlanan türleri; histamin, tiramin, spermidin, kadaverin ve putresindir. Histamin yüksek toksisiteye sahip olduğundan en çok bilinen ve gıdalarda sıklıkla aranan biyojenik amindir.

Biyojenik aminler en fazla balık, et ve süt ürünleri gibi gıdalarda görülsede, meyve ve sebzelerde bulunabilir. Şarap üretim prosesi sırasında da ortaya çıkabilen biyojenik aminler şarap tadını etkiledikleri için, üreticilerinin önemli bir problemidir. Protein içeriği yüksek fermente gıdalarda da fermantasyon prosesleri süresince önemli miktarlarda biyojenik amin oluşumu gözlemlenebilir. Peynir, yoğurt ve kefir en çok tüketilen fermente gıdaların başındadır ve bu gıdalar endüstriyel olarak üretilbildikleri gibi yoğurt ve kefir, tüketenlerin isteği üzerine evlerde de mayalanabilmektedir. Sözü edilen ürünlerinin tümü yoğun olarak tüketilen gıda ürünleri olduklarından, tüketici sağlığı ve ürün kalitesi açısından bu ürünlerde ki biyojenik amin analizleri oldukça önemlidir. Bu amaçla daha güvenilir, hassas, kolay uygulanabilir yeni analiz yöntemleri geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar süregelen güncel araştırma konusudur.

Kapiler elektroforez (CE), son yıllarda adından sıklıkla bahsedilen, diğer yöntemlere kıyasla azımsanamayacak avantajlara sahip analitik bir ayırma ve analiz metodudur. Yöntemin sağladığı avantajlar; kısa analiz süresi, az miktarda örnek ve madde sarfıyatı, kolay temizlenebilen silika kolonların kullanılması ve çok yüksek ayırma gücüdür. Bu avantajların tümü kapiler elektroforezin son yıllarda karışık matrikse sahip gıda örneklerinin analizlerinde yaygın olarak kullanılmasının sebebidir.

Biyojenik aminlerin, bazılarının UV aktif olmaması, diğerlerinin düşük UV absorbanları nedeniyle floresans bir madde ile türevlendirilen biyojenik aminlerin kapiler elektroforezle ayrılması ve floresan dedektörle tayini ya da dolaylı UV deteksiyon yöntemlerinin tercih edilmesine neden olmuştur. Dolaylı deteksiyon yöntemlerinin hassasiyetleri düşük, floresan deteksiyon yöntemlerinin ise

türevlendirme işlemi uzun zaman alan zor işlemlerdir. Son yıllarda geliştirilen temassız iletkenlik (C^4D) detektörlerinin kapiler elektroforez cihazları ile birleştirilmesi ile UV veya floresan aktif olmayan pek çok türün kapiler elektroforez ayırma yöntemiyle çok hızlı ayrılması ve analizi gerçekleştirilmektedir. Literatürde biyojenik aminlerin CE- C^4D yöntemiyle tayinine ait çok az çalışma mevcuttur. Fermente ürünlerin üzerinde durulan bir çalışmaya raslanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, CE- C^4D birleştirilerek, endüstriyel olarak fermente edilmiş beyaz peynir ve yoğurt ile ev yapımı yoğurt ve kefir içerisinde bulunan histamin, kadaverin, putresin ve spermidinin kalitatif ve de kantitatif analizi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde, gıda ürünlerin basit bir ekstraksiyonun ardından, ekstraktlar doğrudan cihaza verilmiştir. Ayırma ortamı olarak, biyojenik aminlerin protonlandığı asidik bir tampon seçilmiş; elektroosmotik akış hızını yavaşlatmak için tampona polimerik madde ilavesi yapılmıştır ve bu sayede dört biyojenik amin birbirlerinden başarı ile ayrılmış ve gıdalarda tayinleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenen ayırma elektroliti, 15 mM α -hidroksiizobütirik asit (HIBA) ve kütlece %0,01 oranında Hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) içermektedir ve pH değeri ise Tris ile 3,57'ye ayarlanmıştır. Ayırma voltajı 28 kV olarak seçilmiştir.

Geliştirilen yöntemin kalibrasyon grafiğinin doğrusal aralığı tüm biyojenik aminler için 0,2 -6,0 ppm konsantrasyon aralığında ve r^2 değerleri 0,9981- 0,9996 aralığında bulunmuştur. Dört biyojenik amin için tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılarak metot validasyonu gerçekleştirilmiştir; aynı gün 5 kez art arda belirlenen şartlarda enjekte edilen standart biyojenik amin karışımı için ve göç süresi ve düzeltilmiş pik alanlarının tekrarlanabilirliği % bağıl standart sapma (RSD) olarak hesaplanmıştır. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları için 3 gün art arda beşer kez standart biyojenik amin karışımının enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen % bağıl standart sapma değerleri metodun tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Geri kazanım çalışmaları gerçek örnekler üzerine standart biyojenik amin karışımının farklı konsantrasyonlarda eklenmesiyle yapılmıştır. Elde edilen geri kazanım değerleri % 88,73 ile %104,65 arasındadır. Geliştirilen analiz yönteminde düşük deteksiyon limitlerine inilmiştir. Deteksiyon limitleri, incelenen biyojenik aminler için 22,79-31,60 ng/mL arasındadır. Geliştirilen yeni metot, ticari beyaz peynir ve yoğurt ile ev yapımı yoğurt ve kefirin biyojenik amin analizinde başarı ile uygulanmıştır. Bu çalışma fermente gıda ürünlerine uygulanan ilk CE- C^4D analiz yöntemidir.

SEPARATION OF BIOGENIC AMINES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS COUPLED WITH CONTACTLESS CONDUCTIVITY DETECTION AND DETERMINATION IN FERMENTED FOODS

SUMMARY

Foods and food products are frequently investigated for the determination of their contents with the intentions of to be ensure about the safety of the food and to be aware of their potential toxicity and the quality of raw materials and food processing technology. Biogenic amines are biologically active, nitrogen based, low molecular mass substances and they consider as quality and toxicity indicators of foods. The amount of biogenic amines indicates also the freshness of the food products. These compounds form during production or storage of protein rich foods under unhygienic conditions. Although these compounds form in metabolic processes, their levels should not exceed the limits which they are poses a risk for health. Histamine, tyramine, typtamine, cadaverine and putrescine are some of these biogenic amines and histamine is the most well-known biogenic amine due to its high toxicity. The adverse effects of excess intake of biogenic amines mainly by histamine and tyramine from foods such as fish and cheese cause food poisoning. Some of these symptoms are known as headache, vomiting, nausea and gastrointestinal problems and more severe cases they can cause even deaths.

Biogenic amines mostly found in fish, meat and meat products and dairy products which are rich in protein. Decarboxylation of free amino acids results the formation of desired biogenic amines in foods. Moreover, these biogenic amines are naturally occurs in some vegetables and fruits; which were also detected in wines and cause changing in sensory properties of the product. These amines are usually formed in protein rich foods by the act of microorganisms which has decarboxylase activity under inappropriate technological processing conditions especially while fermentation processes. Fermented foods such as cheese, yoghurt and traditional foods such as kefir contain high amount of protein and these foods are widely consume in our country and these foods can be either fermented by industrially or by home made processes which can be result by the formation of biogenic amines during production. Milk is a great source of protein and it is the raw material of all types of fermented foods thus it is convenient for the formation of biogenic amines. These circumstances outweigh the importance of controlling factors affected the biogenic amine formation during processing and storage. Development of rapid, reliable, repeatable and highly effective methods in order to determine of these compounds in fermented foods is a significant research area.

Capillary electrophoresis (CE) is a novel technique for separation and quantification of analytes ranged from small ions to large DNA molecules, gained great importance in last decades and widely used due to its numerous advantages over other chromatographic techniques.

CE has a high separation power as a result of the applied high voltages through narrow capillaries filled with buffer solution where separation takes place. This technique offers short analysis time, low chemical consumption, high resolution power and feasibility of determination of analytes in complex matrices; due to the capillary tubes which are less expensive and can be regenerated easily.

Capillary electrophoresis has several modes of application to perform an electrophoretic separation. Among these modes capillary zone electrophoresis is the simplest and widely using mode. During the separation process, all charged particles moves in a buffer solution, toward to the cathode pole where detector is positioned and all analytes separated in bands related with their different charge-mass ratios. The movement of all ionic species in one direction is related with the bulk flow called electroosmotic flow (EOF) result of the negatively charged inner capillary wall influenced from high electrical field. Formation of an electrical double layer results with the movement of solvent with the ionic species solvated in that buffer solution. All charged particles can be analysed by CZE without any modifications. All sample ions in CE are injected from anodic side and detected from cathodic side by the detector in the order of their own electrophoretic mobilities under EOF. The small and highly charged cations are moving at faster rates while small and highly negative charged particles are reached detector finally.

In this thesis study, a novel, simple and rapid CZE method was developed for the determination of histamine, putrescine, cadaverine and spermidine in fermented foods: cheese, yoghurt which were purchased from local markets, yoghurt and kefir which were fermented from milk by not using industrially.

Determination of biogenic amine contents of various foods and beverages have been investigating with the aid of CE for several decades and the detection of these compounds usually achieved by indirect UV detection or fluorescence detection. Fluorescence detection of biogenic amines can only achieved after derivatization which results long reaction times. Direct detection of biogenic amines with high resolution and sensitivity has been performed by using conductometric techniques recently as a new method of detection is introduced. Contactless conductivity detection (C^4D) is a new technique which has many advantages compared to the other conductometric detectors. While C^4D coupled with CE, electrodes is not directly contact with the solution thus prevents the coupling problems caused by contact of the solution with electrodes. This technique offers fast and direct detection of all charged ions during separation according the difference in their conductivity from background electrolyte which is buffer solution itself. The cell of C^4D composed of 2 tubular electrodes around capillary, positioned apart from few millimeters from each other. After AC is applied to the first electrode, current passes through the cell and collected from second electrode and then the signal is amplified and indicates the difference in conductivity between buffer solution and analytes.

Biogenic amines has high pKa values and in acidic conditions they can be determined as cations and they were detected by C^4D directly. The optimum buffer solution composition was selected 15 mM HIBA and 0.01 (w/v) HPMC. The pH was adjusted to 3.57 with Tris solution in order to prevent increase in conductivity and joule heating. The addition of HPMC was affected EOF by decreasing the rate to improve resolution between analytes. Proposed method for determination of biogenic amines and combined with direct detection was successfully applied to food samples.

The separation procedure was carried out in a narrow bore capillary tube with 50 μm inner diameter without any pretreatment. The total length of capillary tube was 80 cm and effective length was 65 cm. The voltage applied was 28 kV and the temperature was set to the 20 $^{\circ}\text{C}$ during separation.

The sample preparation procedure was simple, the food samples were homogenized and weighed about 2,5 g. Extraction procedure was performed by adding 10 mL of % 6 (w/v) TCA solution and using a vortex mixer for 2 minutes and then centrifuged for 15 minutes. The solution was filtered and completed 10 mL of total volume with deionized water and injected to the capillary directly after dilution and filtration through 0,20 μm microfilters. Except spermidine, histamine, putrescine and cadaverine were found in all samples.

Calibration curves of these amines were showed linear range between 0,2 - 6,0 ppm and correlation coefficients were between 0,9981-0,9996. The method introduced ensures a very simple sample pretreatment process with very short analysis time with a good precision and reproducibility. Mixture of standard solution included four biogenic amines was injected 5 times in a day and intraday repeatability were calculated. % RSD of migration time of the amines were ranged between 0,24 and 0,28 and for corrected peak areas % RSD values were ranged between 2,35 and 4,25. Interday repeatability for migration times and corrected peak areas were also calculated as % RSD and results ensures good repeatability. The limit of detections (LOD) for biogenic amines were improved and found ($S/N=3$) in between 22,79 - 31,60 ng/mL and limit of quantifications (LOQ) were found ($S/N=10$) in between 75,98 - 105,34 ng/mL.

Recoveries of four biogenic amines were calculated by adding standard mixtures of biogenic amines on fermented food samples and the obtained results were in the good range in between % 88,73 and 104,65.

There are only limited number of studies in literature investigated the biogenic amine contents of foods by CE coupled contactless conductometric detection and it can be concluded that the study is one of the first report which was investigated biogenic amines in fermented foods such as cheese, yoghurt and kefir with CE- C^4D .

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez (CE); son yıllarda kendisine geniş kullanım alanı bulmuş; güçlü bir ayırma ve analiz metodudur. Yöntemin temeli elektroforez prensibine dayanır; ancak cihaz tasarımı bakımından modern kromatografik cihazlarla benzerlik göstermektedir. CE diğer kromatografik yöntemlere kıyasla modern bir teknik olmakla beraber oldukça yüksek etkinlikte çalışan, güvenilir, hızlı ve pratik analiz yapma imkanı sunmaktadır. Bunların yanında kapiler elektroforez, minyatürize edilmiş elektroforez tekniği olduğundan düşük kimyasal ve örnek tüketimi ile diğer kromatografik yöntemlere kıyasla büyük avantaj sağlamaktadır [1].

Elektroforezde yapılan analiz, türlerin elektrik alan altında farklı hızlarda hareket ederek ayrılmasına dayanır. CE'nin çalışma prensibi de elektroforez ile çok benzerdir; kapiler elektroforez kapiler borularda gerçekleşen elektroforez olarak tanımlanabilir. CE analizlerinin temeli yüksek voltaj uygulanarak iyonik türlerin tampon çözelti bulunan kapiler kolon içerisinde farklı hızlarda hareket ederek ayrılmasına dayanmaktadır. Keşfedildiği yıllardan bu yana kapiler elektroforez oldukça hızlı, kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir bir teknik olduğunu kanıtlamıştır. Kompleks karışımların kalitatif ve kantitatif analizleri de başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir [2-4].

Gıda ürünlerinin analizleri, örnek matriksinin karmaşıklığı ve analit miktarlarının düşük olması sebebiyle oldukça zordur [5]. CE tekniğinde kullanılmakta olan oldukça küçük iç çaplara sahip kolonlar yöntemin bir diğer avantajı olarak öne çıkmaktadır ve bu avantaj özellikle gıda örneklerinin analizlerinde öne çıkmaktadır. Kolonların basit işlemlerle rejenere edilebilmesi ve az maliyetli olması; gıda içeriklerinin, kimyasal bileşenlerinin ve gıda ürünlerinin güvenilirliklerinin kontrolünün analizlerini rahatlıkla yapılabilmesini sağlamaktadır [6].

Kapiler zon elektroforez (CZE), kapiler elektroforezin en temel, basit ve en çok tercih edilen uygulama şeklidir. Kapiler tüpe doldurulan tampon çözeltinin bileşimi ayırma bölgesinin her noktasında aynıdır ve kapiler kolon boyunca elektrik alan

şiddeti değişmez. Bu çalışma yönteminde ayırım yalnızca iyonik türlerin yük/büyükölük farklılıklarına göre sahip oldukları hızların farkına göre gerçekleşir. CZE ile çalışılırken analitlerin yüklü olması yeterlidir; aksi halde nötral türlerin bu yöntemle ayrılması mümkün değildir. Bu uygulama şeklinde analitler ya da örnek matriksi içerisindeki maddeler kolon iç duvarına yapışmaz ya da etkileşmezler; bu nedenle uygulanması oldukça basittir [7]. CZE ile zahmetsiz ve tekrarlanabilir yeni ayırma metotları geliştirmek ve özellikle gıda örneklerinin analizlerini hızlı ve pratik şekilde gerçekleştirmek pek çok araştırmacının üzerinde çalıştığı konudur.

Biyojenik aminler; azot içeriği yüksek, küçük molekül ağırlıklı organik bazlardır. Biyolojik olarak aktif olan bu bileşikler, düşük miktarlarda canlı organizmaların fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gereklidir; ancak bu moleküller insan vücuduna gıdalar aracılığıyla dışarıdan yüksek miktarlarda alındığında sağlık üzerine olumsuz etki etmektedirler [8-12]. Yüksek miktarlarda vücuda alınan biyojenik aminler gıda zehirlenmelerine yol açabilmektedir ve özellikle hassas kişiler için düşük miktarlarda vücuda alımı bile risk oluşturmaktadır. Bu olumsuz etkilere sebep olan aminlerin başında histamin gelmektedir. Yüksek biyojenik amin içeren gıdaların tüketilmesiyle baş ağrısı, bulantı, terleme, hiper ya da hipotansiyon gibi rahatsızlıklar gözlenirken çok daha ciddi durumlarda beyin kanaması ve ölümle sonuçlanabilmektedir [9, 10, 12, 13].

Gıdalarda biyojenik amin oluşumu, başlıca hijyenik olmayan koşullar altında mikroorganizmaların faaliyetleri ile, serbest haldeki amino asitlerin dekarboksilasyon reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu bileşiklerin miktarları gıdaların kalitesi ve güvenilirliğin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Biyojenik aminler, bazı sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunur; ancak proteince zengin gıdaların, uygun olmayan koşullarda üretimi ve depolanması sırasında miktarları oldukça artabilir. Bu aminleri içeren gıdaların başında histamin bakımından zengin balık yer alırken ikinci ve üçüncü sıralarda et ve et ürünleri ve fermente gıdalar gelmektedir [10, 12-14]. Fermente gıdalar ülkemizde sıklıkla tüketilmekte ve proteince zengin gıdaların başında gelmektedirler. Fermantasyon prosesi sırasında ortam koşulları biyojenik amin oluşumunu doğrudan etkilemektedir. Bununla birlikte biyojenik aminler karsinojenik nitrozaminlerin oluşumundaki öncü bileşiklerdir, putresin, kadaverin ve spermidin gibi poliaminler gıdalara katkı maddesi olarak ilave edilen ya da doğal olarak bulunan tuzlardan nitrit ile etkileşerek nitrozaminleri meydana getirirler [15].

Bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda özellikle proteince zengin gıda ürünlerinin analizlerinin gerçekleştirilmesi için, yüksek etkinlikte çalışan metotların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Biyojenik aminlerin gıda ürünlerinde tayin edilmesini güçleştiren bazı unsurlar bulunmaktadır. Bu unsurların başında gıda ürünlerinin karmaşık örnek matrisine sahip olması ve bu aminlerin gıdalarda düşük konsantrasyonlarda bulunmasıdır[16]. Bugüne dek gıda ürünlerinde bu bileşiklerin kantitatif tayini pek çok farklı kromatografik metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analiz yöntemleri arasında ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi (LC), ELISA ve CE yer almaktadır ve bu alandaki çalışmalar derlemelerde özetlenmiştir [17, 18, 19]. Bu yöntemler arasında CE çok kısa analiz süreleri sağlaması ve gıda ürünleri gibi karışık matrislere sahip örneklerde matrisin sebep olduğu girişimi önlemek için gereken ön işlemleri en aza indirmesi ve kullanılan kolonların düşük maliyetli olması gibi özelliklere sahip olduğundan ön plana çıkmaktadır [20]. Bu bileşiklerin analizlerini zorlaştıran bir diğer neden deteksiyonları sırasında ortaya çıkmaktadır. Bu bileşiklerin, uçuculuklarının düşük olması, kromofor grup taşıması ve floresan özellik göstermemesi sebebiyle tayinlerinin direkt olarak yapılabilmesi için uzun süren türevlendirme işlemine ihtiyaç duyulmaktadır [21, 22].

Ultraviyole ve görünür bölgede düşük absorbanı olan analitlerin tayini CE’de sıklıkla kromofor grup içeren bir tampon çözelti yardımıyla indirekt olarak gerçekleştirilirken, floresan özellik taşımayan analitler için ise uzun süren reaksiyonlar ile analitlere floresan özellik kazandırılması sağlanır [22]. Literatürde biyojenik aminlerin gıdalarda tayini için türevlendirme işleminin uygulandığı çalışmalar yer almaktadır [23-25]. Oysa türevlendirme reaksiyonlarının sebep olduğu, uzun reaksiyon süreleri ve yan reaksiyon ürünlerinin oluşumunun önüne geçmek adına analitlerin hızlı ve direkt olarak tayin edilmesi için son yıllarda kullanılan iletkenlik dedektörleri arasında büyük avantajlara sahip temassız iletkenlik dedektörü (C^4D), evrensel hale gelmiş ve kullanımı gittikçe yaygınlaşmıştır [26].

Temassız iletkenlik dedektörü ile deteksiyon, analit bölgesi ile tampon çözelti arasındaki iletkenlik farkının ölçümüne dayanmaktadır ve tüm yüklü türlerin aynı anda direkt olarak analizi gerçekleştirilir; elektrot yüzeylerinde herhangi bir kimyasal

reaksiyon gerçekleşmez. Bu deteksiyon yöntemiyle, türevlendirme ihtiyacı duyulmadan, analitlerin örnek içerisinde basit bir ekstaksiyon ile elde edilmesi ve yüksek hassasiyette tayini yapılmaktadır ve bu yöntemin kapiler elektroforez ile birleştirilerek kullanılmasıyla yapılan pek çok analiz literatürde yer almaktadır [27, 28].

Kapiler elektroforez tekniği ile gerçekleştirilen biyogenik aminler ile ilgili çalışmalar literatürde derlemelerde bulunmaktadır [17]. Fermente gıdalardan, yoğurt ve kefirin kapiler elektroforezde temassız iletkenlik dedektörü kullanılarak incelendiği ve ev yapımı ürünlerle karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, dört önemli biyogenik amin histamin, kadaverin, putresin ve spermidinin gıda örnekleri içerisindeki kantitatif analizleri temassız iletkenlik dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için yeni bir CZE - C^4D metodu geliştirilmiştir ve oldukça iyi deteksiyon limitleri elde edilmiştir. CZE için analiz prensibi yüklü türlerin, yüksek voltaj uygulanan kapiler silika kolonlar içerisinde oluşan güçlü yığın akışı, elektroosmotik akış altında anot yönünden katoda doğru hareket ederken kendi yük/büyüklik oranlarına bağlı olarak hızlarında oluşan farklılıklara göre ayrılmasına dayandığından, biyogenik aminlerin bu prensibe göre ayrılmalarının sağlanması için bazik özellik göstermelerinden yararlanılmıştır. Asidik çözeltelerde protonlanabilen biyogenik aminler ($R-NH_3^+$) katyonik türler haline gelirler ve dedekte edilirler [22]. Proteince zengin ve sıklıkla tüketilmekte olan fermente ürünlerden tam yağlı beyaz peynir, hazır yoğurt ve fermentasyon prosesinin endüstriyel koşullarda gerçekleştirilmediği, ev yapımı yoğurt ve kefir içerisindeki biyogenik amin miktarları oldukça kısa bir sürede direkt olarak başarı ile tayin edilmiştir. Tüm yüklü türler gibi biyogenik aminler de bu çalışmada katoda yakın bir konuma yerleştirilmiş olan dedektöre yönelmiş; zahmetsiz örnek hazırlama prosedürlerinin ardından doğrudan enjeksiyonları sonucu tayin edilmişlerdir.

2.KAPİLER ELEKTROFOREZ

Kapiler elektroforez, 1980’li yıllarda tanıtılmış bir ayırma ve analiz metodu olarak diğer kromatografik yöntemlere göre oldukça yeni olmasına rağmen yaygın olarak kullanılmaktadır. CE ile çok küçük iyonlardan DNA gibi büyük moleküllere kadar farklı boyutlarda maddelerin analizi yapılabilmekte; yüklü ya da yüksüz, kiral ya da akiral bileşikler kapiler elektroforez metodu ile ayrılabilir. Kapiler elektroforezin ortaya çıkmasıyla kullanılan oldukça ince kolonlar yüksek voltaj uygulanabilirliği sağladığı için hızlı analiz yapma imkânı dışında, daha az örnek ve madde sarfiyatı ve kolay temizlenebildiği içinse basit örnek hazırlama prosedürleri gibi pek çok avantajı da beraberinde getirmiştir. Kullanılan kolonlar pek çok örneğin analizini yapmayı kolaylaştırmış ve gıda analizlerinde, klinik amaçlarla, farmasötik ve çevresel konularda yapılan çalışmalarda kendisine yer bulmuştur [6, 29].

2.1 Kapiler Elektroforezin Tarihsel Gelişimi

Elektroforez; yüklü parçacıkların elektrik alan etkisiyle, diferansiyel göç hızlarına göre farklı hızlarda hareketleri sonucu ayrılması olarak tanımlanmaktadır ve CE’nin temelini oluşturmaktadır. Bu ayırma tekniği ilk olarak Tiselius tarafından 1937 yılında uygulanmıştır. Geliştirdiği yöntem ile serum proteinleri üzerine yaptığı çalışmalar sonucu 1948 yılında Nobel ödülü kazanan İsveçli biyokimyager Arne Tiselius, protein karışımlarının ayrılması üzerinde çalışmış ve başarılı olmuştur. Tampon çözelti ile dolu bir tüp içerisine ilave edilen örnek karışımına uygulanan doğru akım sonucu oluşan elektrik alan altında örnek içerisindeki proteinlerin belirli yönde ve hızda hareket ettiğini gözlemlemiştir. Elektroforez tekniği uzun yıllar süresince protein ve benzer moleküllerin analizi için kullanılmıştır [29, 30].

Tiselius tarafından uygulanan ilk elektroforezde; termal difüzyon ve konveksiyon gibi kısıtlamaların olması daha sonralarda klasik elektroforez olarak adlandırılan tabaka elektroforezin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu elektroforez, poliakrilamid ya da agaroz jel ortamında gerçekleştirilmekte ve çoğunlukla büyüklük farkına dayanan ayırmalarda kullanılmaktadır [30].

1967 yılında Hijerten ilk kez jel ile doldurulmuş 3 mm genişliğinde cam borular içerisinde birçok analiti birbirinden ayırmayı başarmıştır. Burada kullanılan tüplerin genişlikleri milimetre mertebesindedir; ancak zaman içerisinde bu genişlik μm cinsinden ifade edilmiştir. Virtanen ve onun ardından Mikkers ve Everaerts bu yöntemi geliştirmişlerdir. Konveksiyon sebebiyle ortaya çıkan sorunun çözümü için duvar etkisi olarak bilinen konsepti 1979 yılında Mikkers ve çalışma arkadaşları ortaya koymuşlardır. İlerleyen zamanlarda teflondan yapılmış ve 200 μm iç çapa sahip tüplerde ayırmayı gerçekleştirmişlerdir. Uygulanan yöntemin en büyük dezavantajı düşük konsantrasyonlarda ki analitlerin tayini olmuş bu sorun da modern cihaz tasarımına geçilmesinin önünü açmıştır. [31].

1980'li yıllara gelindiğinde Jorgenson ve Lukacs yöntemi oldukça geliştirmiş, modern kapiler elektroforezi tanıtmışlardır; yöntemde 75 μm iç çapa sahip, 1 metre uzunluğunda eritilmiş silika kapilerler kullanılmış ve floresan özellik kazandırılmış amino asit ve peptitler tayin edilmiştir. Yöntemin ayırım gücü yani rezolüsyon ile sistemin şartları arasındaki ilişkiye açıklık getiren Jorgenson; kapiler elektroforez yönteminin teorisini de açıklamış ve yöntemin gücünü ispat etmiştir. CE, sonrasında hızla yükselişe geçen bir teknik haline gelmiş ve pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır [29-31].

2.2 Kapiler Elektroforez İle Klasik Elektroforezin Farkları

Elektroforetik ayırmada uygulanan iki farklı yönteminden biri tabaka elektroforezi diğeri kapiler elektroforezdir. Tabaka elektroforezi yıllarca yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin ayrılmasında kullanılan klasik yöntem olmakla birlikte günümüzde de geliştirilmiş farklı destek ortamları ile tercih edilmektedir. Son yıllarda popülerlik kazanmış ve elektroforezin enstrümental bir versiyonu olan kapiler elektroforez ise çok sayıda avantajı ile beraber çoğu durumda tabaka elektroforezinin yerini almıştır. Klasik jel elektroforez ve kapiler elektroforez tekniği ile gerçekleştirilen analizin karşılaştırması yapılmak istenirse çizelge 2.1 elde edilebilir.

Çizelge 2.1 : Klasik elektroforez ile CE arasındaki temel farklar [4, 30].

Kapiler Elektroforez	Klasik Elektroforez
Yüksek voltaj uygulanabilirliği	Düşük voltaj uygulanabilirliği
Yüksek ayırım gücü ve kısa analiz süresi	Uzun analiz süreleri
Az miktarda örnek ve madde sarfiyatı	Daha fazla örnek ihtiyacı
Otomatizasyon imkânı	Manuel çalışma
Çok geniş alanlarda, farklı özelliklerde analitlerle çalışma imkânı	Sınırlı sayıda madde ile çalışma imkânı
Standardizasyon imkânı	Değişken şartlar

2.3 Kapiler Elektroforezde Kullanılan Terimler

2.3.1 Elektroforetik mobilité

Elektroforezde iyonların birbirlerinden ayrılması, elektrik alan altında farklı hızlarda ki hareketine dayanır. İki uçta bulunan elektrotlar vasıtasıyla uygulanan doğru akım ile bir elektrottan diğerine doğru hareketlenen iyonik türler kendilerine özgü hızlarda göç eder. Yüklü bir taneciğin göç hızını etkileyen iki faktör vardır. Bunlardan ilki elektrik alanın şiddeti, E ($V.cm^{-1}$), diğeri ise elektroforetik hareketlilik ya da diğeri adıyla mobilitedir, μ_e ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) . Bu iki terimin çarpımı ilgili iyonun göç hızını verir [32].

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

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

v = iyon göç hızı

μ_e = elektroforetik hareketlilik

E = uygulanan elektrik alan

L = kapiler kolonun uzunluğu

Eşitlikte ifade edildiği gibi elektrik alanın şiddeti uygulanan voltajla doğru, kapiler kolonun uzunluğuyla ters orantılıdır. İyonların göç hızı uygulanan voltajın artmasıyla artmaktadır.

Bir iyonun elektroforetik mobilitesi, belirtilen şartlarda sabit bir değerde olup iyonların karakteristik özelliğidir. Tüm iyonik türlerin elektroforetik hareketliliği, onlara etkiyen elektriksel kuvvet ile ortamdaki sürtünme kuvveti ile orantılıdır ve bu iki kuvvet birbirini dengelediğinde elektroforetik hareketlilik hesaplanabilir [30, 32].

$$\mu_e \propto \frac{\text{Elektriksel Kuvvet (FE)}}{\text{Sürtünme Kuvveti (FS)}} \quad (2.3)$$

Elektriksel Kuvvet,

$$F_E = q E \quad (2.4)$$

Küresel olduğu varsayılan bir iyonun Stoke's yasası uyarınca sürtünme kuvveti,

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

eşitlikleri ile ifade edilir. Burada;

q = iyon yükü

η = çözeltinin viskozitesi

r = iyonun yarıçapı

v = iyonun hareket hızı

Elektroforez süresince bu iki kuvvet birbirine eşit ve zıttır.

$$F_E = - F_S \quad (2.6)$$

$$qE = - 6 \pi \eta r v \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte hız yerine 2.1 nolu eşitlik yazılır ve çözülürse elektroforetik mobilite elde edilmiş olur.

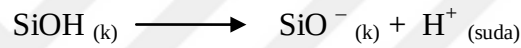
$$\mu_e = q / 6 \pi \eta r \quad (2.8)$$

Eşitliğe göre bir taneciğin elektroforetik mobilitesi onun yükü ile doğru, yarıçapı ile ters orantılıdır. Yarıçapı küçük ve yükü fazla olan tanecikler daha hızlı hareket etmelerine sebep olan yüksek mobilitelere sahipken; büyük yarıçaplı ve yükü az olan taneciklerin mobiliteleri düşük olduğundan yavaş hareket ederler.

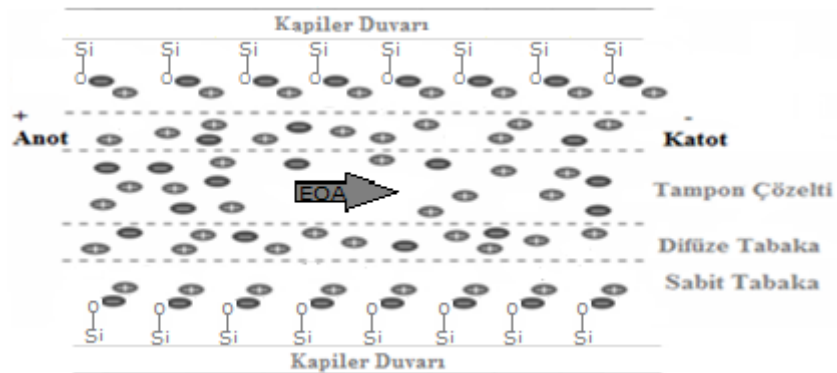
2.3.2 Elektroosmotik akış

Kapiler elektroforez ile gerçekleştirilen analiz ve ayırmanın temeli elektroosmoz olayına dayanmaktadır. Kapiler içerisinde bulunan elektrolit çözeltinin kapiler boyunca meydana getirdiği yığın akışı elektroosmotik akış (EOA) olarak adlandırılır. Bu akış iyonik çözelti ortamına uygulanan yüksek gerilim sonucu meydana gelmekte ve kolon içerisinde bulunan tüm iyonik türlerin hareket etmesine sebep olmaktadır.

Bu çözücü akışının meydana gelmesi için eritilmiş silika kapilerin iç duvarındaki asidik silanol (SiOH) gruplarının negatif yüklenmesi gerekmektedir. Tampon çözeltiyle temas halinde olan kapiler iç duvarının disosiasyon derecesi elektrolit çözelti pH değerlerine bağlı olarak belirlenir. Silanol grupları tampon çözelti pH'nın düşük olması halinde değişikliğe uğramazken, tampon çözelti pH'nın 3 ve üzerinde olduğu durumlarda disosiasyona uğrar ve negatif yüklü hale gelir (SiO⁻) [30-33].

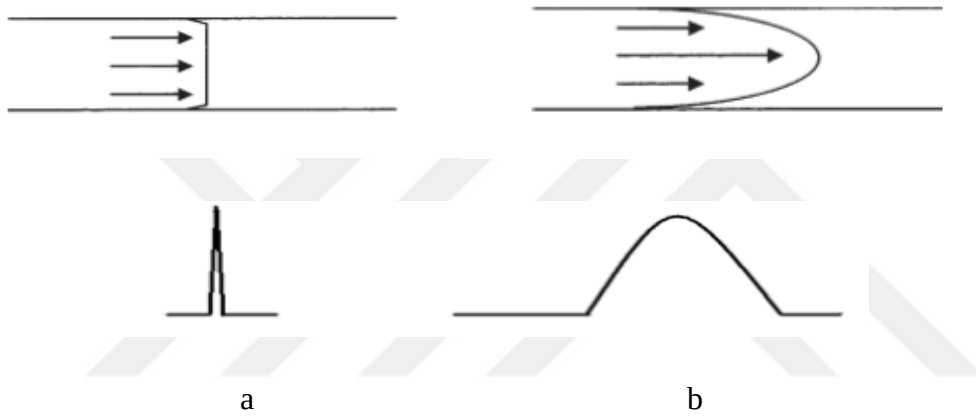


Kapiler iç duvarındaki negatif yüklenme sonucu elektronötraliyetin korunmasını sağlamaya çalışan katyonik türler bu negatif yüzeye çekilir. Duvara yaklaşan katyonik türler ilk olarak kapiler duvarına oldukça yakın, sabit bir tabaka olan Stern tabakası isimli tabakayı meydana getirir; ardından katyonca zengin olan difüze tabaka meydana gelir. Bu kapiler kolona voltaj uygulandığında oluşan elektrik alan altında su veya diğer çözücüler tarafından çevrilmiş olan hareketli pozitif yükler katot yönünde hızlı bir şekilde hareket ederken beraberlerinde çözücü de sürükler ve güçlü yığın akışını meydana getirirler [33, 34]. Şekil 2.1'de Kapiler içerisinde meydana gelen EOA gösterilmektedir.



Şekil 2.1 : Kapiler iç duvarındaki elektriksel çift tabaka ve EOA.

Sıvı kromatografisinde olduğu gibi basınç uygulanarak gerçekleştirilen ayırmalarda hareketli fazın sabit fazla temas ettiği yüzeylerde, meydana gelen sürtünme kuvvetinin etkisiyle akış parabolik bir profile sahip olur ve kolon boyunca bu şekilde devam eder. Bunun etkisiyle kolonun orta kısımlarında akış hızı daha yüksekken sabit faza yaklaştığı yerlerde neredeyse sıfıra düşer ve basıncın kolon boyunca önemli ölçüde düşmesine sebep olur. Kapiler elektroforezde ise basınç uygulaması yerine elektrik alan kullanıldığından akış kolon boyunca oldukça düzenli ilerler kolonun çok yakınında hız sıfıra yaklaşırsa bile basınç değişimi olmadığından kolon boyunca bir değişim göstermez bu nedenle ayırım etkinliği yüksek, elde edilen pikler oldukça keskindir [35].



Şekil 2.2 : (a) EOA profili (b) Basınçla meydana gelen laminar akış profili [29].

EOA mobilitesi ve hızının belirlenmesi için bazı matematiksel eşitliklerden yararlanılır. Kapiler iç duvarında yük dengesinin sağlanması sırasında oluşan elektriksel çift tabaka bir potansiyel farkı meydana getirmektedir. Bu potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir ve aşağıdaki eşitlikle gösterilir [36].

$$\xi = 4 \pi \eta \mu_{eo} / \varepsilon \quad (2.9)$$

η : Elektrolit çözeltinin viskozitesi

μ_{eo} : Elektroosmotik akış

ε : Elektrolit çözeltinin dielektrik sabiti

Elektroosmotik akış hızı, elektriksel çift tabakada oluşan zeta potansiyeline ve elektrik alanın şiddetine doğrudan bağlıdır [36].

$$v_{EOA} = \frac{\epsilon E \xi}{4 \pi \eta} \quad (2.10)$$

v_{EOA} : Elektroosmotik akış hızı

E : Elektrik alan şiddeti

η : Elektrolit çözeltinin viskozitesi

Buradan yola çıkarak EOA'nın elektroforetik mobilitesi şu şekilde hesaplanabilir [34, 36].

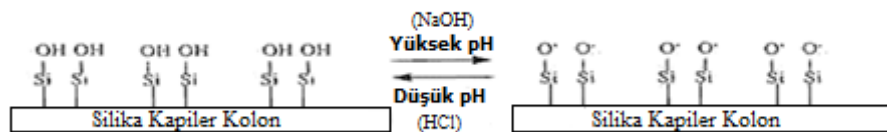
$$\mu_{EOA} = v_{EOA} / E \quad (2.11)$$

μ_{EOA} = Elektroosmotik akışın mobilitesi

2.3.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler

a) Tampon çözeltinin pH değeri

pH değeri ile elektroosmotik akış mobilitesi doğrudan ilişkilidir. Daha önce de belirtildiği gibi elektroosmoz olayının meydana gelmesi için kapiler iç duvarındaki silanol gruplarının negatif yüklenmesi gereklidir. İyonizasyon derecesi ise pH değeri ile bağlantılıdır. Yüksek pH değerlerinde silanol grupları tamamen iyonlaşacağından kapiler iç duvarındaki yük yoğunluğu artar, bunun sonucunda yüksek bir zeta potansiyeli ve kalın bir elektriksel çift tabaka meydana gelir. Dolayısıyla elektroosmotik akış mobilitesi artar ve EOA hızlanır, analitlerin dedektöre ulaşma süresi kısalır. Bunun aksine düşük pH değerleri ortamdaki H_3O^+ iyon derişimini arttırdığı için, silanol gruplarının iyonlaşma derecesini azaltır, EOA hızı düşer, analitler daha uzun sürelerde dedektöre ulaşır. Analiz için uygun pH değeri seçilirken analitlerin seçilen pH'tan etkilenmemesi ve bozunmamasına dikkat edilmelidir [37].



Şekil 2.3 : pH ile silanol gruplarının iyonizasyon derecesi ilişkisi.

b) Tampon çözelti konsantrasyonu

Tampon çözelti derişimi veya başka bir deyişle iyonik şiddetin artışı elektroosmotik akışın yavaşlamasına ve analitlerin dedektöre daha geç ulaşmasına sebep olur. Ortamdaki iyonik türlerin artışı kapiler kolon içerisinde joule ısısı adı verilen bir ısı meydana getirir, bunun sonucunda da sistem sıcaklığı düşürmeye çalışır ve akışın yavaşlamasına neden olur [38, 39].

c) Sıcaklık

Analiz esnasında sıcaklığın artması, tampon çözeltinin viskozitesini azaltacağından EOA hızının artmasına sebep olur. Örnek olarak verilmek gerekirse, suyun sıcaklığının 1 °C arttırılması halinde viskozitesi % 2.4 oranında düşer. Analiz sırasında sıcaklığın sabit tutulması EOA'nın sabit kalması ve termal ısınmayı önlemek açısından önemlidir [38].

d) Elektrik alan şiddeti

Voltajda meydana gelen herhangi bir değişim öncelikle elektrik alanı ve dolayısıyla elektroosmotik akış hızını etkiler. Voltajın artması elektrik alanı arttıracığından EOA artacaktır [32]. Dolayısıyla analitlerin dedektöre ulaşma süreleri kısalacaktır. Analiz sırasında bu değişikliklerin önüne geçebilmek için voltajın sabit kalması istenmektedir.

e) Organik solvent ilavesi

Tampon çözeltiye ilave edilen organik maddeler viskozite ve zeta potansiyelini etkilemektedir. Genellikle kapiler kolonda meydana gelen akımın düşmesine sebep olduğundan elektroosmotik akış hızında yavaşlamaya sebep olmaktadır. Düz zincirli alkollerin ilavesi ile viskozitenin arttığı, EOA hızının düştüğü bilinmektedir. Ayrıca tampon çözeltiye katılan organik madde miktarının yüksek olduğu analizlerde sonucun kesinliği de tartışılmaktadır [38].

f) Yüzey aktif madde ilaveleri

Yüzey aktif madde ilave edilmesinin sebebi var olan EOA hızını arttırmak, azaltmak ya da tamamen tersine çevirmektir. Anyonik yüzey aktif maddelerin kullanılması ile kapiler iç duvarında negatif yük yoğunluğu artacağından EOA hızı artarken, katyonik yüzey aktif madde ilavesiyle, duvardaki negatif yük miktarı azaltılarak EOA hızı

azaltılabilir. Katyonik yüzey aktif maddelerin yüksek konsantrasyonda kullanılmasıyla duvar iyonik ve hidrofobik etkileşimlerle beraber pozitif yüklü hale getirilerek EOA yönü katottan anoda doğru çevrilebilir [37, 40].

g) Polimerik madde ilavesi

Tampona ilave edilen hidrofobik ya da hidrofilik özellikteki polimerik maddelerle EOA hızı değiştirilebilir. Yüklü polimerik maddelerle EOA azaltılıp artırılabilir, katyonik polimerlerle EOA azaltılıp, ters çevrilebilir. Nötral polimerler ise elektroosmotik akış hızını oldukça yavaşlatır hatta durdurabilir. Bu maddeler kapiler iç duvarını kaplamak için kullanılmaktadır; polietilenglikol, poliakrilamid gibi polimerler örnek olarak verilebilir [37, 41].

2.3.3 Göç süresi ve görünen mobiliteler

CE ile yapılan bir analiz için, kolonda bulunmayan sabit faz nedeniyle herhangi bir tutulma gerçekleşmediğinden, kolonu terk eden analitlerin geliş süreleri, göç süresi (t_m) olarak belirtilmektedir.

Elektroosmotik akışın etkisinde anodik uçtan enjekte edilen her iyonik tür katoda doğru yönelir ve belirli bir sıra ile detekte edilir. Elektroosmotik akışın gücü tüm iyonları sürüklemeye yetiyor olmasına rağmen hareketli türlerin mobiliteleri belirlenirken dikkate alınması gereken bir konu kendi elektroforetik mobiliteleridir.

Pozitif, nötral ve negatif türler farklı göç sürelerine sahip olsalarda enjekte edildikleri uçtan katot yönünde bulunan dedektöre ulaşır ve detekte edilirler. Bunun sebebi EOA adı verilen hacim akışıdır; ancak türlerin farklı zamanlarda dedektöre ulaşması kendi elektroforetik mobilitelerine de bağlıdır. Türlerin görünen mobiliteleri (μ_g) elektroosmotik akış varlığında sahip oldukları net mobiliteleridir [39]. Türlerin görünen mobiliteleri kolon içerisindeki hızlarını da belirler.

Katyonların hareket yönü de katoda doğru olduğundan kendi mobiliteleri, elektroosmotik mobiliteye katkıda bulunur. Bu sebeple katyonlar en hızlı hareket eden tür haline gelir ve önce detekte edilirler. Nötral türlerin kendi elektroosmotik mobilitesi olmadığından elektroosmotik akışla birlikte aynı mobilitede hareket eder ve aynı anda dedektöre ulaşırlar. Negatif yüklü iyonlar ise katot yönü yerine pozitif anoda doğru hareket etmek isteyeceğinden sahip oldukları elektroforetik mobiliteleri EOA mobilitelerinin büyüklüğünü o oranda düşürür.

Bu sebeple anyonlar en yavaş hareket eden ve kolonu en son terk eden tür haline gelir. Aşağıda görünen mobilite ve türlerin hızları arasındaki ilişkiler belirtilmektedir [30, 37].

$$\mu_g = \mu_e \pm \mu_{EOA} \quad (2.12)$$

$$v_+ = (\mu_{EOA} + \mu_{e+}) E \quad (2.13)$$

$$v_0 = \mu_{EOA} E \quad (2.14)$$

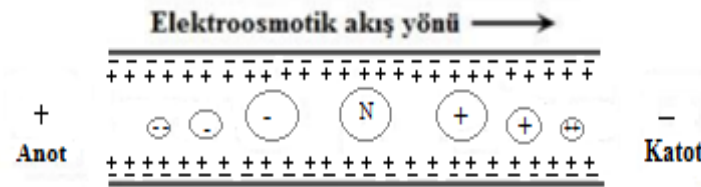
$$v_- = (\mu_{EOA} - \mu_{e-}) E \quad (2.15)$$

μ_g : Görünen mobilite

v : İyonik türlerin hızı

μ_e : Türlerin mobilitesi

Aynı işaretli yüklerin kendi içlerindeki sıralanmaları ise Eşitlik 2.8 uyarınca olur. Yük/büyükük oranı iyonların elektroforetik mobilitelerinin büyüklüğünü etkiler. Yükü fazla; ancak çapı küçük bir katyon yüksek elektroforetik mobilitesi ile elektroosmotik akışın mobilitesine daha fazla katkı yapacağından daha hızlı hareket ederken bunun tersi bir durumda negatif yüklü iyon aksi yöne hareket etmek isterken görünen mobilitesinin düşük olmasına neden olacaktır.



Şekil 2.4 : İyonların kapiler kolonda hızlarıyla bağlantılı geliş sıraları.

Analiz sırasında tayin edilen türlerin göç süreleri ve görünür mobiliteleri bazı deneysel parametreler yardımıyla aşağıdaki formüllerle belirlenebilmektedir [39, 42].

$$t_m = l / v \quad (2.16)$$

t_m : Analitin göç süresi

l : Kapiler kolonun dedektör haznesine kadar olan uzunluğu

v : Analitin hareket hızı

Analitin görünen mobilitesi;

$$\mu_g = l / t E \quad (2.17)$$

l: Kapiler kolonun dedektör haznesine kadar olan uzunluğu

t: Analitin göç süresi

E: Elektrik alan

Elektrik alan eşitlik 2.2 de olduğu gibi yazılacak olursa aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\mu_g = l L / t V \quad (2.18)$$

L: Kapiler kolonun tüm boyu

V: Uygulanan voltaj

Bir kapiler kolon için etkin uzunluk olarak ifade edilen kolon boyu, enjeksiyon ucundan dedektör haznesine kadar olan uzunluğudur.

2.4 Kapiler Elektroforezde Kromatografik Parametreler

2.4.1 Ayırma etkinliği

Kromatografik analizlerde kolon etkinliği önemli bir kavramdır. Bir analiz için teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse analizin o kadar başarılı ve güçlü olduğu kabul edilir. Teorik tabaka sayısının yüksek olmasına karşılık oluşan tabaka yüksekliklerinin küçük olması idealdir. Kapiler elektroforez için de etkinlik hesabı buradan yola çıkılarak yapılmaktadır. Kolon etkinliği (N) aşağıdaki formülle hesaplanabilmektedir [32].

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.19)$$

l: Kapiler kolonun dedektöre kadar olan uzunluğu

σ : Analit pikinin standart sapması

$$N = l / H \quad (2.20)$$

H: Teorik tabaka yüksekliği (HETP)

Analizin gücünü gösteren teorik tabaka sayısını deneysel parametrelerden yararlanarak da hesaplamak mümkündür [38].

$$N = 5,54 \left(t / w_{1/2} \right)^2 \quad (2.21)$$

t: Göç süresi

$w_{1/2}$: Analit pikinin yarı yüksekliğinin genişliği

2.4.2 Bant genişlemesi ve etki eden faktörler

Bir CE analizi süresince analit iyonlarının birbirlerinden farklı mobilitelere sahip olup dar bantlar şeklinde ilerlemesi ve detekte edilmesi istenir. Geniş bantlar yeterince verimli bir ayırımın gerçekleşmediğini gösterirken ve bunun sebebi yalnızca elektroforez için belirlenen şartlara bağlı değildir. Bant genişliği genellikle sistemin bütününe taşıdığı özellikler ile bağlantılıdır.

Pik genişlemesine etki eden başlıca faktörler; boylamasına difüzyon, enjeksiyon miktarının fazla olması, kapiler içerisinde meydana gelen joule ısı, analitlerin duvar adsorpsiyonu ve elektrodispersiyon olarak sıralanabilir. Bu faktörlerin tamamı birbirinden bağımsız olarak meydana gelerek bant genişlemesine sebep olabilir. Bu faktörlerin ve olası diğer etkenlerin yarattığı genişleme toplam bant genişlemesini vermektedir [42, 43].

a) Boylamasına difüzyon

Örnek içerisindeki analit bantlarında bulunan iyonların bir kısmı tampon çözeltinin hiç analit içermeyen bölümlerine, konsantrasyon farkından dolayı difüzlenir. Bununla birlikte daha geniş bir bant meydana gelir. Bu genişlik molekülünün difüzyon katsayısı ve zamana aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi bağlıdır [44, 45].

$$\sigma_{diff}^2 = 2Dt \quad (2.22)$$

D: Analitin difüzyon katsayısı

t: Analit pikinin göç süresi

Yukarıdaki eşitlikten yola çıkıldığında, büyük moleküller için boyuna difüzyondan kaynaklanan pik genişlemesinin, moleküllerin difüzyon katsayıları daha küçük olduğundan daha az olduğu söylenebilir.

CE’de analizler sırasında, boylamasına difüzyonun sebep olduğu bant genişlemesi oldukça önemlidir; aşağıdaki eşitlik teorik tabaka sayısı ile difüzyon katsayısını ilişkilendirmektedir [44-46].

$$N = \mu_e E L / 2 D = \mu_e V l / 2 D L \quad (2.23)$$

μ_e : Analitin elektroforetik hareketliliği

b) Enjeksiyon miktarının yüksekliği

CE analizi sonucunda elde edilecek bant genişliği enjeksiyon sırasında verilen örnek miktarına doğrudan bağlıdır. En çok kullanılan 50 ya da 75 μm iç çapa sahip kapiler kolona verilmesi gereken örnek miktarı birkaç nanolitreyi geçmemelidir.

c) Joule ısısı

Elektrik akımının uygulandığı elektroforez prosesinde kapiler içerisinde meydana gelen akımdan kaynaklanan bir ısı oluşmaktadır. Kapiler içerisinde sıcaklık, voltaj, tamponun iyonik şiddeti gibi akımı arttıran tüm durumlarda joule ısısının meydana gelmesi olasıdır. Joule ısısının etkisiyle kapiler kolonun orta noktaları kenarlara doğru daha fazla ısınır; çünkü kapiler duvarına yakın çözelti oluşan ısıyı transfer edebilmektedir. Bu sebeple kapiler duvarına yakın yerlerde çözelti daha yüksek viskoziteye sahipken orta kısımlarda daha düşük viskoziteye sahip olur ve daha hızlı hareket ederek parabolik bir akış meydana getirir. Bunun sonucunda bant genişlemesi meydana gelir. Joule ısısının oluşumunun önlenmesi için sıcaklık kontrolü çok iyi yapılmalı ve kapiler içerisindeki akımın artmasının önüne geçilmelidir [36, 45].

d) Örneğin duvar adsorpsiyonu

Kapiler iç duvarının negatif yüklü olması örnek içerisinde bulunan pozitif yüklü analitlerin elektrostatik çekim sonucu duvara adsorbe olmasına sebep olabilir. Bu durum özellikle difüzyon katsayısı düşük olan ya da birden fazla yük içeren proteinler gibi büyük moleküllerin analizi sırasında söz konusudur. Pozitif yüklü proteinlerin analizleri sonucunda bant genişliği ve pik şekillerinde bozulmalar gözlenmektedir. Bu sorunun giderilmesi için kapiler duvarındaki negatif yük yoğunluğu azaltılabilir ya da elektroosmotik akış tersine çevrilebilir [45].

e) Elektrodispersiyon

Elektroforez sırasında oluşan elektrodispersiyon enjekte edilen örnek ile tampon çözelti arasındaki iletkenlik farkına dayanır. Başlıca iki durumda elektrodispersiyona bağlı pik genişlemesi gözlenir. Bunlardan ilki kolona enjekte edilen örnek iletkenliğinin, tampon çözelti iletkenliğinden fazla olduğu durumdur. Burada örnek bölgesinin elektrik alan şiddeti düşük olacağından analit iyonları yavaş hareket ederken; ikinci durumda örnek iletkenliği düşük olduğundan elektrik alan şiddeti yükselir ve iyonlar daha hızlı hareket eder. Elektrodispersiyonun sonucu öne ya da arkaya kuyruk yapmış piklerdir. Bant genişliği olmayan pikler için istenen elektrik alan şiddetinin analiz boyunca sabit kalmasıdır [44-46].

2.4.3 Rezolüsyon

Kromatografik yöntemlerde iki pikin birbirinden ayrılıp ayrılmadığının belirlenmesi rezolüsyon hesabına dayanmaktadır. Kapiler elektroforezde de iki analitin birbirinden ayrılıp ayrılmamasının derecesi yani rezolüsyon (R_s) aşağıdaki formülle hesaplanabilir [39].

$$R_s = \frac{2 (t_1 - t_2)}{(w_1 + w_2)} \quad (2.24)$$

t_1 ve t_2 : Analitlerin göç süreleri

w_1 ve w_2 : Analitlere ait piklerin genişlikleri

2.5 Kapiler Elektroforezin Modları

CE yalnızca yüklü türlerin ayrılması için kullanılmamakta ve çok farklı maddelerin analizi için farklı uygulama modlarını bünyesinde barındırmaktadır. Bu modların her biri ayırma mekanizmaları açısından birbirlerinden farklıdır; Örnek vermek gerekirse nötral moleküllerin birbirlerinden ayrılması için misel elektrokinetik kromatografi kullanılırken, jel ortamındaki elektroforezde porlardan geçerek moleküllerin büyüklük farklarına göre ayrılması sağlanır. Aşağıdaki çizelge 2.2’de uygulanan yöntemler ve ayırma mekanizmaları gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 : CE uygulama şekilleri ve ayırma mekanizmaları [30, 31, 33].

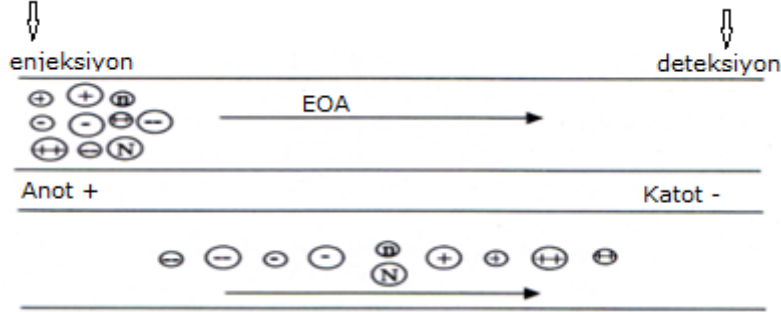
Uygulama Yöntemi	Ayırma Mekanizması
Kapiler Zon Elektroforez	Analitler yük/büyükölük oranına göre ayrılır.
Misel Elektrokinetik Kromatografi	Kritik misel konsantrasyonu üzerinde eklenen yüzey aktif maddelerin oluşturduğu misellerle hidrofobik veya hidrofilik etkileşimlere dayanır.
Kapiler Jel Elektroforez	Makromoleküllerin jel ortamında büyükölük ve şekil farklılıklarına göre ayrılmasına dayanır.
Kapiler Elektrokinetik Kromatografi	Tampona ilave edilen maddeler ile analitlerin etkileşim farklılıklarına dayanır.
Kapiler İzotakoforez	İki farklı iletkenliğe sahip tampon çözelti arasında analitlerin yük/büyükölük oranlarına göre ayrılmasına dayanır.
Kapiler İzoelektronik Odaklama	Kapiler içerisinde kademeli pH değişimi ile proteinlerin izoelektronik noktalarına göre ayrılması esasına dayanır.
Kapiler Elektrokromatografi	Kapiler kolona yerleştirilen sabit faz ile iyonik olmayan türlerin sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımına dayanır.

2.5.1 Kapiler zon elektroforez

Kapiler elektroforezin en basit modu olan kapiler zon elektroforez (CZE) ayırma prensibi olarak analitlerin yük/büyükölük oranlarındaki farklılıklarını esas alır. Analitler, yük/büyükölük oranlarına göre farklı hızlara sahip olur ve kolon boyunca birbirlerinden ayrılırlar. Kapiler elektroforez geliştirildiği ilk yıllarda yüklü moleküllerin ayrılmasını amaçlamıştır ve günümüzde hala en çok bu amaçla kullanılmaktadır. Kapiler zon elektroforez (CZE), yüklü türlerin ayrılmasında kullanılan en basit ve en çok tercih edilen moddur [33-40].

CZE'in ayırma esası kapiler elektroforez prensibinin kendisini tamamen yansıtmaktadır. Tampon çözelti bileşimi ve ayırma şartları kapiler kolon boyunca aynıdır; analitlerin birbirlerinden ayrılması pH, tampon konsantrasyonu gibi parametrelerin değiştirilmesiyle sağlanır ve sulu ya da susuz tampon çözelti ortamında gerçekleştirilebilir.

CZE'nin uygulanması için analitlerin yüklü olması gerekmektedir. Nötral moleküllerin bu yöntemle ayrılması için yüklü hale getirilmesi ya da sistemin modifiye edilmesi gerekmektedir [38, 42].



Şekil 2.5 : CZE ile tüm yüklü türlerin ayrılması.

Kapiler elektroforezde gerçekleştirilecek analiz için uygun çalışma modunun seçilmesi için analitlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Analitlerin pKa değerleri ile oktanol/su için dağılım katsayısı çalışma koşullarının ve modun belirlenmesi için önemli kriterlerdir [44].

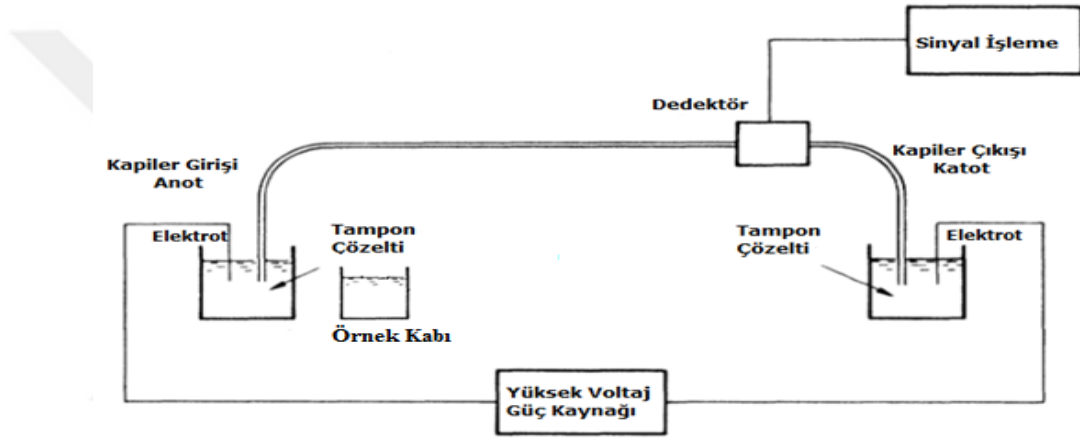
Proton alabilen ya da verebilen maddeler yüklü hale gelebildiklerinden CZE ile ayrılabilirler. CZE gıda analizlerinde en çok tercih edilen moddur; çünkü gıda bileşenlerinin çoğu büyük ölçüde polardır. Bu bileşenler amino, karboksil ya da hidroksil grubu içerirler [44].

Bu tez çalışmasında yüksüz moleküller olan biyojenik aminlerin ayrılması amaçlanmıştır. Biyojenik aminlerin yüksek pKa değerleri dolayısıyla geniş pH aralığında pozitif yüklenebilmeleri esas alınmıştır ve protonlanabildikleri asidik tampon çözelti kullanımı tercih edilmiştir ve CZE yöntemi ile çok kısa sürede doğrudan analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.6 Kapiler Elektroforez Cihaz Tasarımı

Kapiler elektroforez de cihaz tasarımının öne çıkan özelliği; modern olduğu kadar basit bir yapıda olması ve kolay bir araya getirilebilmesidir. Enstrüman tek parça halinde temin edilebilir ya da cihaz bileşenleri ayrı ayrı satın alınarak bir araya getirilebilir; ancak bu durumda sıcaklık kontrolünün sağlanması için gerekli önlemlerin alınması ihmal edilmemelidir [35, 38, 47, 48].

CE cihazı ile gerçekleşen analiz, kolona anodik uçtan verilecek örneğin enjeksiyonu ile başlar. EOA etkisiyle aynı yönde hareket eden türlerin katoda yakın bir konuma yerleştirilen dedektör ile dedekte edilmesi ile son bulur. Analit piklerinin yer aldığı göç zamanına karşı dedektör cevabının gösterildiği elektroferogramlar elde edilir. Bir kapiler elektroforez cihazı başlıca yüksek voltaj sağlayan güç kaynağı, ayırmanın gerçekleştiği kapiler kolon, giriş ve çıkış tampon kapları, elektrotlar, örnek enjeksiyon sistemi, dedektör ve bir sinyal kaydedici ile bağlı bulunduğu bir bilgisayardan oluşmakta ve çoğu ticari cihazda kapilerdeki sıcaklığının gerektiğinde azaltılması ve sabit tutulması için bir termostat bulunmaktadır. Modern kapiler elektroforez cihaz tasarımı şekilde gösterilmektedir [40, 48].



Şekil 2.6 : CE cihazı şematik gösterimi [33].

2.6.1. Yüksek voltaj güç kaynağı

Kapiler elektroforezde kullanılan yüksek voltaj güç kaynağı, elektroosmotik akışın oluşması için voltajı, akımı ve gücü oluşturmaktadır. Bir CE cihazında güç kaynağı maksimum 30 kV'a kadar voltajı, 300 μ A kadar akımı ve 6 W 'a kadar gücü sağlayabilmektedir. Analiz sırasında yüksek voltajlarla çalışıldığı için güç kaynağının gerekli güvenlik mekanizmalarını bulundurması önemlidir. Yüksek voltaj güç kaynağının bir diğer önemli özelliği ise programlanma imkânı sunmasıdır. Bu sayede polarite değiştirilerek EOA yönü ters çevrilebilir [5, 33, 45]. Yapılan çalışmalarda, optimum ayırmanın sağlandığı voltajın seçilmesinin ardından göç sürelerinin tekrarlanabilirliği için güç kaynağının oldukça kararlı olması, voltajın analiz boyunca sabit kalması gerekmektedir.

Voltaj dışında sabit akım ya da sabit güç ile de çalışmak mümkündür ve özellikle sabit akımda çalışmak sıcaklık termostatının bulunmadığı durumlarda tercih edilebilir. Sıcaklık değişimiyle tampon çözelti viskozitesi buna bağlı olarak değişir; ancak sabit akımda çalışıldığında voltaj kendiliğinden düşeceği için göç süreleri bu durumdan büyük oranda etkilenmez [45, 46].

2.6.2. Kapiler kolon

CE'nin önemli bir parçası ayırmanın gerçekleştiği kılcal borulardır. Kapiler kolonların üretiminde en çok eritilmiş silikalar kullanılmaktadır; ancak bunların dışında Teflon ya da borosilikat camlarda kullanılabilmektedir. Silika kapilerin tercih edilme sebepleri arasında; oldukça küçük yarıçaplarda üretilebilmesi, elektromanyetik spektrumun geniş bir bölümünde geçirgen olması, yüksek termal iletkenliğe sahip olması ve kimyasal olarak inert olması yer alır [49]. Silika kapiler daha da dayanıklı hale getirilmesi amacıyla poliimid tabakası ile kaplanmaktadır; ancak UV gibi dedektörlerle çalışılması gereken durumda bu kaplama yakılarak uzaklaştırılır ve birkaç mm uzunluğunda deteksiyon penceresi adı verilen hücre oluşturulur.

Sıklıkla kullanılan silindirik tüp şeklindeki kapiler kolonların iç çapları 20 ile 75 μm iken dış çapları 100 ile 400 μm arasında değişmektedir. Ticari olarak 2-200 μm arasında iç çapta kapiler kolonlar bulmak mümkündür. Bu kolonların boyu 30-100 cm arası değişmektedir [44]. Kolonların dedektör haznesinden çıkışına kadar olan etkin uzunlukları toplam uzunluktan 5 ile 10 cm arası daha kısa olur [45, 50].

Kapiler kolon ilk defa kullanılacaksa, silanol gruplarının şartlanması ve EOA oluşumu için önce 1 M NaOH ile 30 dakika ardından sırasıyla su ve tampon çözeltiyle; gerekli olduğu sürece çalışmalar sırasında 0,1 M NaOH, su ve tampon ile kapiler kolon rejenere edilmelidir.

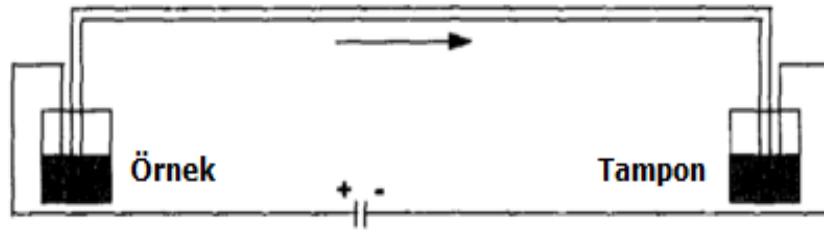
2.6.3 Örnek enjeksiyon sistemleri

Örnek enjeksiyon sistemi aracılığıyla, örneğin kapilerin anodik ucundan dar bir bant şeklinde verilmesi sağlanır ve uygulanan voltajın ardından enjekte edilen örnek katot yönüne hareket eder. CE'nin avantajlarından biri de çok küçük miktarda örnek (2-20 nL gibi küçük hacimde) enjekte edilebilme imkânı sunarak yüksek rezolüsyon sağlamasıdır.

Bir metre uzunluğunda 75 μm genişliğinde bir kolona enjekte edilmesi uygun olan örnek miktarı 5 μL kadardır ve CE’de bu miktarlarda örneğin kolona verilmesi yaygın olarak elektrokinetik ve hidrodinamik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir [33].

2.6.3.1 Elektrokinetik enjeksiyon

Bu oldukça basit yöntemde kapiler kolonun anodik ucu tampon kabından çıkarılarak örnek kabına daldırılır. Bu sırada analiz henüz başlamadığı için voltaj uygulanmamaktadır. Analiz sırasında uygulanacak voltaja kıyasla oldukça düşük bir voltaj çok kısa bir süre, yaklaşık 5-60 saniye, kolon örnek kabındayken uygulanır [51]. Örnekte bulunan analitlerin çok küçük kısmı yavaşça bu kapiler kolonunun içine girmeye başlar. Bu sırada meydana gelen elektrik alan şiddetinin küçük ve voltaj uygulanan sürenin kısa olması, enjekte edilen örnek miktarının oldukça az olmasını sağlamaktadır. Örneğin kolona verilmesinin ardından çok daha yüksek olan ayırma voltajı uygulanır ve analiz tamamlanır.



Şekil 2.7 : Elektrokinetik enjeksiyon [51].

Yöntemin uygulanabilirliği örnek içerisinde bulunan analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır; eğer bu mobiliteler arasındaki fark çok fazlaysa kolonda yavaş hareket eden iyonlardan az, hızlı hareket eden iyonlardan çok fazla bulunan homojen olmayan bir örnek karışımı kolona verilmiş olur. Bu durumda kantitatif olarak hatalı sonuç bulmak olasıdır ve bu gibi durumlarda analizlerin başarılı sonuç vermesi için, iç standart kullanmak gereklidir. Her enjeksiyon sonrası örnek kabındaki örneğin kompozisyonu değişebileceğinden, çözeltinin cihaza verilmeden önce yeniden hazırlanması gereklidir. Bu enjeksiyon yöntemi jele zarar vermediğinden jel elektroforez için oldukça uygundur [51].

Bu yöntemin tekrarlanırlığı hidrodinamik enjeksiyona göre düşüktür. Elektrokinetik enjeksiyon ile verilen örnek miktarı, uygulanan voltaja, süreye, kapiler boyuna aşağıdaki formülde olduğu gibi bağlıdır.

$$w = (\mu_e + \mu_{EOA})\pi r^2 V C t / L \quad (2.25)$$

w: Kolona enjekte edilen örnek miktarı

μ_e : İyonik türün elektroforetik mobilitesi

μ_{EOA} : Elektroosmotik akışın mobilitesi

V: Uygulanan voltaj

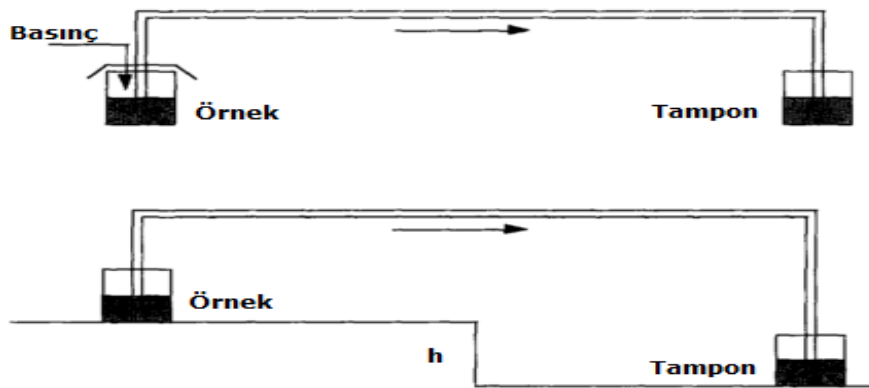
C: Örnek konsantrasyonu

t: Voltajın uygulanma süresi

L: Kapiler boyu

2.6.3.2 Hidrodinamik enjeksiyon

Bu enjeksiyon yönteminde kapilerin iki ucu arasında bir basınç farkı oluşması amaçlanır. Hidrodinamik enjeksiyon için uygulanan ilk yol örnek vialinin onun içine daldırılmış olan kapiler kolon ve elektrotla birlikte kısa bir süreyle yukarı kaldırılmasıyla gerçekleşir. Bu sırada sifon etkisiyle örneğin bir kısmı kapilere dolar ve bu genellikle ticari olmayan cihazlarda tercih edilir. Ticari cihazlarda ise örnek vialine basınç uygulayarak ya da çıkış vialine vakum uygulayarak hidrodinamik enjeksiyon gerçekleştirilir [51, 52].



Şekil 2.8 : Hidrodinamik ve sifon etkisiyle enjeksiyon [51].

Kolona enjekte edilen örnek hacmi Poiseuilles's yasasına göre şu iki formülle hesaplanabilir [49-51].

$$V_e = \Delta P \pi r^4 t / 8 \eta L \quad (2.26)$$

ΔP : Kapiler boyunca oluşan basınç farkı (dyn.cm⁻²)

r: Kapilerin iç çapı (cm)

η : Elektrolit çözeltinin viskozitesi (dyn.s.cm⁻²)

L: Kapilerin tüm boyu (cm)

t: Enjeksiyon süresi (s)

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (2.27)$$

Δh : Örnek vialı ile tampon vialı arasındaki yükselti farkı (cm)

ρ : Örneğin yoğunluğu (kg.m⁻³)

g: Yerçekimi ivmesi (N.kg⁻¹)

2.6.3.3 Örnek sıkıştırma

Her iki enjeksiyon yöntemi için de gerçekleştirilmesi mümkün olan prensiptir. Burada amaç bazı analitlerin deteksiyon limitlerinin iyileştirilmesidir. CE ile enjekte edilen örnek miktarı pik genişlemesine sebebiyet vermemesi için nanolitre mertebesinde dir. Enjekte edilen örnek hacminin arttırılabilmesi için örnek sıkıştırma prensibi uygulanmalıdır. Bu yöntem ile analit çözeltisi, iletkenliği ayrırma tamponundan daha düşük bir çözücüde hazırlanır ve cihaza enjekte edilir. Yöntemin esası tampon çözelti ile analit bölgesi arasında meydana gelen elektrik alan farkına dayanmaktadır. Enjekte edilen örnekteki analit iyonları tampon çözelti ile temas ettiği yüzeye kadar elektroosmotik akış hızından daha hızlı hareket eder. Bu hızlı hareket iki çözelti iletkenliği eşitleninceye kadar devam eder bu sayede daha fazla miktarda örnek cihaza enjekte edilebilir. Elektrik alanın düşük olduğu tampon çözelti bölgesine ulaşan örnek içerisindeki iyonların hızı düştüğünden sıkışarak konsantre bir zon oluşturdıklarından keskin ve dar piklerin elde edilmesi mümkün olur [52].

2.7 Kapiler Elektroferezde Dedektörler

CE analizleri için kullanılan dedektörlerin hassasiyetlerin yüksek olması önemlidir; çünkü kapiler elektroferezde kullanılan kolonlar oldukça küçük iç çaplara sahip olduklarından kolona enjekte edilen örnek miktarı oldukça azdır. Aşağıdaki çizelge CE analizlerinde en çok kullanılan dedektörler ve onların deteksiyon limitlerini göstermektedir.

Çizelge 2.3 : CE için kullanılan dedektörler ve deteksiyon limitleri [53, 54].

Dedektör Çeşitleri	Deteksiyon Limitleri (mol/L)
Direkt UV- Absorpsiyon	$10^{-3} - 10^{-8}$
İndirekt UV- Absorpsiyon	$10^{-4} - 10^{-7}$
Floresans	$10^{-5} - 10^{-9}$
Lazer İndüklenmiş Floresans	$10^{-10} - 10^{-16}$
İndirekt Floresans	$10^{-5} - 10^{-7}$
İletkenlik	$10^{-4} - 10^{-8}$
Amperometrik	$10^{-5} - 10^{-8}$
Potansiyometrik	$10^{-7} - 10^{-8}$
Refraktivite	$\sim 10^{-6}$
Kütle Spektrokopisi	$10^{-8} - 10^{-9}$

2.7.1 İletkenlik dedektörü ile deteksiyon

Son yıllarda iletkenlik deteksiyonu, CE için dikkatleri üzerinde toplamış alternatif bir deteksiyon yöntemi haline gelmiştir ve bunun başlıca sebebi iyonik türlerin birbirlerinden ayrılması üzerinde pek çok çalışma yapılması ve özellikle küçük iyonların tayini için UV dedektörlerin yeterince hassas olmamasıdır [55].

Hassasiyeti yüksek olan deteksiyon yöntemleri arasında iletkenlik dedektörlerinin çalışma prensibi potansiyometrik ve amperometrik dedektörlere kıyasla daha farklıdır. Bu iki deteksiyon yöntemi elektrotların yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonları esas alırken iletkenlik dedektörleri çözeltiyle temas halinde olan iki elektrot arasındaki elektrik sinyalinin ölçümüne dayanır; bu elektrik sinyali deteksiyon hücresine ulaşan çözeltinin iletkenliğidir. Bu yöntemde analitlerin iyon halinde olması gerekmektedir [55, 56].

İletkenlik dedektörü hücresi iki inert elektrottan meydana gelmekte ve yüksek frekanslı alternatif akım uygulanmasıyla deteksiyon gerçekleşmektedir. Alternatif akım uygulanmasının asıl sebebi ise elektrotlarda meydana gelebilecek olası elektroliz reaksiyonlarının önüne geçmektir. Elde edilen sinyaller tampon çözelti ile analitler arasındaki iletkenlik farkını yansıtmaktadır. Tampon çözelti ile analitlerin arasındaki iletkenlik farkı ne kadar fazlaysa dedektör cevabı da o oranda yüksek olur [56].

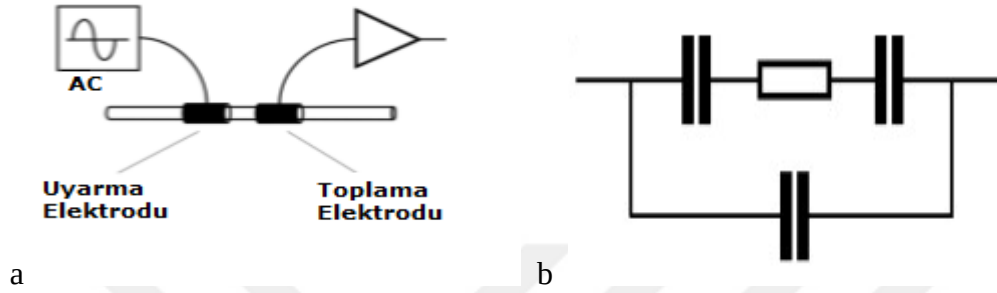
2.7.2 Temassız iletkenlik dedektörü

İletkenlik deteksiyonu için tercih edilebilecek iki moddan biri temassız çalışma modudur. Temas modunda elektrotlar çözelti ile direkt temas halindeyken elektrotlarda bazı kirlenme problemleri meydana gelmektedir. Oysa temassız iletkenlik dedektörü ile bu problemlerin üstesinden gelinmiş; daha stabil, daha güçlü bir deteksiyon yöntemi geliştirilmiştir [57, 58].

Temassız iletkenlik dedektörü (C^4D) kapiler elektroforezle entegre olmadan önce 1950 yılında kullanılmaya başlanmıştır ve avantajları ortaya çıktıkça elektroforez teknikleri ile birlikte birleştirilmek istenmiştir. Bugünkü modern kapiler elektroforez cihaz tasarımı henüz geliştirilmemişken, 1980'li yılların başında izotakoforez yöntemi ile küçük anyonların analizinde temassız iletkenlik dedektörü kullanıldığı ilk kez rapor edilmiştir. Buradaki dedektör tasarımı da günümüzde kullanılmakta olan C^4D tasarımı ile aynı değildir. İlk C^4D hücresi tasarımı ayırmanın gerçekleştiği kolon çevresine dik olarak yerleştirilmiş 4 elektrottan meydana gelmekteydi ve bu hücre tasarımının iç çapı 300 μm genişliğinden daha az olan kolonlara uyum sağlamaması ve daha kullanışlı olan ince kapiler kolon kullanımının yaygınlaşmasıyla yeni bir tasarım geliştirilmiştir [55, 59].

Kapiler elektroforezde kullanılmak üzere, özel olarak geliştirilmiş ilk temassız iletkenlik dedektörü 1998 yılında iki ayrı grubun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Zemmann araştırma grubu ve Fracassi da Silva ve do Lago araştırma grubu kapiler kolonlara tamamen uyumlu silindirik şeklinde iki elektrodun kapiler kolona bağlandığı aksel bir dedektör tasarlamayı başarmışlardır. Bu gelişmenin hemen ardından çok sayıda araştırma ve derlemeler yayınlanmış ve kolayca üretilen bu dedektörün var olan birçok cihaza bağlanması sağlanarak, yüksek hassasiyete sahip analizler gerçekleştirilmiş ve pek çok alanda kullanılmıştır [60-62].

C⁴D tasarımı oldukça basit ve kolaylıkla bir araya getirilebilir komponentler içermektedir. Bu dedektör hücresi temel olarak kapiler kolon etrafını saran iki tane metal boru şeklinde elektrottan oluşmaktadır. Bu elektrotların kalınlıkları 2- 30 mm arasında değişebilmektedir; bu iki elektrot aralarında 1– 5 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilir [59, 63]. Şekil 2.9 ile temassız iletkenlik dedektörünün hücresi gösterilmektedir.



Şekil 2.9 : a. Temassız iletkenlik dedektör hücresi b. Dedektör hücresinin temsil ettiği elektrik devresi [63].

Dedektör hücresinin tasarımında, elektrotlar arasında kalan boşluk dedektörün etkin uzunluğu, deteksiyon hücresinin boyutunu ve iletkenliği ölçülecek örnek hacmini belirler. Elektrotlardan ilki uyarma elektrodu adını alır ve bu elektroda uygulanan alternatif akım (AC) kolona aktarılır ve burada bir dirençle karşılaşır ve oradan da ikinci elektrot olan deteksiyon elektroduna ulaşır. Kolonda karşılaştığı direnç kolon içerisinde geçen maddelerin iletkenliğine bağlıdır. Deteksiyon ya da toplama elektrodu olan ikinci elektrotta toplanan elektrik sinyalleri yükseltilir ve işlenir. Ölçülen sinyal farklılıklarının sebebi ise tampon çözelti ile analit bölgesi arasındaki iletkenliğin farkına işaret etmektedir [56, 58, 63].

2.7.2.1 Temassız iletkenlik dedektörünün avantaj ve dezavantajları

C⁴D günümüzde iletkenlik deteksiyonuna dayalı yöntemler arasında önemli ve ayrıcalıklı bir yer edinmiştir. Temassız iletkenlik dedektörü analitleri parçalamadığından pek çok dedektörle de birlikte kullanılabilir. Chvojka ve arkadaşları temassız iletkenlik dedektörü ile UV dedektörü birlikte kullanarak analiz gerçekleştirmişlerdir. Bu gelişme ile birlikte dedektörün kullanım alanı oldukça genişlemiştir [55, 62, 63]. Aşağıdaki çizelge 2.4 bu dedektörün avantaj ve dezavantajlarını özetlemektedir.

Çizelge 2.4 : C⁴D Deteksiyonu için avantaj ve dezavantajlar [63].

Avantajlar	Dezavantajlar
Tüm yüklü türlerin tayini için uygun ve evrenseldir.	Isı hassasiyetine sahiptir; buna bağlı zemin gürültüsünde kaymalar olabilir.
Basit hücre yapısına sahiptir ve yedek parça ihtiyacı yoktur.	Elektrotlarda meydana gelebilecek elektrolizden kaynaklanan, tampon çözelti kompozisyonundaki değişime karşı hassastır.
Bakımı ve kullanımı oldukça kolaydır. Elektrotların kirlenme problemi yoktur.	Yüksek pH değerlerinde havadan CO ₂ absorptması nedeniyle zemin gürültüsünü etkiler.
Pek çok farklı boyutlardaki kapiler kolonlar ile uyumludur.	Çok yüklü maddeler tampon çözelti içerisinde kullanılamaz.
Düşük maliyetlerle üretilebilir.	
Deteksiyon penceresine ihtiyaç yoktur.	
Kapiler kolonun üzerindeki polimer kaplamanın uzaklaştırılması gerekmez.	
Ticari CE cihazları ile uyumludur.	
Mikroçip CE içinde uygundur.	
Taşınabilir ve oldukça küçük boyutlara sahiptir.	
Yüksek hassasiyetle direkt deteksiyon gerçekleştirilir.	

2.7.2.2 Temassız iletkenlik dedektörünün kullanıldığı alanlar

C⁴D son yıllarda pek çok farklı türden analitin deteksiyonunu başarı ile gerçekleştirmiştir. Bunlardan bazıları inorganik iyonlar, organik iyonlar ve bazı biyomoleküllerdir ve bunlarla ilgili olarak klinik analizler, gıda analizleri ve enantiyomerlerin ve amin türevlerinin direkt olarak türevlendirmeye ihtiyaç duyulmaksızın ayrılmasını içermektedir [63, 64].

Küçük çaplardaki anyon ve katyonların analizleri sıklıkla gerçekleştirilmekte olup, deteksiyon limitleri indirekt UV absorbans dedektörü ile karşılaştırıldığında alkali ve toprak alkali katyonlar ile amonyum için iki kata varan iyileşme olduğu rapor edilmiştir. Organik bileşikler uygun pH seçilerek yüklü hale getirildikten sonra, istenilen tampon çözelti ortamında dedekte edilebilmektedir ve biyomoleküller arasında önemli yere sahip amino asit analizleri başarılı şekilde gerçekleştirilmektedir.

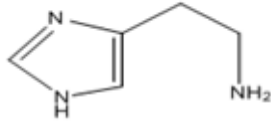
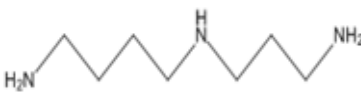
Amino asitlerin düşük UV absorbansları sebebiyle tayinlerindeki güçlüğü önüne geçilmiştir. UV ya da floresan deteksiyonu için gereken bu özelliklerin ilgili analitlere kazandırıldığı türevlendirme prosesine ihtiyaç duyulmadan tayin edilmesi sağlanmıştır. Asetik asit ve kloroasetik asit tamponunda amino asitlerden oluşan bir karışım analiz edilmiştir [65].

Modern C⁴D için kullanım kısıtlaması neredeyse yok denecek kadar azdır. Çalışılan pH ile ilgili herhangi bir limit değer olmaması, polimer kaplı kapiler kolonlarda, deteksiyon penceresi açmak için polimerik kaplamanın uzaklaştırılmasına gerek duyulmadığı gibi UV detektörlerle çalışılırken UV ışını absorpladığı için kullanılmayan organik solventler de bu deteksiyon yönteminde kullanılabilir [66].

3.BİYOJENİK AMİNLER

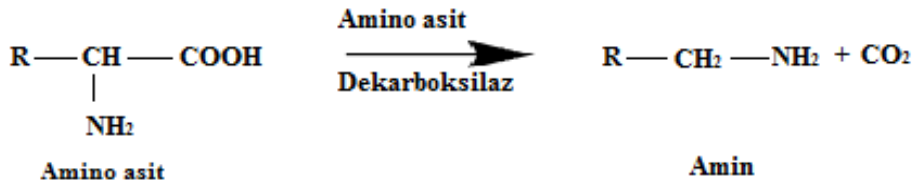
3.1 Biyogenik Aminlerin Genel Özellikleri

Biyogenik aminler; düşük molekül ağırlıklı, biyolojik olarak aktif ve azot içeriği yüksek organik bazlardır ve bu bileşiklerin kimyasal yapılarında amonyakta bulunan hidrojen atomlarından biri, her ikisi ya da üçünün birden alkil ya da aril grupları ile yer değiştirmiştir. Biyogenik aminler için farklı sınıflandırmalar yapılmaktadır. Kimyasal yapılarına göre: putresin, kadaverin, spermin ve spermidin alifatik yapıda, tiramin ve feniletilamin aromatik yapıda, histamin ve triptamin ise heterosiklik yapıdaki biyogenik aminlere verilebilecek örneklerdir. Taşıdıkları amin gruplarının sayısına göre ise tiramin bir monoamindir, histamin, putresin ve kadaverin ise diamin, spermin ile spermidin ise poliamin olarak sınıflandırılmıştır [8-12, 67-69]. Alifatik monoaminler canlılarda yaygın olarak bulunurken, diamin yapısındaki putresin ve poliamin yapısındaki spermidin ve spermin bitki ve hayvanlarda bulunur. Putresin ve spermidin aynı zamanda bakterilerde de bulunan aminlerdendir. Bazı aminlerin yapıları ve pKa değerleri aşağıda özetlenmektedir [69, 70].

Biyogenik Amin	Molekül Formülü	Kimyasal Yapı	Molekül Ağırlığı	pKa
Kadaverin	$C_5H_{14}N_2$		202,2 g/mol	$pK_{a1} = 11,0$ $pK_{a2} = 9,9$
Histamin	$C_5H_{10}N_3$		111,1 g/mol	$pK_{a1} = 9,8$ $pK_{a2} = 6,0$
Putresin	$C_4H_{12}N_2$		82,2 g/mol	$pK_{a1} = 10,8$ $pK_{a2} = 9,4$
Spermidin	$C_7H_{19}N_3$		145,2 g/mol	$pK_{a1} = 9,5$ $pK_{a2} = 10,8$ $pK_{a3} = 11,6$

Şekil 3.1 : Biyogenik aminler ve yapıları.

Bu bileşiklerin biyogenik olarak adlandırılmalarının sebebi canlı organizmaların faaliyetleri sonucunda sentezlenmeleridir; bu bileşikler bitki, hayvan ve mikroorganizmaların doğal metabolik faaliyetleri sonucu üretilebilir ve parçalanabilirler [70]. Bu moleküller gıdalarda başlıca serbest amino asitlerin dekarboksilasyon reaksiyonu sonucunda meydana gelirler ve bu reaksiyonun gerçekleşmesinde enzimlerin ya da dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin rolü büyüktür. Dekarboksilasyon reaksiyonları, amino asitlerden (α -karboksil grubu) CO_2 molekülünün ayrılması reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonda görev alan enzimlere amino asit dekarboksilaz adı verilir. Biyogenik aminler, aynı zamanda hücre içerisinde aldehit ve ketonların aminasyon ya da transaminasyon reaksiyonları ile meydana gelebilirler [68-71, 72].



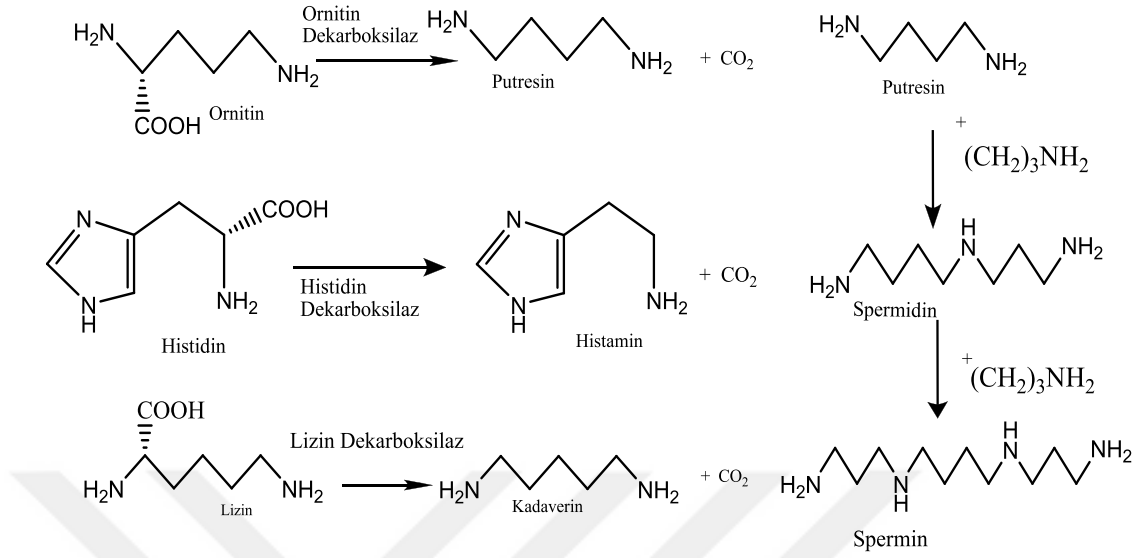
Şekil 3.2 : Dekarboksilasyon reaksiyonu.

Biyogenik aminlerin oluştuğu bu reaksiyonlarda öncü amino asitlerin her biri ilgili biyogenik amini oluşturmaktadır. Spermidin ve spermin art arda putresinin bazı reaksiyonlar sonucu değişikliğe uğraması sonucu oluşmaktadır. Bazı biyogenik aminleri oluşturan öncü amino asitler aşağıdaki çizelgede gösterilmektedir [11, 18].

Çizelge 3.1 : Biyogenik aminleri meydana getiren öncü amino asitler.

Biyogenik Amin Adı	Öncü Amino Asit
Histamin	Histidin
Triptamin	Triptofan
Tiramin	Tirozin
Kadeverin	Lizin
Putresin	Ornitin
β -Feniletilamin	Fenilalanin

Aşağıdaki şekil 3.3 ile biyojenik aminlerin dekarboksilasyon reaksiyonları ile ilgili amino asitlerden oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 3.3 : Biyojenik aminlerin oluşum reaksiyonları.

3.2 Biyojenik Aminlerin Fizyolojik Etkileri

Biyojenik aminler; hormonların, nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezinde rol alırlar. Serotonin gibi bazı biyojenik aminlerin hormon görevi yaptığı, histaminin doku hormonu olarak çalıştığı kabul edilmektedir [71]. Bununla beraber, vücut sıcaklığının ayarlanması, kan basıncının kontrol edilmesi gibi bazı metabolik faaliyetlere ve sinir sistemine etki etmektedirler. Putresin, kadaverin ve spermidinin protein sentezi, nükleik asitlerin fonksiyonlarının regülasyonu ve hücre zarının stabilitesinin sağlanmasında yer aldığı bilinmektedir [73, 74]. Poliaminler, ayrıca hücre yenilenmesi ve çoğalmasında rol oynayıp, DNA, RNA ve protein sentezinin her aşamasında yer alırlar, organların metabolik faaliyetlerine de katıldıklarından bu aminler hızla büyüyen dokularda yüksek miktarlarda bulunurlar, dolayısıyla tümörlerin tedavisi sırasında poliamin sentezi inhibe edilmeye çalışılmaktadır. Bitkilerde putresin, spermin ve spermidin pek çok fizyolojik aktivitede rol almaktadır; hücre bölünmesi, meyve oluşumu gibi prosesler yer almaktadır, dolayısıyla sebze ve meyvelerin içerisinde doğal olarak bulunmaktadır [11, 73, 74].

3.3 Biyojenik Aminlerin Toksik Özellikleri

Yüksek miktarlarda biyojenik amin tüketimi çeşitli rahatsızlıklara sebep olmaktadır; biyojen amin içeriği artmış gıdaların duyuşal özelliklerinin belirgin şekilde değiştii ve bu bileşiklerin miktarlarının da gıdanın tazeliğinin ve kalitesinin göstergesi olduğu bilinmektedir [74, 75].

3.3.1 Biyojenik aminlerin farmakolojik özellikleri

Biyojenik aminler, biyolojik sistemlerde aktif organik bileşiklerden olduğu için yüksek miktarda alımlarında bazı farmakolojik etkiler göstermektedirler. Histamin; düz kasların kasılmasında, damarları genişleterek kan basıncının düşmesinde, mide asidi sekresyonunun artmasında etkili olurken alerjik reaksiyonların belirmesinde de rol oynamaktadır. Bunların yanında adrenalin ve nor adrenalinini ortaya çıkarır. Putresin ve kadaverin ise hipertansiyon, kalp sorunlarının oluşmasına neden olur. Triptamin kan basıncının yükselmesine sebep olurken; tiramin dokulara ulaşan damarların genişliklerinin azalmasına neden olmaktadır. Kan şekeri ve solumunu arttırır. Migrene sebep olur ve noradrenalinin salgılanmasına sebep olur.

Biyojenik aminlerin sebep olduğu zehirlenmeler başlıca histamin alımından kaynaklanmaktadır. 1000 mg/kg üzerinde histamin tüketimi Scomberesidae ve Scombridae familyasına dahil olan uskumru, palamut ya da ton balığı gibi balıkların tüketilmesi sırasında görüldüğü için histamin zehirlenmesi veya scombroid zehirlenmesi olarak adlandırılır. Düşük miktarda alınan histamin canlı metabolizmasında metabolize edilebildiğinden, toksik değildir. Bağırsaklardaki, diaminoksidaz (DAO), monoaminoksidaz (MAO), histamin N-metil transferaz (HNMT) adı verilen enzimler ile histaminin detoksifikasyonu gerçekleştirilir. Bu sistemin genetik olarak ya da çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlarla deaktive olması (enzimlerin çeşitli inhibitörlerle inhibe edilmesi) ya da çok yüksek oranda alınan histamin ve diğer biyojenik aminler farklı derecelerde gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır [76].

Histamin ve diğer biyojenik aminlerin sebep olduğu zehirlenmelerin semptomları gıda tüketildikten yaklaşık 30 ile 60 dakika sonrasında, deride kızarıklık, baş ağrısı, kusma, terleme ve mide krampları şeklinde ortaya çıkmaktadır [76].

Yüksek biyogen amin içeren gıdaların tüketilmesiyle de ortaya şiddetli baş ağrıları, mide bulantısı, kalp-damar rahatsızlıkları, hiper ve hipotansiyon problemleri, beyin kanamalarına hatta ölümlere dahi sebep olabilmektedir [73, 75]. Gıda zehirlenmelerinin başlıca sebebi histaminin gıdalar aracılığıyla vücuda alındığı miktarlara göre farklı toksik etki derecelerine sahip olduğu bilinmektedir [67, 76]. Aşağıdaki çizelge 3.2’ deki gibi sınıflandırma yapılabilir.

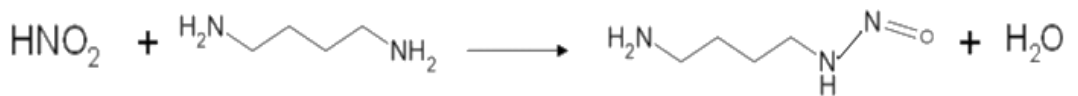
Çizelge 3.2 : Vücuda alınan histamin miktarına bağlı toksik etkileri.

Etki Derecesi	Histamin Miktarı (mg histamin/kg gıda)
Hassas kişileri Etkiler	≤ 8
Hafif Şiddette Toksik Etkiler	8 – 40
Orta Şiddette Toksik Etkiler	40 – 100
Ciddi Zehirlenmeler	≥ 1000

Histaminden kaynaklanan zehirlenmelerden sonra ikinci sırada pek çok peynirde bulunabilen tiraminin neden olduğu zehirlenmeler gelmektedir. Tiramininden kaynaklanan zehirlenmelere peynir reaksiyonu adı verilmektedir. Bu zehirlenmelerin, şiddetli baş ağrısı, beyin kanaması ya da kalp damar problemlerine neden olabildiği bilinmektedir [75].

Putresin, spermin, spermidin ve kadeverin tek başlarına sağlık açısından olumsuz etkiler göstermezler; ancak histamini metabolize eden enzimlerinin inhibe olmasına sebep olarak histamininin toksisitesinin arttırırlar [73, 75].

Bu poliaminlerin bir diğer önemli ve sağlık üzerin olumsuz etkisi ise kanserojen N-nitrözaminlerin oluşumlarına öncülük ediyor olmalarıdır. Özellikle et ürünlerinde koruma amaçlı ilave edilen ya da gıda ürünüde belirli miktarlarda bulunan tuzlardan nitrit ile bu gıdalarla vücuda alınan sekonder aminler yani putresin ve kadaverin gibi biyogenik aminler aşağıdaki reaksiyona sebep olmaktadır. Nitrozamin oluşumunda; bakteriler, pH ve sıcaklık etkili faktörlerdir. Şekildeki reaksiyonda putresin, N-nitrözamin oluşumuna öncülük etmektedir [11, 15, 69].



Şekil 3.4 : Putresin öncülüğünde N-nitrözamin oluşum reaksiyonu.

3.3.2 Biyojenik aminler için yasal limitler

Biyojenik aminlerin neden oldukları toksisiteyle ilgili çok net limitler belirlemek güçtür. Tüketilen gıdanın biyojenik amin içeriğine ve tüketildiği miktara bağlı olarak vücuda farklı miktarlarda alınırlar [77].

Süt ve süt ürünleri için herhangi bir yasal sınır ve limit değeri belirlenmemiştir; ancak literatürde peynir üzerine yapılmış çalışmalar değerlendirildiğinde peynir içerisindeki tüm biyojenik aminlerin toplam miktarı 900 mg/kg sınırını geçmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır [76, 77].

Avrupa Birliği tarafından belirlenmiş olan yasalarda, histamin zehirlenmesinden sorumlu balıklar için, çiğ balıkta 100 mg/kg, tuzlanmış balıklar içinse 200 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri sınırlarında, FDA tarafından ve ülkemizde ise balıklarda histamin seviyesinin 200 mg/kg üzerinde olmaması gerektiği belirtilmiştir. Diğer aminler için toksik dozlar tam olarak belirlenmemekle beraber her öğünde yaklaşık 40 mg üzerinde biyojenik amin alımının toksik etkilere sebep olabileceği belirtilmektedir [77].

3.4 Fermente Gıdalarda Bulunan Biyojenik Aminler

Biyojenik aminler; proteince zengin ve fermente gıdaların üretimi, işlenmesi ve depolanması sırasında ortam koşullarına bağlı olarak oluşmaktadır. Gıdalarda biyojenik amin oluşumunun başlıca sebebi amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonudur ve en çok oluşan biyojenik aminler; histamin, putresin, agmatin, kadaverin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, spermin ve spermidin olarak sıralanmaktadır [78].

Gıdalarda biyojenik amin oluşumu, serbest amino asit varlığı ve amino asit çeşidiyle yani gıdanın doğasıyla ilişkilidir bu nedenle protein bakımından zengin gıdaların mikrobiyal ve biyokimyasal aktivitenin mümkün olduğu ortamlarda bulunduğu biyojenik aminlerin oluşumu kaçınılmazdır. Gıdalarda bulunan biyojenik aminlerin miktarı ve çeşidi, gıda ürünündeki serbest amino asit varlığı, dekarboksilaz aktivitesi olan mikroorganizmaların çeşidi ve sayısı ile ortam koşullarına bağlıdır [72-74, 78].

Fermente gıdalar; ülkemizde oldukça fazla tüketilen, kendilerine özgü tadı olan ve önemli yere sahip besinlerin oluşturduğu gruba verilen isimdir; gıdaların tükettiğimiz tada gelmesi için mayalanması gerekmektedir. Yoğurt, kefir ve peynir gibi süt ürünlerinin evde mayalanarak üretilmesi de oldukça yaygındır. Bu ürünlerin üretim basamakları sütün koagülasyonu, süzülme ve olgunlaşmayı içerir. Bu gibi gıdaların, sağlık açısından faydalı mikroorganizmalar içermeleri, yüksek besin değerlerine sahip olmaları ve antioksidan özelliklerinden dolayı tüketilmeleri tavsiye edilmektedir. Fermente gıdaların, yüksek oranlarda biyojenik amin içermelerinin başlıca sebebi, yüksek oranlarda protein içermeleri ve dekarboksilaz aktivitesine sahip mikrobiyal flora taşımalarıdır [79]. Bu mikrobiyal floranın mevsimsel ve gıdanın kendisine göre değişiklik göstermesi gıda ürünüde bulunan biyojenik amin miktarı ve çeşidini etkilemektedir.

3.4.1 Peynir, yoğurt ve kefir

Peynir; balık ve balık ürünlerinden sonra biyojenik amin oluşumunun en fazla gözlemlendiği gıdadır [73, 78, 79]. Peynirlerin yüksek oranda protein içermesi sebebiyle, uzun süren olgunlaştırma prosesleri boyunca biyojenik amin oluşumu için uygun koşullar meydana gelir. Olgunlaştırma süreleri boyunca duyuşal özellikleri değişmekte olan peynirde biyojenik amin oluşumu sırasında substrat görevini üstlenen serbest amino asitler meydana gelmekte; bu durumda biyojenik amin miktarında artışa neden olmaktadır [78, 79]. Peynir, en çok tüketilen fermente gıdaların başında gelmektedir ve biyojenik amin içeriğinin belirlenmesi ve taşıdığı amin miktarları pek çok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Peynirlerde bulunan başlıca biyojenik aminler ve izole edilen mikroorganizmalar aşağıdaki çizelgede gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 : Peynirden izole edilen mikroorganizmalar ve biyojenik aminler [76].

Gıda Ürünü	İzole Edilen Mikroorganizmalar	Biyojenik Aminler
Peynir	Lactobacillus buchneri, Lactobacillus 30a, L. bulgaricus, L. plantorum, L. casei, L. acidophilus, L. arabinose, Streptococcus faecium S. Mitis, Bacillus macerans	Histamin, Kadaverin, Putresin, Tiramin, β -feniletülenamin, Triptamin

Peynirden alınan biyogenik amin miktarlarının ve çeşidinin incelenmesi için yapılan çalışmada, histaminin en çok bulunduğu gıda ürünleri arasında da üçüncü sıraya sahip peynirde, yaklaşık 13-32,1 mg/kg histamin, 14,3 ile 35,3 mg/kg arasında putresin ve kadaverinin 47 ile 116,1 mg/kg arasında alınabildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte peynirde oluşan yüksek miktarda histamin ve diğer biyogen aminler ürünün uygun ve hijyenik olmayan koşullarda üretildiğinin işareti olarak kabul edilebilir. Yoğurtta peynirde olduğu gibi sütün üretilen fermente gıdalardan biridir. Hazır süzme yoğurtlar olduğu gibi evde istenen tat ve kıvama getirilen yoğurtlar üretilmektedir; ancak burada hammadde kalitesi ile depolama koşullarının önemini arttırmaktadır. Fermantasyon gerçekleşirken bakteriyel aktivitenin artması biyogen aminlerin oluştuğu ortamı sağlamaktadır [79].

Gezginç ve arkadaşları, ev yapımı yoğurtlardan izole ettikleri mikroorganizma olan *Streptococcus thermophilus*'un biyogen amin formasyonuna etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak ise yoğurtta bu mikroorganizmanın düşük miktarda histamin ürettiğini saptamışlardır. Sömer; dayanıklı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin ve biyogen amin içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Türkiye içerisinde beş farklı ilden temin ettiği süzme yoğurtlarda yapmış olduğu çalışmalarda çok düşük miktarda biyogen amin belirlemiştir [73].

Bir süt ürünü olan kefir, etil alkol ve laktik asit fermantasyonu sonucu oluşmaktadır. Kefirin gıda bileşenleri incelendiğinde, üretiminde kullanılan sütün özellikleri ile değişkenlik gösterdiği anlaşılmış ve bir kefir için gıda bileşenleri ortalama %90 (w/v) oranında nem, % 0,2 yağ, % 3 protein, % 6 şeker, %0,7 kül ve %1 oranında etil alkol laktik asit karışımını içerebilmektedir. Orta Asya ülkelerinde ve ülkemizde tüketilen kefirin yapımı yoğurt yapımına benzerlik göstermektedir; ancak kefir sıvı olarak tüketilir. Sindirim sistemi mikroflorasının düzenlenmesinde yardımcı olan bu ürünün içeriği dikkate alındığında sahip olduğu mikroorganizma ve serbest amino asit oluşumu basamakları içermesi sebebiyle biyogenik amin oluşmasının koşullarını hazırlamaktadır. Yapılan bir çalışmada çeşitli hazır kefirlerin biyogenik amin içeriği incelenmiş ve poliaminlerden putresin, kadaverin, spermidin tüm örneklerde belirlenmiş histamin ve tiramin bazı örneklerde belirlenmişlerdir [73, 80].

3.5 Fermente Gıdalarda Biyojenik Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıda ürünlerinde oluşan biyojenik aminlerin belirli değerlerin üzerinde tehlike oluşturmaları onların oluşumunda etkili olan faktörlerin kontrol altına alınmasını gerektirmektedir. Fermente gıdalarda biyojenik amin oluşumunda etkili olan faktörler incelenmiş ve şu şekilde belirtilmiştir: substrat miktarı (serbest amino asit varlığı), pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu ve hammadde kalitesi bu faktörlerdir [73, 74, 78, 79].

Serbest amino asitlerin oluşumu peynir, yoğurt ve kefir gibi gıdaların tümü için biyojenik amin miktarını etkileyen en önemli faktördür. Sütten üretilen bu gıdaların; sütte reaksiyona girmeye hazır histidin amino asidinin oranının düşük olmasına rağmen süt proteinlerinin yüksek oranda histidin içermesi bu faktörün önemini arttırmaktadır. Histidin ve diğer proteinlerin serbest hale gelmesiyle amino asit miktarının yükselmesi olayı olgunlaşma sırasında gözlenen proteolize dayanmaktadır. Peynirler, histidin amino asidini histamine dönüştüren enzim histidin dekarboksilaz aktivitesine sahip olduklarından proteoliz aşaması histamin miktarının önemli derecede arttığı aşama olduğu bilinmektedir [73].

Peynirlerde ayrıca olgunlaşma süreleri de oldukça önemlidir. Bu süre içerisinde sütün pıhtılaşmasına sebep olan enzimler, proteinlerin parçalanmasına yol açar bu da protein ve ardından amino asit miktarında artışa neden olurken bu aşamada sıcaklık kontrolü ve mikrobiyal aktivitenin düşük olduğu hijyenik koşulların sağlanması biyojenik amin miktarının kontrol altına alınmasına yardımcı olur [79, 81].

Enzimatik ya da mikrobiyal aktivitenin en aza indirilmesi, biyojenik aminlerin oluşumunun önüne geçilmesine yardımcı olacağından, depolama sıcaklığı kontrol altında tutulmalıdır. Peynirlerin olgunlaşma süresinin artması biyojenik amin oluşumu için ortam sağlayacağından olgunlaşma süresi boyunca sıcaklık kontrol altına tutulmalı ve çok yükseltilmemelidir. Yüksek sıcaklıklar enzim aktivitesine sahip mikroorganizma sayısını da arttıracığından, biyojenik amin miktarı da artacaktır. Yoğurt ve kefir gibi gıdaların depolanma ve paketlenme sıcaklıkları da bu açıdan önem taşımaktadır ve düşük sıcaklıklarda saklanmalıdır. 20 °C ile 37 °C arasında dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin oluşumu artmaktadır [74, 79, 81].

Süt ve süt ürünlerinde gıdanın kalitesi hammadde olan sütün kalitesi ve biyojenik amin içeriğiyle doğrudan ilişkili olduğu için pastörize edilmiş sütler bu proseslerde tercih edilmelidir.

Biyojen aminlerin oluşumunu etkileyen bir diğer faktör pH olmakla beraber düşük pH değerlerinin amino asit dekarboksilaz aktivitesini güçlendirdiği gözlenmiştir. pH 4,0-5,5 arası amin oluşumu için optimum değerlerdir ve bu değer peynirin oluşumu sırasında, sütün pıhtılaşma sırasındaki kendi pH değeri olan 5,0-6,5 değerlerine yakın olduğundan diğer faktörler kontrol altına alınmalıdır. Histamin oluşumu ile ilgili koşullar incelendiğinde pH 5,0'te, pH 7,0'ye göre histidin dekarboksilaz enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [74, 78, 79, 81].

Gıda ürününün depolanması sırasında NaCl yoğunluğunun artışı (yaklaşık %5), histamin oluşumunda görev alan histidin dekarboksilaz enzim aktivitesini azalttığı gözlenmiştir; ancak bu aktivite KNO₃ varlığında azalma göstermemiştir [74, 76, 77].

3.6 Gıdalarda Biyojenik Amin Analizi

Biyojenik amin miktarları gıda ürünlerinin kalitelerinin belirteçidir. Bunu belirlemek amacıyla gıda üretimi süresince kullanılan hammaddelerinin, oluşan ara ürünlerin, son ürünün ve gıda hazırlama proseslerinin özellikle fermente ürünlerde fermentasyon sürecinin kontrolü bu sayede yapılabilmektedir [75].

Bununla birlikte pek çok üründe biyojenik amin içeriğinin belirlenmeye çalışılmasının amaçları sıralanmak istendiğinde bunlar arasında yeni analiz metotları üretmek ya da var olan metotları geliştirmek, farklı ülke ve bölgelerde üretilen ürünlerin biyojenik amin miktarlarını karşılaştırmak, ürünlerin üretim, depolama ya da paketlenme koşullarının uygunluğunun denetlemek ve biyojenik amin miktarı ile onların oluşumunda rol oynayan mikroorganizma sayısı arasındaki ilişkiyi tanımlayabilmek yer almaktadır [19].

Bu tez çalışmasında biyojenik aminlerin, TCA ile proteinlerin uzaklaştırılmasının ardından tek adımda ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir; ardından örneklerin biyojenik amin içerikleri doğrudan kapiler elektroforez cihazına enjekte edilerek yeni bir analiz metodu geliştirilmiştir.

3.6.1 Kapiler elektroforez ile yapılan biyojenik amin araştırmaları üzerine literatür incelemesi

Biyolojik olarak aktif biyojenik aminlerin gıdalar içerisindeki nitel ve nicel analizi, kapiler elektroforezin hızlı analiz imkanı sunması, hayli yüksek etkinlikte ayırma gücü ve düşük madde kullanımı gibi öne çıkan avantajları ve karışık örnek matrislerine sahip örneklerle çalışma imkanı olması sebebiyle kapiler elektroforezde gerçekleştirilmektedir. Bu analizlerde en çok kullanılmakta olan kapiler elektroforez uygulama şekillerinin CZE ve MEKC olduğu literatüre bakıldığında görülmektedir. Çalışmaların büyük çoğunluğunu, indirekt UV deteksiyonu ve floresan deteksiyonu ile yapılan çalışmalar oluşturmaktadır.

Erim ve grubu, biyojenik aminler için MEKC yöntemi geliştirmişlerdir; kullandıkları yüksüz yüzey aktif madde yardımıyla oluşturulan miseller yardımıyla nar ekşisi ve şarap örneklerinde ve balık örneklerinde bulunan biyojenik aminlerin analizi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde floresan dedektör ile yapılan deteksiyon, analitlerin türevlendirmelerinin ardından gerçekleştirilmiştir [23, 25].

Literatürde sıklıkla biyojenik aminlerin, bu çalışmalarda olduğu gibi MEKC ile tayin edilir; ancak son yıllarda temassız iletkenlik dedektörü ile yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır.

İletkenlik dedektörü kullanarak yapılan çalışmaların ilki çözeltiyle temas halinde olan dedektör tercih edilmiştir. 2006 yılında, Kvasnicka ve grubu biyojenik aminler üzerine çalışmışlardır. Kullandıkları tampon çözelti bileşimi 15 mM Histidin, 5 mM Adiptik asit, 1,5 mM sülfirik asit, 0,1 mM etilendiaminotetraasitik asit, %0,1 hidroksietil selüloz, ve hacimce %50 metanol içermektedir. İncelenen peynir örneğinde yalnızca bir tane biyojenik amin tespit edilmiştir [70].

Bir diğer çalışmada ise farklı aminlerin ayrılması için yeni bir CZE metodu geliştirilmiştir. Gong ve arkadaşları histamin için deteksiyon limitini 266,4 ng/mL olarak bildirmişlerdir [27].

Li ve arkadaşları ise temassız iletkenlik dedektörü kullanarak bazı içeceklerde biyogenik aminlerin varlığı incelenmiştir. Geliştirilen yöntemde 8 adet biyogenik amin CZE ile 24 dakika içerisinde birbirlerinden ayrılmıştır. 500 mM asetik asit ve 150 mM 18-crown-6 tamponu ayırma tamponu olarak seçilmiştir. Yöntemin deteksiyon sınırı 44,3-149 ng/mL değerleri arasında bulunmuştur [82].

Histaminin yüksek miktarlara çıkabildiği balık üzerinde yapılan bir diğer çalışmada Thredgold ve arkadaşları, mikroçip kapiler elektroforez yöntemi ile temassız iletkenlik dedektörü birlikte kullanılmıştır. Bu yöntemde, histamin dondurulmuş balık örneklerinde incelenmiştir. Tampon çözelti pH değeri 6,03 olarak ayarlanmıştır ve bu yöntemde dedeksiyon limiti 0,43 mg/L olarak belirlenmiştir [83].



4. DENEYSEL KISIM

4.1. Malzeme ve Yöntemler

4.1.1 Kullanılan kimyasallar

Kadaverin (Cad), histamin (His) ve putresin (Put) Sigma Aldrich'ten (Steinheim, Almanya); spermidin (Spd), Fluka'dan (Buchs, Almanya) temin edilmiştir.

Tris(hidroksimetil)-aminometan ve sodyum hidroksit Merck'den, α -hidroksiizobütirik asit (HIBA) Fluka'dan, L-Histidin, SHS'den temin edilmiştir. MES (2-(N-morfolin)etansülfonik asit), Sigma Aldrich'ten alınmıştır. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıktadır.

Gıda ürünlerinden tam yağlı beyaz peynir ve hazır yoğurt yerel marketlerden temin edilmiş diğer gıda örnekleri ev koşullarında hazırlanmıştır.

4.1.2 Standart çözeltilerin hazırlanması

Biyojenik aminlerin standart çözeltileri saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Her bir biyojenik amin için yaklaşık 1000 ppm olacak şekilde ana stok çözeltileri, 4 mL saf su içerisinde hazırlanmış; ardından her bir ana stok çözeltisi 100 ppm olacak şekilde ikincil stok çözeltilerine seyreltilmiştir. Tüm çözeltiler 4 °C' de laboratuvarında bulunan buzdolabında saklanmıştır. Her çalışma günü standart çözeltiler stoklardan seyreltilerek yeniden hazırlanmıştır.

4.1.3 Gıda örneklerinin hazırlanması

Peynirin analizi öncesinde katı haldeki peynir kalıbı ezilerek homojen hale getirilmiştir. Tüm gıda örnekleri analiz öncesinde, proteinlerin çöktürülerek uzaklaştırılması ve biyojenik aminlerin ekstrakte edilmesi için %6 (w/v) 10 mL TCA çözeltisi ile muamele edilmiştir. Oluşan süspansiyonlar önce iki dakika boyunca vorteks karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış; ardından 2000 rpm hızla 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak çözelti, katısından Whatman No 41 filtre kağıdı yardımıyla filtrelenerek ayrılmıştır.

Ekstarksiyon işleminin yeniden uygulanmasına gerek duyulmadığı yapılan denemeler ile gözlenmiş; biyojenik aminlerin ekstraksiyonunun tek aşamada gerçekleştiği anlaşılmıştır. Elde edilen örnek ekstraktı deiyonize su ile 10 mL toplam hacme tamamlanmış; örnekler belirlenen en uygun seyreltme oranı olarak 1/25 oranına uygun olarak su ile seyreltilmiş ve mikrofiltrelerden geçirilerek cihaza doğrudan enjekte edilmiştir.

4.2 Cihazlar ve Çalışma Koşulları

Analizler, Prince Technologies (Emmen, Netherlands) firmasına ait kapiler elektroforez cihazı ve buna bağlı Trace Dec marka temassız iletkenlik dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizleri DAX 8.0 Data Acquisition and Analysis programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm çözeltiler, Elga Purelab Option-7-15 model sistemi ile elde edilen ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltilerin pH değerleri Thermo Scientific Orion Dual Star marka pH metre ile ayarlanmıştır. Kullanılan silika kapiler kolon, Polymicro Technologies'den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir.

Analiz için, iç çapı 50 µm toplam uzunluğu 80 cm, etkin uzunluğu 65 cm olan herhangi bir işlem görmemiş silika kapiler kullanılmıştır. Silika kapiler kolon, ilk kullanımından önce 1000 mbar basınç altında 30 dakika boyunca 1 M NaOH ile şartlanmış ardından 10 dakika su ile muamele edilmiştir. Her gün başlarında, 1000 mbar basınç uygulanmasıyla 1 M NaOH ile 15 dakika ardından su ile 10 dakika ve tampon çözelti ile 10 dakika yıkanarak şartlanmıştır. Enjeksiyonlar arasında kapiler kolonun temizlenmesi adına sırasıyla 0,1 M NaOH, su ve tampon çözelti ile ikişer dakika yıkanmıştır.

Örnekler hidrodinamik enjeksiyon ile 60 mbar basınçta 6 saniye süre ile anodik uçtan enjekte edilmiştir. Ayırma sırasında 28,0 kV potansiyel uygulanmış ve sıcaklık 20 °C 'de sabit tutulmuştur. Trace Dec marka temassız iletkenlik dedektörünün uyguladığı çalışma voltajı -12 Db ve sinyal dönüştürücü %100 gain olacak şekilde ayarlanarak çalışılmıştır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1 Metot Optimizasyonu

5.1.1 Tampon çözelti kompozisyonunun optimizasyonu

CE için metot geliştirilmeden önce analiz edilecek bileşiklerin fiziksel ve kimyasal özellikleri bilinmelidir. Bu çalışmada biyojenik aminlerin ayrılması için asidik tampon çözeltilerin kullanılması tercih edilmektedir; bu sayede pozitif yüklü poliaminler, basit ve pratik bir şekilde CZE yöntemiyle tayin edilebilir [70]. Bu çalışmada yüksek pKa değerlerine sahip, bazik biyojenik aminlerin katyonik türler haline gelmesi asidik bir elektrolit çözelti seçilmesiyle sağlanmıştır.

Bununla beraber, iletkenliğin çok yüksek olmadığı tampon çözelti kullanımı Joule ısısını minimum düzeyde tutmayı sağladığından temassız iletkenlik dedektörleri ile tayin gerçekleştirildiğinde önemlidir. Yüksek tampon çözelti konsantrasyonları zemin gürültüsünde karasızlığa sebep olduğu için elektrolit çözelti konsantrasyonu çok yükseltilmemiştir.

CE tekniği ve iletkenlik deteksiyonu birleştirildiğinde, katyonik türlerin ayrılması için en çok kullanılan tampon çözelti bileşiminin farklı konsantrasyonlarda MES/His karışımı olduğu görülmektedir [59]. Bu tampon çözeltiler ile direkt ya da indirekt şekilde iletkenlik deteksiyonu yapılabilmektedir. Bu tez çalışmasında biyojenik aminlerin iyi bir rezolüsyonla ayrılması bu tampon kompozisyonlarında mümkün olmadığına karar verilmiştir.

Tampon çözelti seçimi yapılırken bazı asidik tamponlar denenmiştir. Bu maddeler arasında formik asit, sitrik asit ve asetik asit yer almaktadır. Bu tamponlar ile etkin bir şekilde ayırım sağlamamakla beraber pik sinyalleri oldukça düşük olduğundan başka kimyasallar ile denemeler yapılmıştır. Glisin ve α -hidroksiizobütirik asit (HIBA) ile yapılan çalışmalarda, tampon çözelti olarak, en iyi pik simetrisi ve yüksek sinyaller sağladığından HIBA seçilmiştir.

Tampon çözelti konsantrasyonu belirlenirken 5 ile 50 mM arası HIBA ile dört biyogenik amin karışımı cihaza enjekte edilmiştir. En iyi rezolüsyonun sağlandığı konsantrasyon 15 mM HIBA olarak belirlenmiştir.

Yüksek HIBA konsantrasyonları zemin gürültüsünde artışa sebep olurken, çok düşük HIBA konsantrasyonları biyogenik aminler arası rezolüsyonun düşmesine neden olmuştur.

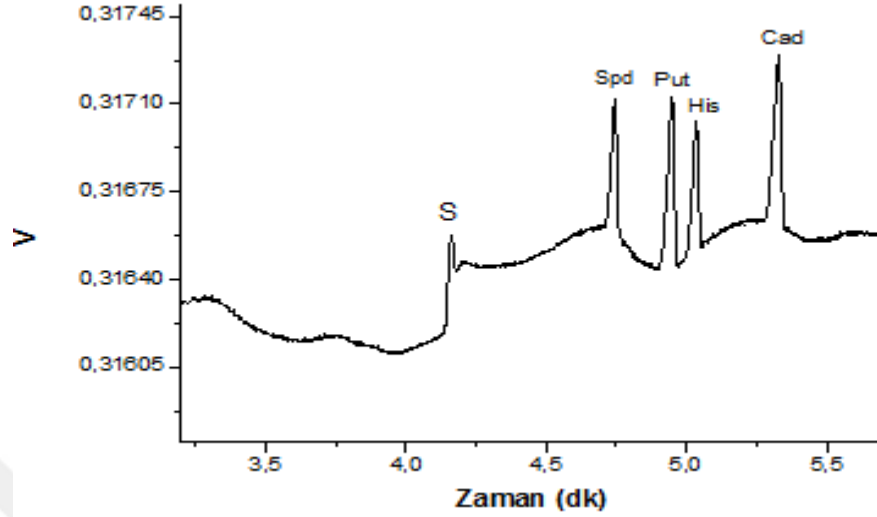
HIBA ile hazırlanan tampon çözelti ile tek başına çalışıldığında analitlerin göç sürelerinde kaymalar meydana geldiği gözlenmiş ve ayırma etkinliğini düşmüştür bu sebeple tampon çözeltiye polimerik madde ilavesi ile EOA hızının azaltılarak hem yüksek ayırma etkinliği elde edilmiştir hem de tekrarlanırlık sağlanmıştır. Kapiler iç duvarındaki negatif yüklenmenin azalması ile EOA hızının yavaşlatılması amacıyla, HPMC (Metilhidroksipropil selüloz) tercih edilmeden önce alkol ilavesi (metanol), Polivinilpirolidon (PVP) ve hidroksietil selüloz (HEC) ile çalışmalar yapılmıştır. HPMC tercih edilmesinin başlıca sebebi zemin gürültüsünde kararsızlığa sebep olmaması ve çok az madde ilavesi ile EOA hızını etkilemiş olması gelmektedir.

HPMC, miktarı belirlenirken kütlece %0,01 ile 6 arası değerler denenmiş en ideal ayırım en az maddenin ilave edildiği %0,01 oranında elde edilmiştir. Daha fazla oranda ilave edilen HPMC, analiz süresinin uzamasına neden olmaktadır.

5.1.2 Tampon çözelti pH değerinin belirlenmesi

Optimum pH değerinin belirlenmesi biyogenik aminlerin analizleri için oldukça önemlidir. Bazik özellik gösteren biyogenik aminlerin pKa değerleri yüksek olduğundan yüklü türler haline gelmeleri sağlanmıştır; bunun için asidik tamponların tercih edilmesi önemlidir. Kullanılan dedektör sebebiyle bazı kısıtlamalara gidilmesi gerektiğinden tampon çözelti pH değeri Tris ile ayarlanmıştır; bu sayede tampon çözelti iyonik şiddeti ve iletkenliği çok fazla yükselmediği için zemin gürültüsünde kararsızlıkların minimum düzeyde tutulması sağlanmış ve kapiler içerisinde Joule ısısı oldukça düşük seviyede kalmıştır. Zemin gürültüsünün en kararlı olduğu pH değerini bulmak adına 2,9 ile 6 değerleri arası tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Yüksek pH değerlerinde EOA hızı artmış ve rezolüsyon düşmüştür. En optimum ayırım pH 3,57 olarak belirlenmiştir.

Belirlenen en uygun tampon çözelti bileşimi; 15 mM HIBA, kütlece % 0,01 HPMC pH 3,57 olarak belirlenmiştir. Aşağıdaki şekilde optimum ayırma şartlarında standart biyojenik aminlere ait elektroferogram gösterilmiştir.



Şekil 5.1 : 1 mg/L standart biyojenik aminlere ait elektroferogram

Ayırma şartları 15 mM HIBA, %0,01 HPMC, pH=3,57

(S: sistem piki, Spd: Spermidin, Put: Putresin, His: Histamin, Cad: Kadaverin).

5.2 Metot Validasyonu

5.2.1 Kalibrasyon doğrularının çizilmesi

Uygun tampon çözelti kompozisyonu belirlendikten sonra dört biyojenik amin için pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlardan lineer kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. En küçük kareler yöntemi ile korelasyon sabiti değerleri hesaplanmıştır. Aşağıdaki çizelgede kalibrasyon grafiği için kullanılan konsantrasyon aralıkları, korelasyon sabitleri ve kalibrasyon denklemleri verilmiştir.

Çizelge 5.1 : Biyojenik aminlerin kalibrasyon doğrusu verileri.

Biyojenik Amin	Lineer Aralık (mg/L)	r^2	Kalibrasyon Denklemi
Spermidin (SPD)	0.2- 6.0	0.9991	$y = 9.008E-06x + 6.85E-07$
Putresin (PUT)	0.2- 6.0	0.9996	$y = 15.32E-06x - 6.46E-08$
Histamin (HIS)	0.2- 6.0	0.9986	$y = 10.966E-06x - 7,67E-07$
Kadaverin (CAD)	0.2- 6.0	0.9981	$y = 14.6E-06x + 3.37E-06$

5.2.2 Tekrarlanabilirlik çalışmaları

Yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmaları 1 mg/L, biyogenik aminlerden oluşan karışımın aynı gün 5 kez arka arkaya enjeksiyonu ile yapılmıştır. Göç süreleri ve düzeltilmiş alan tekrarlanabilirliklerinin % bağıl standart sapma değerleri; hesaplanmış; göç süreleri için spermidin, putresin, histamin ve kadaverin için sırasıyla % 0,24 , % 0,25, % 0,26 ve % 0,28 düzeltilmiş alan içinse % 4,25, % 2,39, % 3,92 ve % 2,35 olarak bulunmuştur. Günler arasındaki tekrarlanabilirlik çalışmaları ise 3 ayrı gün 5 kez arka arkaya verilen standart çözelti ile yapılmış; % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Analitlerin göç süreleri için bağıl standart sapma % 1,62 ile % 2,91 arasında bulunmuş olup düzeltilmiş alanlar için ise % 3,15 ile % 8,14 arasında bulunmuştur.

5.2.3 LOD ve LOQ değerleri

LOD (dedekte edilebilen en küçük konsantrasyon) ve LOQ (tayin edilebilen en küçük konsantrasyon) sinyal/ gürültü oranının sırasıyla, 3 katı ve 10 katı olacak şekilde her amin için iki ayrı enjeksiyona ait sinyal/büyüklik oranlarından hesaplanıp ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Değerler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 5.2 : Biyogenik aminlere ait LOD ve LOQ değerleri.

Biyogenik Amin	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Spermidin (SPD)	29,08	96,95
Putresin (PUT)	22,79	75,98
Histamin (HIS)	31,60	105,34
Kadaverin (CAD)	23,13	77,10

5.3 Yöntemin Gıda Örneklerine Uygulanması

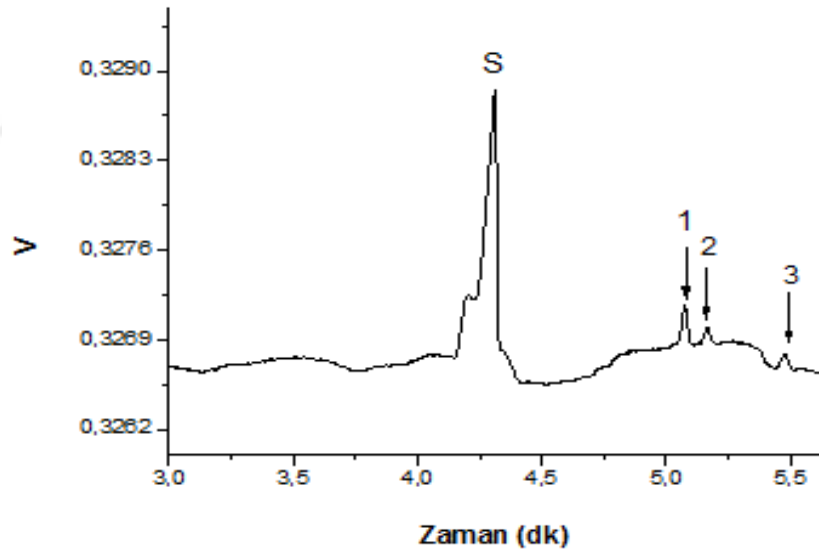
Fermente gıda örnekleri Bölüm 4.4'de açıklandığı gibi hazırlandıktan sonra elde edilen ekstraktlar 0,20 µm çapındaki mikrofiltrelerden filtrelenmiştir. Tüm gıda örnekleri için uygun seyreltme miktarının belirlenmesi için farklı oranlarda seyreltilen örnekler cihaza enjekte edilmiş ve en uygun seyreltme oranının 1/25 olduğu belirlenmiştir. Standart biyogenik amin karışımı seyrelmiş örnek üzerine ilave edilerek örneklerin içerisinde bulunan biyogenik aminler ve yerleri belirlenmiştir.

Aşağıdaki çizelgede gıdalarda bulunan biyojenik amin miktarları verilmiştir. Şekil 5.2, 5.3, 5.4 ve 5.5 ile belirlenen optimum şartlardaki sırasıyla peynir, hazır yoğurt, ev yapımı yoğurt ve ev yapımı kefir ekstraktlarına aittir.

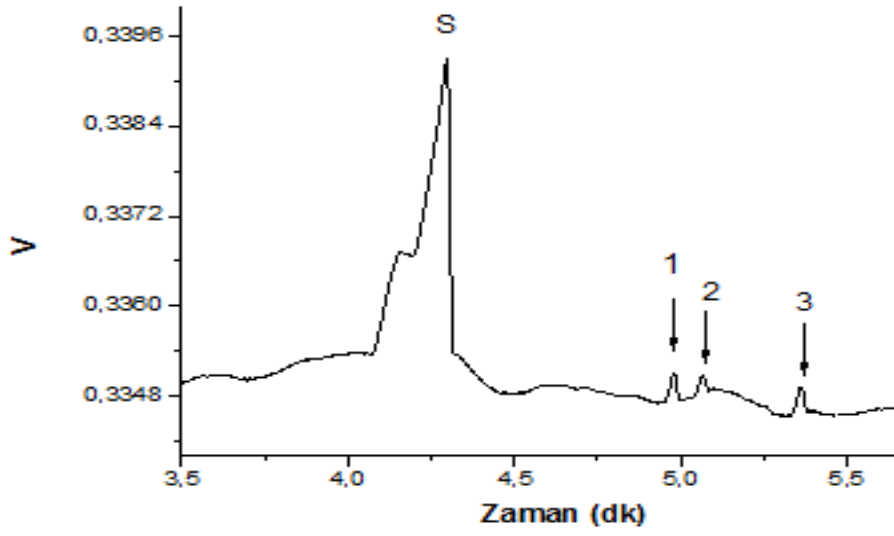
Çizelge 5.3 : Fermente gıdalarda tespit edilen biyojenik amin miktarları.

Gıda Ürünü (mg/kg $\pm$ SS)*	Spermidin (SPD)	Putresin (PUT)	Histamin (HIS)	Kadaverin (CAD)
Beyaz Peynir	-	43,07 ($\pm$ 0,06)	27,49 ($\pm$ 0,01)	22,70 ($\pm$ 0,01)
Hazır Yoğurt	-	47,35 ($\pm$ 0,05)	55,18 ($\pm$ 0,06)	34,83 ($\pm$ 0,08)
Ev Yapımı Yoğurt	-	58,06 ($\pm$ 0,24)	27,79 ($\pm$ 0,22)	12,56 ($\pm$ 0,02)
Ev Yapımı Kefir	-	47,69 ($\pm$ 0,13)	30,82 ($\pm$ 0,11)	24,08 ($\pm$ 0,07)

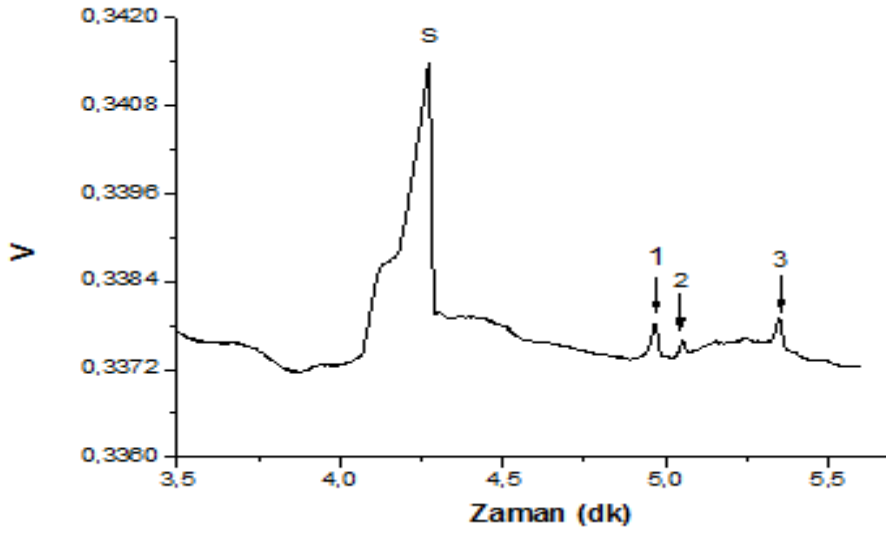
* n=2, SS: Standart Sapma.



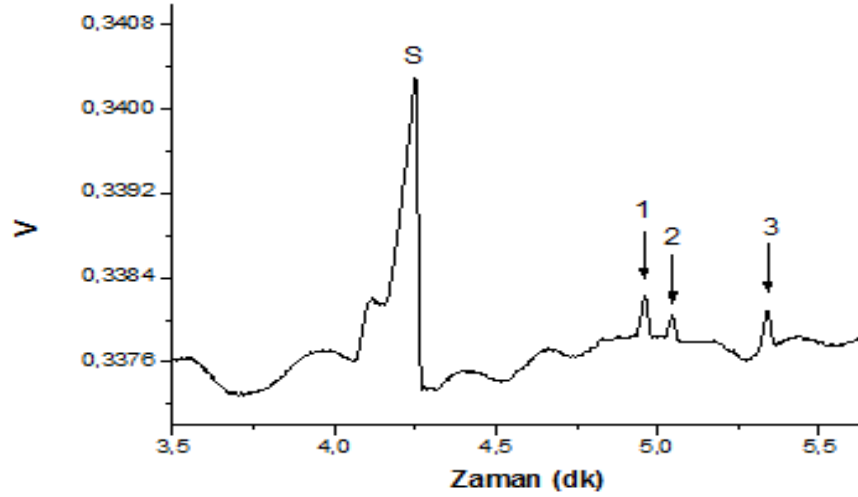
Şekil 5.2 : 1/25 oranında seyreltilmiş beyaz peynir ekstraktının optimum şartlardaki elektroferogramı (S: sistem piki, 1: Putresin, 2: Histamin, 3: Kadaverin).



Şekil 5.3 : 1/25 oranında seyreltilmiş hazır yoğurt ekstraktının optimum şartlardaki elektroferogramı (S: sistem piki, 1: Putresin, 2: Histamin, 3: Kadaverin).



Şekil 5.4 : 1/25 oranında seyreltilmiş ev yapımı yoğurt ekstraktının optimum şartlardaki elektroferogramı (S: sistem piki, 1: Putresin, 2: Histamin, 3: Kadaverin).



Şekil 5.5 : 1/25 oranında seyreltilmiş ev yapımı kefir ekstraktının optimum şartlardaki elektroferogramı (S: sistem piki, 1: Putresin, 2: Histamin, 3: Kadaverin).

Yöntemin güvenilirliğinin test edilmesi amacıyla örnekler üzerinde tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Aynı gün içerisinde örneğin 5 kez art arda enjeksiyonu yapılarak hesaplanan % Bağlı standart sapma değerleri göç süreleri için % 0,79 ile 0,88 arasında düzeltilmiş alan içinse % 4,15 ile 5,78 olarak hesaplanmıştır.

5.4 Metodun Doğruluğunun Tespit Edilmesi

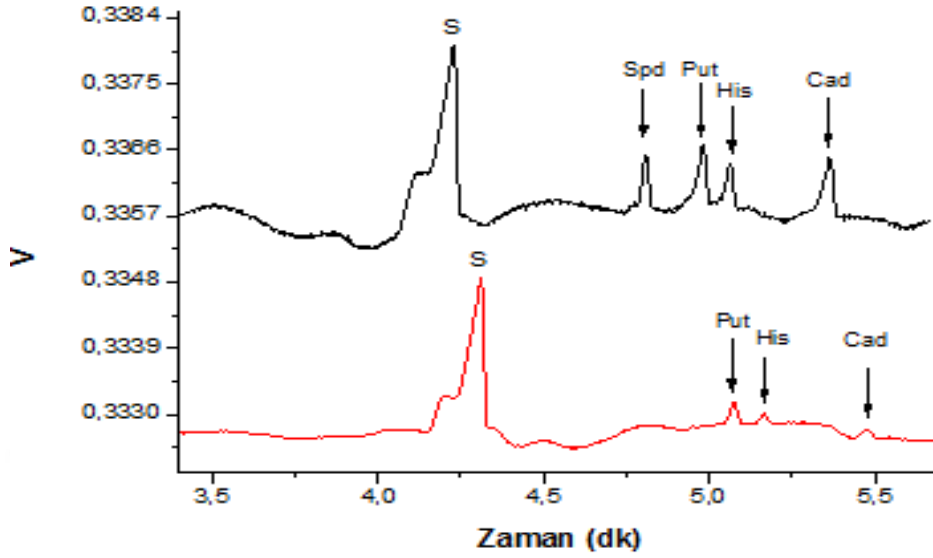
Gerçek örneklerle farklı konsantrasyonlarda ilave edilen biyogenik amin standartları ile geri kazanım çalışmaları yapılarak metodun doğruluğu saptanmıştır. Aşağıdaki çizelge 5.4 iki farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen geri kazanım sonuçlarını göstermektedir. İki enjeksiyonun ortalaması alınmış, standart sapma değerleri parantez içerisinde belirtilmiştir.

Çizelge 5.4 : Fermente gıdalarda biyogenik aminlere ait geri kazanım sonuçları.

	Spermidin (SPD)	Putresin (PUT)	Histamin (HIS)	Kadaverin (CAD)
Eklenen miktar	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Geri Kazanım *(SS)	% 95,90 (± 0,19)	% 104,65(± 0,32)	% 97,50(± 0,21)	% 94,70 (± 0,36)
Eklenen miktar	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
Geri Kazanım *(SS)	% 93,75 (± 0,06)	% 88,73(± 0,10)	% 91,30(± 0,06)	% 93,15 (± 0,21)

* n=2, SS: Standart Sapma.

Şekil 5.6’da standart biyogenik amin karışımının örnek üzerine ilave edilmiş elektroferogramı verilmiştir.



Şekil 5.6 : a. 1/25 Seyreltilmiş peynir örneğine 2 mg/L olacak şekilde ilave edilen biyogenik amin standardının elektroferogramı b. 1/25 seyreltilmiş beyaz peynir elektroferogramı (Optimum ayırma şartları altında; S: sistem piki, Spd: Spermidin, Put: Putresin, His: Histamin, Cad: Kadaverin).

5.5 Sonuçların Yorumlanması

Bu tez çalışmasında; zahmetsiz ve basit bir ekstraksiyonun ardından düşük konsantrasyonlarda bulunan biyogenik aminlerin, fermente gıdalarda doğrudan tayini için yeni bir metot geliştirilmiştir.

Kullanılan deteksiyon yöntemi ile asidik tampon çözelti ortamında pozitif yüklü hale gelen bazik bileşikler olan biyogenik aminlerin direkt olarak C^4D dedetörü yardımıyla dedekte edilmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede uzun saatler süren türevlendirme reaksiyonlarına gerek kalmadığı gibi çoğu zaman hassas olmayan indirekt yöntemlerin uygulanmasına da gerek duyulmamıştır. Geliştirilen bu yöntemde örnekler için fazladan herhangi bir ön işlem uygulanmamış; biyogenik aminler TCA çözeltisi ile basit bir ekstraksiyonun ardından kazanılmıştır. Yöntem oldukça kısa ve pratik örnek hazırlama basamağı içermektedir.

Analiz oldukça hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve 5,5 dakika kadar kısa bir sürede dört biyogenik aminin birbirlerinden yüksek etkinlikte ayrılmıştır. Lineer kalibrasyon doğruları oluşturulan dört biyogenik amin için oldukça yüksek r^2 değerleri bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin validasyonu ve metodun doğruluğu üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların kapiler elektroforez için kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmüştür. Geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise geliştirilen metodun gıda örnekleri üzerinde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen bu yeni metot için deteksiyon limitleri karşılaştırıldığında, literatürde bulunan bazı çalışmalara kıyasla daha düşük değerlere inilmiştir. Literatürde CE-C⁴D ile sınırlı sayıda çalışma olmakla beraber bu çalışma ilk kez biyogenik amin oluşumuna elverişli olan gıdalardan peynir, yoğurt ve kefirin birlikte biyogenik amin içeriğinin analizini gerçekleştirmiş ve ev yapımı ile endüstriyel olarak hazırlanan fermente gıdaların biyogenik amin içerikleri hakkında bir karşılaştırma yapma imkanı sunmuştur. En yüksek biyogenik amin içeriği hazır yoğurtta tespit edilmiştir. Spermidinin hiçbir fermente gıda ürününde bulunmamış olması spermidin oluşması için uzun depolama sürelerinin gerektiği konusundaki düşüncüyü desteklemektedir. Putresin miktarının ev yapımı yoğurtta daha fazla olması bakteriyel kaynaklı olabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışma hızlı, kolay uygulanabilir, basit bir örnek hazırlama prosedürü içeren, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntem ortaya koymaktadır ve bu yöntem ile diğer gıda ürünlerinin biyogenik amin içerikleri de belirlenebilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Karakaş, B., Certel, M.** (2006). Kapiler Elektforez Tekniğı ve Gıda Analizlerinde Kullanım Olanakları - Tahıl Proteinlerinin Analizine Getirdiğı Açılımlar, Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- [2] **Tavares, M. F. M., Jager, A. V., da Silva, C. L., Moraes, E. P., Pereira, E. A., de Lima, E. C., Fujiya, N. M.** (2003). Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2), 281-290.
- [3] **Sekhon, B. S.** (2011). An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications, *J. Pharm. Educ. Res.*, 2(2), 2-36.
- [4] **Aşıcıoğlu, F., Koluçık, S. T., Çetinkaya, Ü., Akyüz, F.** (2002). Kapiller elektforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: Geleneksel jel elektforez yöntemi ile karşılaştırma, *Adli Tıp Dergisi*, 16(2-4), 88-93.
- [5] **Fekete, A., Schmitt-Kopplin, P.** (2007). Chapter-15 Capillary Electrophoresis, Food Toxicants Analysis, Techniques, Strategies and Developments, 561-597.
- [6] **Erim, F. B.** (2006). "Gıda Analizlerinde Yeni Bir Analitik Yöntem: Kapiler Elektforez," Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- [7] **Weinberger, R.** (2000). Chapter 3 Capillary zone electrophoresis method development, Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, New York.
- [8] **Boher-Cid, S.** (2014). Processing contaminants: biogenic amines, *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 381-391.
- [9] **Guo, Y. Y., Yang, Y. P., Peng, Q., Han, Y.** (2015). Biogenic amines in wine: a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1523-1532.
- [10] **Varlık, H., Berker, A.** (2001). Gıda İntoksikasyonlarında Histamin ve Tiraminin Önemi, *J. Fac. Vet. Med.*, 20, 97-102.
- [11] **Alper, N., Temiz, A.** (2001). Gıdalarda biyojen aminler ve önemi, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 58(2), 71-80.
- [12] **Aygün, O.** (2003). Biyojen aminler- süt ve süt ürünlerindeki varlığı ve önemi, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 22, 91-95.
- [13] **Silla Santos, M. H.** (1996). Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.

- [14] **Gloria, M. B. A.** (2003). Amines, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd Edt.), 173-181.
- [15] **Al Bulushi, I. N., Poole, S., Deeth, H. C., 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.
- [16] **Ruiz-Jimenez, J., Luque de Castro, M.D.** (2006). Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis determination of biogenic amines in food, *Journal of Chromatography A*, 1110, 245-253.
- [17] **Chiu, T. C., Lin, Y. W., Huang, Y. F., Chang, H. T.** (2006). Review analysis of biologically active amines by CE, *Electrophoresis*, 27, 4792-4807.
- [18] **Önal, A.** (2007). A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, 103, 1475-1486.
- [19] **Erim, F. B.** (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 239-247.
- [20] **Vitalia, L., Valese, A.C., Azevedo, M.S., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Piovezan, M., Vistuba, J.P., Micke, G.A.** (2013). Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 106, 181-185.
- [21] **Park, J. S., Lee, C. H., Kwon, E. Y., Lee, H. J., Kim, J. Y., Kim, S. H.** (2010). Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products in Korea, *Food Control*, 21, 1219-1226.
- [22] **Li, W. L., Ge, J. Y., Pan, Y. L., Chu, Q. C., Ye, J. N.** (2012). Direct analysis of biogenic amines in water matrix by modified capillary zone electrophoresis with 18-crown-6, *Microchimica Acta*, 177(1), 75-80.
- [23] **Uzaşçı, S., Başkan, S., Erim, F. B.** (2012). Biogenic Amines in Wines and Pomegranate Molasses— A Non-Ionic Micellar Electrokinetic Chromatography Assay with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Food Anal. Methods*, 5, 104 -108.
- [24] **Zhang, L. Y., Tang, X. C., Sun, M. X.** (2005). Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 820, 211-219.
- [25] **Başkan, S., Tezcan, F., Köse, S., Öztekin, N., Erim, F. B.** (2010). Non-ionic micellar electrokinetic chromatography with laser induced fluorescence: a new method tested with biogenic amines in brined and dry-salted fish, *Electrophoresis*, 31, 2174-2179.
- [26] **Kubáň, P., Hauser P. C.** (2008). A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection, *Analytica Chimica Acta*, 607, 15-29.

- [27] **Gong, X. Y., Hauser, P. C.** (2006). Determination of different classes of amines with capillary electrophoresis and contactless conductivity detection, *Electrophoresis*, 27, 468-473.
- [28] **Gong, X. Y., Hauser, P. C.** (2006). Enantiomeric separation of underivatized small amines in conventional and on –chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis*, 27, 4375-4382.
- [29] **Whatley, H.** (2001). Basic principles and modes of capillary electrophoresis. In J.R. Petersen, A.A. Mohammad, (Eds.), *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis* (pp.21-58). New Jersey: Humana Press Inc.
- [30] **Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.** (1998). Enstrumental Analiz İlkeleri, 1.Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [31] **Righetti, P. G., Bossi, A., Casteletti, L., Verzola, B.** (2004). Capillary Zone Electrophoresis. In E. Heftmann (Ed.), *Chromatography* (6th Ed.) Journal of Chromatography Library, 69 A, Elsevier B.V.
- [32] **Dziubakiewicz, E., Buszewski, B.** (2013). Principles of Electromigration Techniques, In *Electromigration Techniques*, B. Buszewski (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg.
- [33] **Gordon, M. J., Huang, X., Pentoney, S. L., Zare, R. N.** (1988). Capillary electrophoresis, *Science, New Series*, 242(4876), 224-228.
- [34] **Ghosal, S.** (2006). Electrokinetic flow and dispersion in capillary electrophoresis, *The Annual Review of Fluid Mechanics*, 38, 309-338.
- [35] **Benedek, K., Guttman, A.** (1996). HPLC: Practical and Industrial Applications. In J.K. Swadesh (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis: An Overview*, (Vol. 1, pp.305-347). Alındı, <http://books.google.com/books>
- [36] **Xu, Y.** (1996). Tutorial: Capillary Electrophoresis, *The Chemical Educator*, 1(2), Springer- Verlag, New York.
- [37] **Elhamili, A.** (2011). *Development of Capillary Electrophoresis Methods Coupled to Mass Spectrometry for Biomedical and Pharmaceutical Analysis*, Uppsala Universitet, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, Uppsala.
- [38] **Lechnou, C. N.** (2008). *Capillary electrophoresis used as an alternative to HPLC for pharmaceutical analysis of antifungal agents*, (Yüksek Lisans Tezi). Thomas Jefferson University, Jefferson College of Graduate Studies, Philadelphia.
- [39] **De Boer, T.** (2001). *Selectivity enhancement in capillary electrokinetic separations via chiral and molecular recognition, Application in Bioanalysis and Pharmaceutical Analysis*, (Doktora Tezi). Alındı, <http://www.rug.nl/research/portal/files/3111570/thesis.pdf>
- [40] **Kok, W.** (2013). *Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation*, Springer Science & Business Media, Online Kitap. Alındı, <http://books.google.com/books>

- [41] **Nutku, M. S., Erim Berker, F. B. (2003).** Polyethyleneimine-coated capillaries for the separation of DNA by capillary electrophoresis, *Turk. J. Chem.*, 27, 9-14.
- [42] **Başkan, S. (2012).** *Akrilamid ve Biyogenik Aminler için Gıda Örneklerine Yönelik Kapiler Elektroforetik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, (Doktora Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [43] **Lunte, S. M., Radzik, D. M. (1996).** Principles of Capillary Electrophoresis. In S.M. Lunte, D.M. Radzik (Eds.), *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis* (Vol. 2, pp.3-21). Alındı <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1464345696800184>
- [44] **Ohshima, H., Furusawa, K. (1998).** *Electrical Phenomena at Interfaces Second Edition, : Fundamentals, Measurements, and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
- [45] **Kurosu, Y., Satou, Y., Shisa, Y., Iwata, T. (1998).** Comparison of the reproducibility in migration times between a constant-current and a constant-voltage mode of operation in capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 802(2), 391-394.
- [46] **Li, S. F. Y., Wu, Y. S. (2000).** Capillary Electrophoresis II, Electrophoresis, Capillary Electrophoresis, National University of Singapore, Singapore.
- [47] **Li, S. F. Y. (1992).** *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Application*. Elsevier, Amsterdam.
- [48] **Grossman, P. D., Colburn, J. C. (2012).** *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, USA: Academic Press.
- [49] **Marina, M. L., Rios, A., Valcarcel, M. (2005).** Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, (Vol. XLV), Netherlands: Elsevier.
- [50] **Chankvetadze, B. (1997).** Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, Alındı <http://books.google.com/books>
- [51] **Altira, K. D. (1996).** Capillary Electrophoresis Guidebook Principles, Operations, and Application, Alındı, <http://books.google.com/books>
- [52] **Thibault, P., Dovichi, N. J. (1997).** General Instrumentation and Detection Systems Including Mass Spectrometric Interfaces. In P. Camilleri, (Ed.) *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice, Second Edition*, Alındı, <http://books.google.com/books>
- [53] **Heiger, D. (2000).** *High Performance Capillary Electrophoresis*, USA: CRC Press.
- [54] **Poole, C. F. (2003).** Capillary-Electromigration Separation Techniques. In *The Essence of Chromatography* (pp.619–717). Alındı, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444501981500215>
- [55] **Kubáň, P., Hauser P. C. (2004).** Contactless conductivity detection in capillary electrophoresis: A review, *Electroanalysis*, 16(24), 2009-2021.

- [56] **Gong, X. Y.** (2008). *Applications of Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection*, (Doktora Tezi). Basel Üniversitesi, Felsefe ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Basel.
- [57] **Pumera, M.** (2007). Contactless conductivity detection for microfluidics: Designs and applications, *Talanta*, 74(3), 358-364.
- [58] **Kubáň, P., Hauser P. C.** (2004). Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry, *Electrophoresis*, 25, 3387-3397.
- [59] **Kubáň, P., Karlberg, B., Kubáň, P., Kubáň, V.** (2002). Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection, *Journal of Chromatography A*, 964, 227-241.
- [60] **Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K.** (1998). Conductivity detection for capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 70(3), 563-567.
- [61] **Da Silva, J. A. F., Do Lago, C. L.** (1998). An oscillometric detector for capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 70(20), 4339-4343.
- [62] **Kubáň, P., Hauser, P. C.** (2011). Review: Capacitively coupled contactless conductivity detection for microseparation techniques-recent developments, *Electrophoresis*, 32, 30-42.
- [63] **Kubáň, P., Hauser, P. C.** (2009). Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review, *Electrophoresis*, 30, 176-188.
- [64] **Elbashir, A. A., Aboul-Enein, H. Y.** (2012). Recent advances in applications of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D): An update, *Biomedical Chromatography*, 26, 990-1000.
- [65] **Kubáň, P., Hauser P. C.** (2008). A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection, *Analytica Chimica Acta*, 607, 15-29.
- [66] **Zemann, A. J.** (2003). Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24, 2125-2137.
- [67] **Shalaby, A. R.** (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- [68] **Smith, T. A.** (1980). Amines in food, *Food Chemistry*, 6, 169-200.
- [69] **Çolak, H., Aksu, H.** (2002). Gıdalarda biyogen aminlerin varlığı ve amin oluşumunu etkileyen faktörler, *YYÜ. Vet. Fak. Derg.*, 13(1-2), 35-40.
- [70] **Kvasnicka, F., Voldrich, M.** (2006). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with conductometric detection, *Journal of Chromatography A*, 1103, 145-149.
- [71] **Yerlikaya, P., Gökoğlu, N.** (2001). Gıdalarda biyogen aminler ve önemi, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6, 24-30.

- [72] **Bardocs, S.** (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health, *Trends in Food Science and Technology*, 6, 341-346.
- [73] **Akyol, V., Kundakçı, A., Ergönül, B.** (2015). Gıdalarda biyojen aminler, *CBÜ Fen Bil. Dergi.*, 11(2), 294-305.
- [74] **Yeğin, S., Üren, A.** (2008). Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumunu Etkileyen Faktörler, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- [75] **Lázaro De La Torre, C. A., Conte-Júnior, C.A.** (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 50(6), 430-446.
- [76] **Uylaşer, V., Konak, A.** (2004). Gıdalardaki biyojen aminler ve insan sağlığı açısından önemi, *Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi*, 6, 26-33.
- [77] **Özdestan, Ö., Üren, A.** (2012). Gıdalarda biyojen aminlerle ilgili yasal düzenlemeler, *Gıda ve Yem Bilimi-Teknoloji Dergisi*, 12, 27-40.
- [78] **Durul Özkaya, F., Tunail, N.** (2003). Peynirlerde bulunan biyojen aminler ve biyojen amin oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 60(2), 63-68.
- [79] **Şanlı, T., Şener, E.** (2015). Chapter 27- Formation of biogenic amines in cheese, *Processing and Impact on Active Components in Foods*, 223-230.
- [80] **Özdestan, Ö.; Üren A.** (2010). Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product, *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 101-107.
- [81] **Vale, S., Gloria, M. B. A.** (1998). Biogenic amines in Brazilian cheeses, *Food Chemistry*, 63(3), 343-348.
- [82] **Li, W., Pan, Y., Liu, Y., Zhang, X., Ye, J., Chu, Q.** (2014) Simultaneous determination of eight typical biogenic amines by CZE with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Chromatographia*, 77, 287-292.
- [83] **Thregold, L. D., Ellis A. V., Lenehan, C. E.** (2015). Direct detection of histamine in fish flesh using microchip capillary electrophoresis coupled contactless conductivity detection, *Analytical Methods*, 7, 1802-1808.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Veselina Adımcılar

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 29.11.1992

E-posta : adimcilar@itu.edu.tr

Yüksek Lisans : Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2016

Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi, 2014

Mesleki Ödüller

- İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölüm Birinciliği İle Meznuniyet, 2014

Tezden Türetilen Sunumlar

- Adımcılar, V., Öztekin, N., Erim, F.B.; (2015). Biyojenik Aminlerin Temassız İletkenlik Dedektörü Kullanılarak Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Ayrılması Başlıklı Poster Sunumu, 27. Ulusal Kimya Kongresi 23-28 Ağustos, 2015, Çanakkale, Türkiye.

Diğer Yayınlar

- Kaygusuz H., Uysal M., Adımcılar V., Erim F. B., (2015) Natural alginate biopolymer montmorillonite clay composites for vitamin B2 delivery, *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers: Biomedical Applications*, 30, 48-56.

