

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİSEL ELEKTROKİNETİK KROMATOĞRAFI – LİF YÖNTEMİYLE
ŞARAP VE NAR EKŞİSİ ÖRNEKLERİNDE BİYOJENİK AMİN TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sesil UZAŞCI**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2011

Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında tanışma şansına eriştiğim, engin bilgi birikimi ve duruşuyla sonsuz saygı ve sevgi duyduğum değerli hocam Prof. Dr. F. Bedia Erim Berker'e,

İTÜ'deki ailem, canım Filiz Tezcan Tekeli'ye, Selda Başkan Kahraman'a ve çalışma arkadaşlarıma,

Yaşadığım tüm güzellikleri ve zorlukları paylaşan, sevgilerini yalnızca yanımdayken değil her anımda hissettiğim değerli dostlarıma,

Her daim yanımda olup, sevmeyi, saymayı ve güvenmeyi öğreten, canım anneme, ilk aşkım babama, biricik ablama ve enişteme, bütün aileme,

Çok teşekkür ederim.

Hayat sizlerle güzel..

Sayenizde..

Sevmeli, üretmeli ve paylaşmalıyız.

Mayıs 2011

Sesil Uzaşçı

Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ	3
2.1 Kapiler Elektroforez Terimleri.....	3
2.1.1 Elektroforetik mobilite	3
2.1.2 Elektroosmotik akış	5
2.1.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler.....	7
2.1.3 Görünen mobilite ve göç süresi.....	7
2.1.4 Ayırma etkinliği	8
2.1.5 Pik genişlemesi.....	8
2.1.6 Rezolüsyon (Ayrışma).....	9
2.2 Kapiler Elektroforez Yöntemleri.....	10
2.2.1 Misel elektrokinetik kromatografi.....	10
2.3 Kapiler Elektroforez Cihazının Kısımları	12
2.3.1 Örnek enjeksiyonu.....	12
2.3.2 Kapiler kolon.....	13
2.3.3 Yüksek voltajlı güç kaynağı	14
2.3.4 Dedeksiyon.....	14
2.3.4.1 Lazer indüklenmiş floresans dedektör.....	14
3. BİYOJENİK AMİNLER.....	17
3.1 Biyogenik Aminlerin Etkileri.....	18
3.2 Şarapta Bulunan Biyogenik Aminler.....	21
3.2.1 Şarapta biyogenik amin miktarını etkileyen faktörler.....	22
3.2.2 Şarapta biyogenik amin oluşumunun önlenmesi.....	22
3.3 Nar Ekşisinde Bulunan Biyogenik Aminler.....	23
4. DENEYSEL KISIM	25
4.1 Malzemeler	25
4.1.2 Standartların türevlendirilmesi	25
4.1.3 Örneklerin türevlendirilmesi	26
4.2 Cihazlar ve Enjeksiyon Koşulları.....	26
5. SONUÇLAR	27
KAYNAKLAR	33

KISALTMALAR

EOF	: Elektroosmotik Akış
CE	: Kapiler Elektroforez
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi
CE-MS	: Kapiler Elektroforez – Kütle Spektroskopisi
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
GC	: Gaz Kromatografisi
UV-GB	: Ultraviyole Görünür Bölge
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
FITC	: Floreseyin izotiyosiyanat

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : EOF'e etki eden faktörler	7
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez yöntemleri	10
Çizelge 2.3 : Kapiler elektroforezde dedeksiyon yöntemleri	15
Çizelge 2.4 : Lazer türleri.....	15
Çizelge 3.1 : Biyojenik aminlerin farmasötik etkileri	20
Çizelge 5.1 : Şarap (mg/L) ve nar ekşisi (mg/kg) örneklerinde biyojenik amin miktarları.....	28
Çizelge 5.2 : Şarap ve nar ekşisi örneklerine ait geri kazanım değerleri.....	30

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kapiler duvarı çift tabakası.....	5
Şekil 2.2 : Akış türleri (a) Elektroosmotik düz akış (b) Basınçla sağlanan laminar akış.....	6
Şekil 2.3 : Sulu fazda bir miselin görünüşü.....	11
Şekil 2.4 : Kapiler elktroforez cihazının şematik gösterimi.....	12
Şekil 3.1 : Amino asitlerin dekarboksilasyonu.....	17
Şekil 3.2 : Bazı biyojenik aminlerin oluşumları	18
Şekil 3.3 : Biyojenik aminlerden nitrozamin oluşumu.....	21
Şekil 4.1 : Analizi yapılan biyojenik aminler.....	25
Şekil 5.1 : Brij 35 derişimine karşı biyojenik aminlerin göç süreleri.....	27
Şekil 5.2 : Amin bileşiklerinin FITC ile türevlendirilmesi.....	28
Şekil 5.3 : (a) 1 :100 seyreltilmiş şarap örneğine ait elektroferogram (b) Biyojenik amin standartları eklenen şarap örneğine ait elektroferogram.....	29
Şekil 5.4 : (a) 1 :300 seyreltilmiş nar ekşisi örneğine ait elektroferogram (b) Biyojenik amin standartları eklenen nar ekşisi örneğine ait elektroferogram.....	29

MİSEL ELEKTROKİNETİK KROMATOĞRAFİ – LİF YÖNTEMİYLE ŞARAP VE NAR EKŞİSİ ÖRNEKLERİNDE BİYOJENİK AMİN TAYİNİ

ÖZET

Biyojenik aminler, ilgili amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu sonucu oluşurlar. Biyojenik amin içeriği yüksek olan gıdaların fazla miktarda tüketimi; baş ağrısına, bulantıya, sıcak basmasına, terlemeye, kızarıklıklara, yüksek veya alçak kan basıncına ve sindirim sorunlarına sebep olabilir. Biyojenik aminler özellikle balık ürünleri, et ürünleri, peynirler, biralar, şaraplar gibi mayalı gıdalarda bulunabilirler.

Günümüzde, şarapların biyojenik amin içerikleri önem kazanmıştır. Bir çok ülke, ithal şarapların biyojenik amin içeriklerine sınırlama getirmiştir. Üzümdeki biyojenik amin miktarı; üzüm çeşidine, toprak tipine ve gübreleme prosedürüne göre çeşitlilik göstermektedir. Şaraplarda ise alkolik fermantasyon, malolaktik fermantasyon ve olgunlaşma sırasında biyojenik aminler oluşabilir. Şaraplardaki bu oluşum hijyenik olmayan koşullardan da kaynaklanır. Diğer yandan, son yıllarda nar meyvesi (*Punica granatum*) sağlığa yararı sebebiyle dikkat çekmektedir. Nar ekşisi, nar suyunun içindeki şekerin karamelize olmasını sağlayıp suyunun uçurulması ve ağır ağır kaynatılması sonucu elde edilen koyu bir şerbettir. Orta Doğu ve Akdeniz mutfağında salatalara sos olarak kullanılmaktadır. Nar ekşisinin üretim basamaklarında biyojenik amin oluşumundan şüphelenilmektedir.

Biyojenik aminlerin şarap ve nar ekşisi gibi gıda örneklerde miktarı azdır ve analizi matris etkisi sebebiyle basit değildir. Kapiler elektroforez yöntemi oldukça yeni bir ayırma yöntemidir. Yüksek ayırma etkinliği, hızlı olması ve düşük örnek kullanımı temel avantajlarındandır. Misel elektrokinetik kromatografi, kapiler elektroforez yöntemlerinden biridir. Bu çalışmada, şarap örneklerinin ve nar ekşisi örneğinin biyojenik amin içerikleri yüksüz misel elektrokinetik kromatografi yöntemi ile belirlenmiş, lazer indüklenmiş floresans dedeksiyon ile dedekte edilmiştir.

BIOGENIC AMINE ANALYSIS IN WINES AND POMEGRANATE MOLASSES BY NONIONIC - MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY METHOD COUPLED TO LIF DETECTOR

SUMMARY

Biogenic amines are derived from microbial decarboxylation of the corresponding amino acids in food products. Consumption of food containing high amounts of biogenic amines may cause headaches, nausea, hot flushes, cold sweat, red rash, high or low blood pressure, and digestive problems. Biogenic amines can be found in a variety of foods, beverages and fermented foods, such as fish products, meat products, cheeses, fermented fruits, beers and wines.

Recently, the amounts of biogenic amines gain great interest in wine products. Many countries put a limitation in the biogenic amine contents of imported wines. The amounts in grape vary with grape variety, soil type and fertilization. Biogenic amines may be formed during alcoholic fermentation, malolactic fermentation and maturation of wines. Biogenic amine formation during wine process is attributed mainly to bad hygiene conditions. On the other hand, pomegranate fruit (*Punica granatum*) has taken great attention for its health benefits in the last years. Pomegranate molasses are deeply concentrated syrup made by slow boiling of the pomegranate juice to a sticky, syrupy form. This syrup is used as a delicious dressing for salads and vegetables in Middle Eastern-Mediterranean kitchen. It would be expected that some biogenic amine formation might happen during molasses production.

Analytical determination of biogenic amines is not simple because wine is a complex matrix and biogenic amines are usually present at low levels. Capillary electrophoresis is a comparatively new separation method. The main advantage of the method is its high separation efficiency, its speed and its very low sample consumption. Micellar electrokinetic chromatography is a mode of capillary electrophoresis. In the present study, the biogenic amine contents of wine samples and pomegranate molasses were determined by a nonionic micellar electrokinetic chromatography method coupled to laser-induced fluorescence detection.

1. GİRİŞ

Elektroforez, tampon çözelti içerisindeki yüklü parçacıkların elektriksel alan varlığında farklı hızlarda göçüne dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak İsveç kimyager Arne Tiselius tarafından 1937 yılında serum proteinleri çalışmasında kullanılmıştır ve 1948 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [1].

Elektroforez, analitik olarak ayrımı zor olan birçok analite uygulanabilir. Bu yöntem; anorganik iyonlar, kiral moleküller, organik asitler, amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler ve diğer birçok türün ayrımı için uygundur.

Elektroforezin ayırma yöntemlerinden temel farkı elektrik alan uygulanmasıdır. Elektriksel alan, örnekteki yüklü taneciklerin elektrotlardan birine doğru göçüne sebep olur ve göç hızı bu taneciklerin yük/büyüklik oranına göre değişir. Bu sayede biyoteknoloji endüstrisinde, biyokimyasal ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak bulunan yüklü makromoleküllerin ayrımı mümkün olmaktadır [2].

Kapiler elektroforez, elektroforezin güçlü ayırma mekanizması ve enstrüman tekniği ile kromatografinin otomasyon kavramının birleşimi olarak düşünülebilir. Bu yöntem günümüzde gelişmeye devam etmektedir. Araştırmacılar geniş kullanım alanı, hızlı ayırım sağlaması, hem analiz hem dedeksiyona uygunluğu, yüksek ayırma gücü ve az miktarda madde kullanımı sebebiyle bu yöntem üzerinde yoğunlaşmaktadırlar.

Biyojenik aminler, amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu sonucu oluşan bileşiklerdir. Biyojenik aminler çok farklı gıda ürünlerinde oluşabilir ve hassas kişilerde sağlık açısından risklidir. Biyojenik amin içeriği yüksek olan gıdaların fazla miktarda tüketimi; baş ağrısına, bulantıya, sıcak basmasına, terlemeye, kızarıklıklara, yüksek veya alçak kan basıncına ve sindirim sorunlarına sebep olabilir [3]. Biyojenik aminler özellikle balık ürünleri, et ürünleri, peynirler, biralar, şaraplar gibi mayalı gıdalarda bulunabilirler.

Şaraplarda aminlerin varlığı aromada olumsuz etkiye sebep olur. Aynı zamanda, şarapların alkol içerikleri biyojenik amin hassasiyetini artırır. Üzümdeki biyojenik

amin miktarı; üzüm çeşidine, toprak tipine ve gübreleme prosedürüne göre çeşitlilik göstermektedir. Şaraplarda ise alkolik fermentasyon, malolaktik fermentasyon ve olgunlaşma sırasında da biyojenik aminler oluşabilir. Şaraplardaki bu oluşum hijyenik olmayan koşullardan kaynaklanır [4].

Diğer yandan, son yıllarda nar meyvesi (*Punica granatum*) sağlığa yararı sebebiyle dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalar narın antidiabetik, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiviral ve antikarsinojenik etkilerini kanıtlamıştır [5]. Bu etkilerin temel kaynağı nar meyvesinin antioksidan kapasitesidir [6]. Nar ekşisi, nar suyunun içindeki şekerin karamelize olmasını sağlayıp suyunun uçurulması ve ağır ağır kaynatılması sonucu elde edilen koyu bir şerbettir. Orta Doğu ve Akdeniz mutfağında salatalara sos olarak kullanılmaktadır. Nar ekşisinin üretim basamaklarında biyojenik amin oluşumundan şüphelenilmektedir.

Biyojenik aminlerin şarap ve nar ekşisi gibi gıda örneklerde miktarı azdır ve analizi matris etkisi sebebiyle basit değildir. HPLC yöntemi, gıdalarda biyojenik amin içeriğinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kapiler elektroforez yöntemi ise oldukça yeni bir yöntemdir. Yüksek ayırma etkinliği, hızlı olması ve düşük örnek kullanımı temel avantajlarındandır. Bu avantajlardan, şarap üretim basamaklarında biyojenik amin miktarını tespit etmek ve gerekli önlemleri almak için yararlanılabilir.

CE metodu ile şarap dahil çeşitli gıdaların biyojenik amin içerikleri üzerine çalışılmıştır. Kapiler elektroforezde MEKC yöntemi ile aminlerin etkin ayırımı gerçekleştirilmiştir. Ancak, biyojenik aminlerin UV absorpsiyon dedeksiyonuna verdiği cevap düşüktür. CE sisteminin lazer indüklenmiş floresans dedektör [7,8,9] ve MS [10,11] birleşimi dedeksiyon limitlerinde belirgin iyileştirme sağlamıştır.

Bu çalışmada biyojenik aminlerin şarap ve nar ekşisinde oluşumunu takip etmek ve kantitatif miktarlarını tayin etmek için kapiler elektroforez yöntemlerinden misel elektrokinetik kromatografi yöntemi kullanıldı [12]. Yüksüz bir misel ortamında ayrılan ve bir floresans boya ile türevlendirilen biyojenik aminlerin hassas tayini lazer indüklenmiş floresans dedektörle gerçekleştirildi. Yöntem şarapta ve nar ekşisinde biyojenik amin tayini için uygulandı. Şarap örneklerinde tiramin, spermidin ve putresin nar ekşisinde ise kadaverin tespit edildi.

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforezde ayırım elektrik alan altındaki çözeltilerin farklı hızlarda göçüne dayanır. Kapiler elektroforezde, elektroforez tekniği 25 ile 75 µm iç çapına sahip tampon çözelti geçen kolonlarda uygulanır. Kapiler kolonun temel avantajı Joule ısınmasından kaynaklı etkilerin azalmasıdır. Kapiler kolonun elektrik direnci yüksek olduğundan, az bir ısınmayla, 10 ile 30 kV arası yüksek voltajda çalışmaya uygundur. Ayrıca geniş yüzey alanın hacme oranı oluşan ısının yayılmasını sağlar. Yüksek elektrik alan kullanımı; analiz süresinin kısa olması, ayırma etkinliğinin ve rezolüsyonun artması gibi avantajlar sağlar. Değişik ayırma mekanizmaları ve seçicilik sağlayan çeşitli ayırma yöntemleri, 1 ile 50 nL arasındaki az miktarda madde kullanımı, nicel analiz ve otomasyona uygunluğu sebebiyle kapiler elektroforez önemli bir ayırma tekniği olarak gelişmektedir [13].

2.1 Kapiler Elektroforez Terimleri

2.1.1 Elektroforetik mobilité

Elektroforezde ayırım, maddelerin elektrik alanda farklı hızlarda göçüne dayanır. Elektrik alanı arttırmak iyonların göç hızını artırır ve ayırım hızlanır. Ancak ayırma etkinliği bu durumdan etkilenebilir. Elektrik alanda bir iyonun hızı aşağıdaki eşitlikler ile verilir.

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

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

Burada,

v = iyonun hızı

μ_e = elektroforetik mobilité

E = elektrik alan

V = uygulanan voltaj

L = kapiler uzunluğu

Eşitlikten görüldüğü gibi; bir iyonun hızı, uygulanan elektrik alan ve iyonun elektroforetik mobilitesi ile doğru orantılıdır. Elektrik alan arttırıldığında hız artacaktır. Elektrik alan, uygulanan voltaj ve kapiler uzunluğunun (volt/cm) bir fonksiyonudur. Elektroforetik mobilite ise verilen iyon ve ortam için iyonun karakteristiği olan bir sabittir.

İyonların sahip oldukları elektroforetik mobilite, elektrik kuvveti (F_E) ve ortamdaki sürtünme kuvvetiyle (F_F) orantılıdır.

$$\mu_e \propto \frac{\text{Elektrik kuvveti } (F_E)}{\text{Sürtünme kuvveti } (F_F)} \quad (2.3)$$

Elektrik kuvveti,

$$F_E = qE \quad (2.4)$$

Küresel olduğu varsayılan bir iyonun sürtünme kuvveti ise,

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

eşitliği ile verilir.

q = iyonun yükü

η = çözeltinin vizkositesi

r = iyonun yarıçapı

v = iyonun hızı

Elektroforez süresince iki kuvvetin dengede olduğu hal oluşur. Bu kuvvetler eşit fakat zıttır.

$$F_E = - F_F$$

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

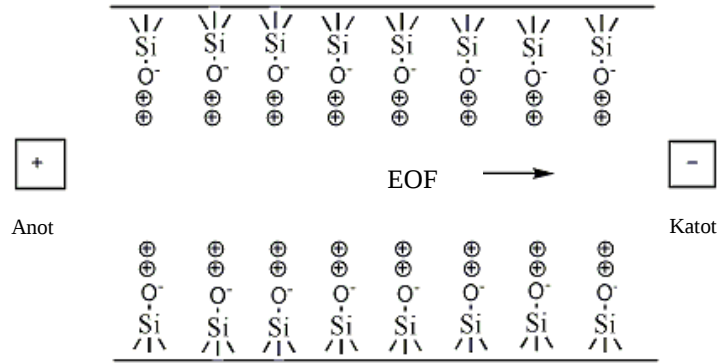
Bu eşitlik hıza göre çözülüp eşitlik (2.1) ile birleştirilince, mobiliteye ait eşitlik elde edilir.

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

Eşitlikten anlaşıldığı üzere, küçük ve/veya yükü fazla olan taneciklerin mobiliteleri fazla iken büyük ve/veya yükü az taneciklerin mobiliteleri azdır. Viskozitesi sabit bir ortamda mobilité, yük/büyükölük oranına baēlıdır ve bu oranda farklılık yaratılan taneciklerin ayrımı gerçekleştirilebilir. Tanecikler farklı pKa deēerlerine sahip olduklarında, pH kontrolü saēlanarak da ayırım gerçekleştirilebilir [14].

2.1.2 Elektroosmotik akış

Kapiler elektroforezdeki en temel kavramlardan biri elektroosmotik akıştır. Elektroosmotik akış, elektrik alan uygulanması sonucu iç kapiler duvarında oluşan çift tabaka yükünün (Şekil 2.1) sebep olduēu bir hacim akışdır.



Şekil 2.1 : Kapiler duvarı çift tabakası.

pH 2'nin üzerinde çalışıldığında silika kapilerin iç duvarı negatif yüklenir. Bunun nedeni silanol gruplarının disosiyé olmasıdır.



Yük dengesini oluşturan karşıt iyonlar (genellikle katyonlar) ise çift tabakayı oluşturarak duvara çok yakın bir bölgede potansiyel farka sebep olurlar. Bu potansiyele zeta potansiyeli denir [2].

Kapiler kolona voltaj uygulandığında, iyonlar sulu çözeltide hidratize halde olduklarından çözücüyü de sürükleyerek kapiler içinde bir elektroosmotik akış (EOF) oluşur. Bu akış katoda doğrudur.

Elektroosmotik akış, hız ve mobilité türünden belirtilebilir.

$$v_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad (2.8)$$

$$\mu_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) \quad (2.9)$$

v_{EOF} = elektroosmotik akış hızı

μ_{EOF} = elektroosmotik akış mobilitesi

ε = ortamın dielektrik sabiti

ζ = zeta potansiyeli

Elektroosmotik akış hızı genel olarak enjekte edilen analitlerin elektroforetik mobilitelerinden büyüktür. Normal koşullar altında akış anottan katoda doğrudur. Bu akışla, tüm türler yüklerine bağlı olmaksızın katoda doğru sürüklenirler.

Kasyon ve anyonların hızları; elektroforetik mobilitelerine, ortamdaki elektroosmotik akışa ve uygulanan elektrik alana bağlı olarak aşağıdaki eşitlikteki gibi değişir.

$$v_+ = (\mu_o + \mu_+) E \quad (2.10)$$

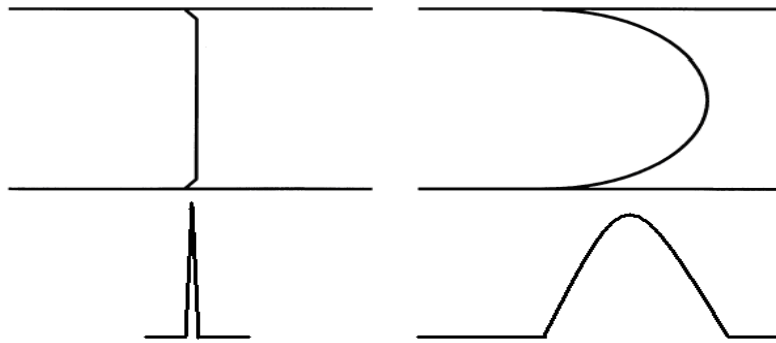
$$v_0 = \mu_o E \quad (2.11)$$

$$v_- = (\mu_o - \mu_-) E \quad (2.12)$$

v = iyonun hızı

Kasyonlar kendi mobilitelerine eklenen EOF etkisiyle en hızlı hareket eden taneciklerdir. Nötral tanecikler EOF hızında birbirlerinden ayrılmadan katoda varırlar. Anyonlar ise anoda doğru bir mobiliteye sahip olmalarına rağmen elektroosmotik akış eşliğinde katoda vardıklarından en yavaş taneciklerdir.

Elektroosmotik akışın diğer bir önemli özelliği ise düz akış olmasıdır (Şekil 2.2a). Akışı iletken kuvvet kapiler boyunca düzenli dağılmıştır ve herhangi bir basınç değişimi olmadığından akış düze yakındır. Düz akış, analitlerin dağılımına sebep olmaması sebebiyle dik ve simetrik pikler sağlar. Bu nedenle CE'in ayırım etkinliği yüksektir. Dış basıncın itici güç olduğu HPLC'de ise laminar akış gözlenir (Şekil 2.2b). Laminar akış, pik genişlemesine neden olur [13].



Şekil 2.2 : (a) Elektroosmotik düz akış (b) Basınçla sağlanan laminar akış.

2.1.2.1 Elektroosmotik akışa etki eden faktörler

Başarılı sonuç eldesi için elektroosmotik akış koşulları optimize edilmelidir. Elektroosmotik akış kontrolü, kapiler yüzey yükünü ve tampon viskozitesini ayarlamayı gerektirir. Elektroosmotik akışa etki eden faktörler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 2.1 : EOF'e etki eden faktörler [13].

Değişken	EOF'e etkisi
Elektrik alan artışı	EOF ↑
Tamponun pH artışı	EOF ↑
İyonik kuvvet veya tampon derişimi artışı	EOF ↓
Sıcaklık artışı	EOF ↑ (η değişimi nedeniyle)
Organik çözücü ilavesi	EOF ↓ (su fazında çalışıldığında)
Pozitif yüklü yüzey aktif ilavesi	EOF terse çevrilir
Negatif yüklü yüzey aktif ilavesi	EOF ↑

2.1.3 Görünen mobilite ve göç süresi

Bir analitin dedeksiyon noktasına ulaşana kadar geçirdiği süreye göç süresi (t) denir. Taneciğin görünen mobilitesi, göç süresi ve diğer deneysel veriler kullanılarak hesaplanabilir.

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

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$$

V = uygulanan voltaj

l = kapilerin etkin uzunluğu

L = kapilerin toplam uzunluğu

t = göç süresi

E = elektrik alan

EOF varlığında ölçülen mobilité görünen mobilité (μ_a) olarak adlandırılır. Elektroforetik mobilité (μ_e) ise nötral işaretleyici kullanılarak EOF hızı belirlenip hesaplanır. Formamid ve aseton sıkça kullanılan nötral işaretleyicilerdir.

Kapilerin etkin uzunluğu, enjeksiyon noktasından dedeksiyon noktasına kadar olan uzaklıktır.

2.1.4 Ayırma etkinliği

Ayırma etkinliği, diğer kromatografik yöntemlerde olduğu gibi, teorik tabaka sayısı (N) ile ifade edilir.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.14)$$

l = kapilerin etkin uzunluğu

σ = pikin standard sapmasıdır.

Teorik plaka genişiliđi (HETP);

$$H = (l/N) \quad (2.15)$$

şeklinde ifade edilir.

Ayrılan piklerin elektroferogramı kullanılarak N değeri, genellikle cihazların veri değeriendirme programı ile hesaplanır. Teorik plaka sayısı bir elektroferogramdan yararlanılarak da belirlenebilir. Bunun için aşığıdaki eşitlik kullanılır.

$$N = 5,54 (t/w_{1/2})^2 \quad (2.16)$$

t = göç süresi

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

2.1.5 Pik genişlemesi

Enjekte edilen örnek bantlarının genişlemeden dedektöre ulaşması istenir. Kapiler elektroforezde bant genişlemesine neden olan en önemli etken kapiler boyunca difüzyondur. Difüzyonun pik genişlemesine etkisi, varyans cinsinden aşığıdaki eşitlik ile verilir.

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (2.17)$$

D = analitin difüzyon katsayısı

t = pikin geliş süresi

Eşitlikten anlaşıldığı gibi, göç süresi kısaltıldıkça ve maddenin difüzyon katsayısı küçüldükçe bant genişlemesi az olacaktır. Kapiler elektroforezde uygulanan yüksek voltaj (yüksek elektrik alan) göç sürelerinin kısaltılmasını ve analitin kapiler içinde az süre geçirip fazla difüzyona uğramamasını sağlar. Protein ve DNA gibi düşük difüzyon katsayısına sahip büyük moleküller, küçük moleküllere göre difüzyondan daha az etkilenmektedirler. Bu nedenle CE’de protein ve DNA ayırmalarında, çok yüksek teorik plaka sayılarına ulaşmak mümkün olur [15].

Kapiler elektroforezde, boyuna difüzyona ilaveten, difüzyona sebep olan birçok başka etken vardır. Bunlar arasında en önemlileri; kapiler içinde bölgesel sıcaklık farklılıklarına sebep olan Joule ısınması, enjeksiyon ve dedeksiyon bölgesindeki pik genişlemeleri, analitin kapiler duvarına adsorpsiyonu nedeniyle pik genişlemesi, enjeksiyon çözeltisi ile ayırma elektrolitinin iletkenlik farkı nedeniyle oluşan elektrodispersiyon sayılabilir [13].

Joule ısısı, etkin bir termostat sistemiyle kontrol edilebilir. CE’de genellikle örnek çok ince bir bölge olarak enjekte edildiğinden, enjeksiyon ve dedeksiyon bölgesindeki pik genişlemeleri çok önemli değildir. Adsorpsiyon nedeniyle pik genişlemesi, özellikle protein gibi yüklü ve büyük moleküllerde problem teşkil eder. Bu etki, uç pH değerlerinde çalışmak veya kapiler iç duvarını farklı polimerlerle kaplamak yoluyla giderilebilir. Elektrodispersiyon ise, örnek bölgesi ile tampon bölgesi arasındaki iletkenlik farklılıkları kontrol edilerek azaltılabilir.

2.1.6 Rezolüsyon (Ayrışma)

Bir ayırma yönteminde temel amaç örnek bileşenlerinden elde edilen piklerin tam olarak birbirinden ayrılmasıdır. İki pikin birbirinden ayrılmasının ölçüsü olan rezolüsyon aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (2.18)$$

t = göç süresi

w = süre olarak pikin taban genişliği

σ = zamana ait standart sapma

2.2 Kapiler Elektroforez Yöntemleri

Şimdiye kadar ayırma prensibi anlatılan, kapiler elektroforezin en basit şekli olan kapiler zon elektroforezdir (CZE). CZE’de iyonik türler yük/büyükölük oranlarına göre birbirinden ayrılır. CE’in CZE ile benzer cihaz tasarımını kullanan çok farklı modları vardır. Kapiler elektroforezin bu farklı tipleri ile yalnız yüklü partikülleri değil, nötral bileşikleri de birbirinden ayırmak veya analitleri sadece büyükölüklerine göre ayırmak mümkün olur [13].

Bu yöntemlerin temel ayırma esasları Çizelge 2.2’de toplanmıştır. Bu kısımda, çalışmada kullanılan misel elektrokinetik kromatografi yöntemi ayrıntılı olarak verilecektir.

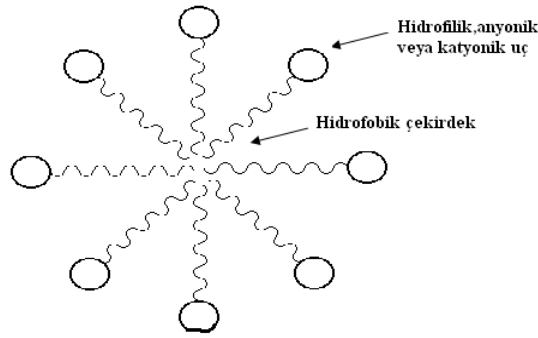
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez yöntemleri [2].

<i>Yöntem</i>	<i>Ayrma Esası</i>
Kapiler Zon Elektroforez	Analitlerin yük/büyükölük farklılıkları
Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin ayırma elektrolitine eklenen katkı maddesi ile farklı kimyasal etkileşimi
Misel Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin misel ile farklı hidrofilik - hidrofobik etkileşimi
Kapiler Jel Elektroforez	Analitlerin büyükölük farklılıkları ile jel gözeneklerinden geçişi
İzoelektrik odaklanma	Analitlerin izoelektrik nokta farklılıkları
İzotakoforez	Analit ile iki farklı tampon iyonları arasındaki mobilite farkı
Elektrokromatografi	Analitlerin kapiler içine doldurulan sabit faz ile sıvı faz arasında farklı dağılımı

2.2.1 Misel elektrokinetik kromatografi

Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC), elektroforez ile kromatografinin birleşimidir. 1984 yılında Terabe tarafından tanıtılan bu yöntem, en çok kullanılan CE yöntemlerinden biridir. En önemli avantajı ise yüklü taneciklerin yanı sıra nötral taneciklerin ayırımına olanak sağlamasıdır.

MEKC ile nötral tanecik ayırımı, çalışma tamponuna yüzey aktif madde eklenmesiyle gerçekleştirilir. Kritik misel konsantrasyonu üstünde yüzey aktif madde molekülleri kümeleşir ve misel denilen yığınları oluşturur. Miseller genellikle küreseldir. Sulu ortamda, hidrofobik kuyrukları merkeze doğru yönelmiş yüklü uç kısımları tampona doğru yönelmiştir. Ayırımı sağlayan ise nötral taneciklerin yapılarındaki hidrofilik ve hidrofobik grupların miseller ile olan etkileşimidir [16]. Miseller yüklerine bağlı olarak, EOF yönünde veya EOF'ye zıt yönde hareket ederler.



Şekil 2.3 : Sulu fazda bir miselin görünüşü.

SDS gibi anyonik yüzey aktif maddeler EOF'ye zıt yönde olacak şekilde anoda doğru göç ederler. EOF hızı, nötral veya bazik pH değerlerinde, misellerin göç hızından fazla olduğu için net hareket EOF yönündedir. Kromatografik olarak, göç sırasında miseller analit moleküller ile hidrofobik, hidrofilik ve elektrostatik olarak etkileşebilir.

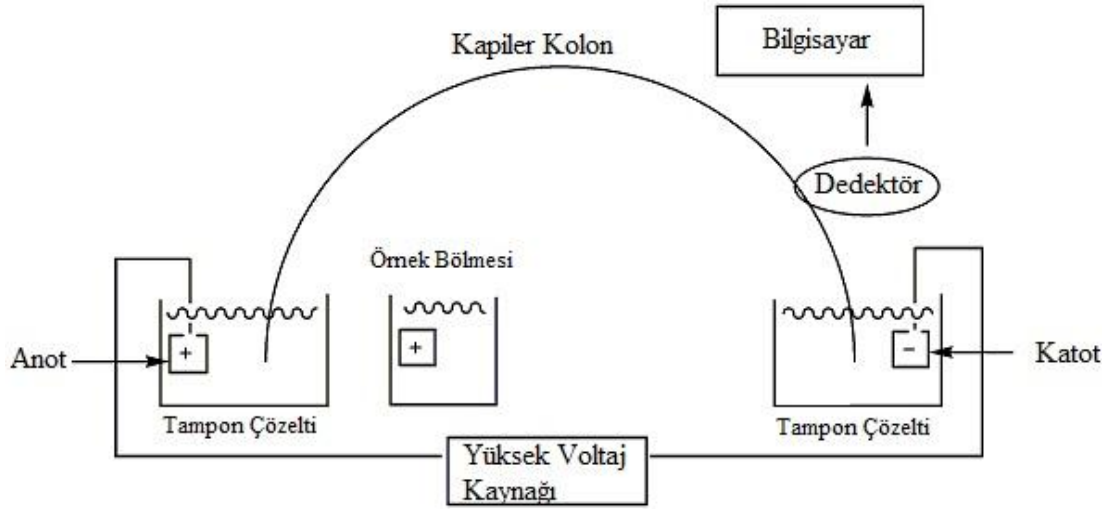
Nötral taneciklerin hidrofobik grupları fazla ise, zamanlarının çoğunu misel içinde geçirecekler, hidrofilik grupları fazla ise daha çok çözücü fazda zaman geçireceklerdir. Sonuç olarak nötral maddeler yapılarında bulunan hidrofilik ve hidrofobik grupların oranlarına bağlı olarak misel faz ile çözücü faz arasında paylaşımına uğrarlar.

MEKC'de kullanılacak miselin fiziksel özellikleri (büyüklük, yük, geometri) ayarlanarak seçicilik değiştirilebilir. Yüzey aktif maddeler; katyonik, anyonik, yüksüz, çiftiyon veya bunların karışımı şeklinde olabilir. Ayrıca, tampon konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değiştirilerek veya üre, metal iyonu, kiral seçici gibi katkıları eklenerek seçicilik değiştirilebilir.

Kromatografik yöntemlerde olduğu gibi, organik çözücüler eklenerek misel ile analit arası etkileşim azaltılabilir. Metanol, asetonitril ve 2-propanol gibi çözücüler MEKC’de sıkça kullanılan organik katkılarıdır. Tampon çözeltinin % 50’sinden fazla eklenen organik çözücüler, misel yığınları bozabilir.

2.3 Kapiler Elektroforez Cihazının Kısımları

Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi şekil 2.4’te verilmiştir.



Şekil 2.4 : Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi.

2.3.1 Örnek enjeksiyonu

Kapiler elektroforezde yüksek etkinlik elde etmek amacıyla çok küçük hacimlerde enjeksiyon yapılır. Enjekte edilen örneğin bant uzunluğunun ideal değeri, toplam kapiler uzunluğunun % 1 ile % 2’si arasındadır. Bu da kapilerin boyuna ve iç çapına göre, birkaç milimetre uzunluğa veya 1 ile 50 nL hacme karşılık gelir. Böylece az miktarda örnek harcanır [13].

Örnek enjeksiyonları hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılır. Jel elektroforez gibi özel bazı durumlar harici hidrodinamik enjeksiyon daha çok kullanılır. Hidrodinamik enjeksiyonda örnek, kapilerin enjeksiyon kısmından basınç uygulanarak, kapiler çıkışından vakum uygulanarak veya sifon etkisi (enjeksiyon haznesi çıkış haznesinden yüksekte tutularak) ile kolon içersine yüklenebilir.

Hidrodinamik enjeksiyon için enjeksiyon hacmi Hagen-Poiseuille’nin denkleminde hesaplanabilir.

$$V = \Delta P \Pi r^4 / 8 \eta L \quad (2.19)$$

ΔP = kapiler boyunca oluşan basınç farkı (dyn.cm-2)

r = kapilerin iç çapı (cm)

t = enjeksiyon süresi (s)

η = tampon viskozitesi (dyn.s.cm⁻²)

L = kapilerin toplam uzunluğu

Elektrokinetik enjeksiyonda, örnek haznesi ile çıkış tampon haznesi arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak örnek yüklenir. Analit, hem göç yolu ile hem EOF'nin pompalama etkisi ile kapiler içersine girer. Elektrokinetik enjeksiyon için enjeksiyon hacmi aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir.

$$Q = (\mu_e + \mu_{EOF}) V \Pi r^2 C t / L \quad (2.20)$$

μ_e = analitin elektroforetik mobilitesi

μ_{EOF} = EOF mobilitesi

V = uygulanan voltaj

r = kapiler çapı

C = analit derişimi

t = süre

L = kapilerin toplam uzunluğu

Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı hidrokinamik enjeksiyona göre daha azdır. Enjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır.

2.3.2 Kapiler kolon

İdeal bir kapiler kolon kimyasal ve elektriksel olarak inert, UV-GB'de saydam, esnek, dirençli ve ucuz olmalıdır. Bu özellikleri taşıyan eritilmiş silika kapiler elektroforez için uygun kolon çeşididir. GC kolonlarında olduğu gibi, kapiler kolon koruyucu tabaka olarak poliimid kaplanmışdır. Kaplama, kolonun dayanıklı ve kolay kullanılabilir olmasını sağlar. Dedeksiyon için poliimid kaplamanın bir kısmı yakılarak uzaklaştırılır ve dedeksiyon penceresi oluşturulur.

Eritilmiş silika kapiler, 10-200 μm iç çapa ve çeşitli dış çaplara sahiptir. En çok kullanılan ise iç çapı 25-75 μm , dış çapı 350-400 μm olan kolonlardır. Genellikle 50-75 cm arası etkin uzunluğa sahiptirler. Toplam uzunluk ise, enstrüman özelliğine göre (dedektörden çıkış haznesine olan uzaklığa göre), etkin uzunluktan 5-15 cm daha uzun olmalıdır.

İlk defa kullanılacak bir silika kapiler ilk önce 1M NaOH ile ardından su ve çalışma tamponuyla da yıkanarak şartlandırılır.

2.3.3 Yüksek voltajlı güç kaynağı

Tipik bir CE sisteminde uygulanan voltaj en fazla 30 kV ve akım 200-300 mA arasındadır. Yapılan çalışmanın tekrarlanırlığı uygulanan voltajın kararlılığıyla yakından alakalıdır.

Cihazların birçoğunda sabit akım yerine sabit voltaj uygulanması tekrarlanabilirliğin daha iyi olmasını sağlar ve sıcaklık kontrolünün yapılmadığı durumlar için önemli bir avantaj sağlar. Çünkü çözelti sıcaklığının artması mobilitenin de artmasına neden olur. Tamponun mobilitesi bu durumdan etkilenir ve çözeltinin iletkenliği değişir. Sabit akımlı bir kaynak ile sıcaklığın artması sonucu otomatik olarak voltaj düşmekte ve alıkonma süreleri çok az etkilenmektedir [17].

2.3.4 Dedeksiyon

Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon yöntemleri, dedeksiyon sınırları, avantaj ve dezavantajları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

2.3.4.1 Lazer indüklenmiş floresans dedektör

Lazer indüklenmiş floresans (LIF) spektroskopik bir yöntemdir. Bu metotta incelenecek tanecikler lazer ile uyarılmaktadır. Uyarılan tanecikler bir süre sonra, genellikle birkaç nanosaniye ile mikrosaniye arası sürede, temel hale dönerler ve uyarılan dalga boyundan daha büyük bir dalga boyunda emisyon yaparlar. Bu ışık, floresans olarak ölçülür.

Bu yöntemin absorpsiyon spektroskopisinden avantajlı yanı, floresans sinyalinin gürültü sinyaline oranının büyük olmasıdır. Bu durum hassasiyetin fazla olmasını sağlar. Yöntem, bu çalışmada olduğu gibi nanomolar cinsinden derişimlerin kantitatif hesabına başarıyla uygulanabilir [18].

Çizelge 2.3 : Kapiler elektroforezde dedeksiyon yöntemleri [13].

Yöntem	Dedeksiyon Sınırı (molar)	Avantajlar ve Dezavantajlar
UV-GB Absorpsiyon	10^{-5} - 10^{-8}	* Kapsamlı * Diyot ile spektral dedeksiyon
Floresans	10^{-7} - 10^{-9}	* Hassas * Örnek türevlendirmesi gerektirir
Lazer İndüklenmiş Floresans Amperometri	10^{-14} - 10^{-16} 10^{-10} - 10^{-11}	* Çok hassas * Örnek türevlendirmesi gerektirir * Pahalı * Hassas * Sadece elektroaktif analitlere uygun * Özel kapiler modifikasyonu gerekli
İletkenlik	10^{-7} - 10^{-8}	* Kapsamlı * Özel kapiler modifikasyonu gerekli
Kütle Spektrometresi	10^{-8} - 10^{-9}	* Hassas * Yapı hakkında bilgi sağlar * CE-MS sisteminde arayüz olarak kullanılır

Lazer ışının üç boyutlu özellikleri, CE ile uyumlu olmasını sağlar. Lazer uygulamalarında en keskin sınırlama ucuz lazerlerin dalga boyunun ayarlanabilir olmamasıdır. Bu sebeple amaca uygun farklı dalga boyundaki lazer seçilmelidir. CE ve HPLC uygulamalarında sıkça kullanılan lazer tipleri çizelge 2.4’te listelenmiştir [19].

Çizelge 2.4 : Lazer türleri.

Lazer	Dalga boyu (nm)
HeNe	543, 632
Ar ⁺	488, 514, UV
Diyot	645-480 vb.

Floresans veya absorbans dedeksiyonun dezavantajı, tüm analitlerin UV-VIS (180-800 nm) bölgede floresans veya absorbans yapan kromofor grup içermemesidir. Bu analitler için direk dedeksiyon mümkün değildir. Bu tip analitlerin dedeksiyonu;

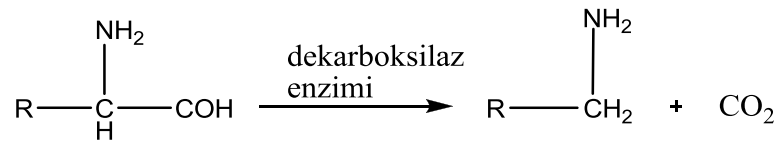
kromofor grup içeren bir bileşik ile türevlendirilmesi, başka bir dedeksiyon yönteminin kullanılması veya dolaylı dedeksiyon ile mümkün olmaktadır.

3. BİYOJENİK AMİNLER

Biojenik aminler, organizmalar için azot kaynağıdır ve hormon, alkaloid, nükleik asit ve protein sentezi için başlatıcı olarak görev alırlar [20]. Bitki ve hayvan metabolizmasında üretilirler. Bunun dışında biyojenik aminler insan vücuduna hayvansal ve bitkisel gıdalarla dışardan alınırlar. Gıdalarda biyojenik amin oluşumu gıda bozunmasının bir göstergesi olarak alınır. Gıdalarda biyojenik amin varlığı gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır. İnsan vücuduna alınan biyojenik amin miktarının artması toksik etkileri ortaya çıkarır. Özellikle hassas kişilerde sağlık açısından risklidir. Biyojenik amin içeriği yüksek olan gıdaların fazla miktarda tüketimi; baş ağrısına, bulantıya, sıcak basmasına, terlemeye, kızarıklıklara, yüksek veya alçak kan basıncına ve sindirim sorunlarına sebep olabilir [3]. Biyojenik aminler özellikle balık ürünleri, et ürünleri, peynirler, biralar, şaraplar gibi mayalı gıdalarda bulunabilirler.

Gıdalardaki, biyojenik aminler, kimyasal olarak alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, b-feniletilamin) veya heterosiklik (histamin, triptamin) yapıda olabilirler [21].

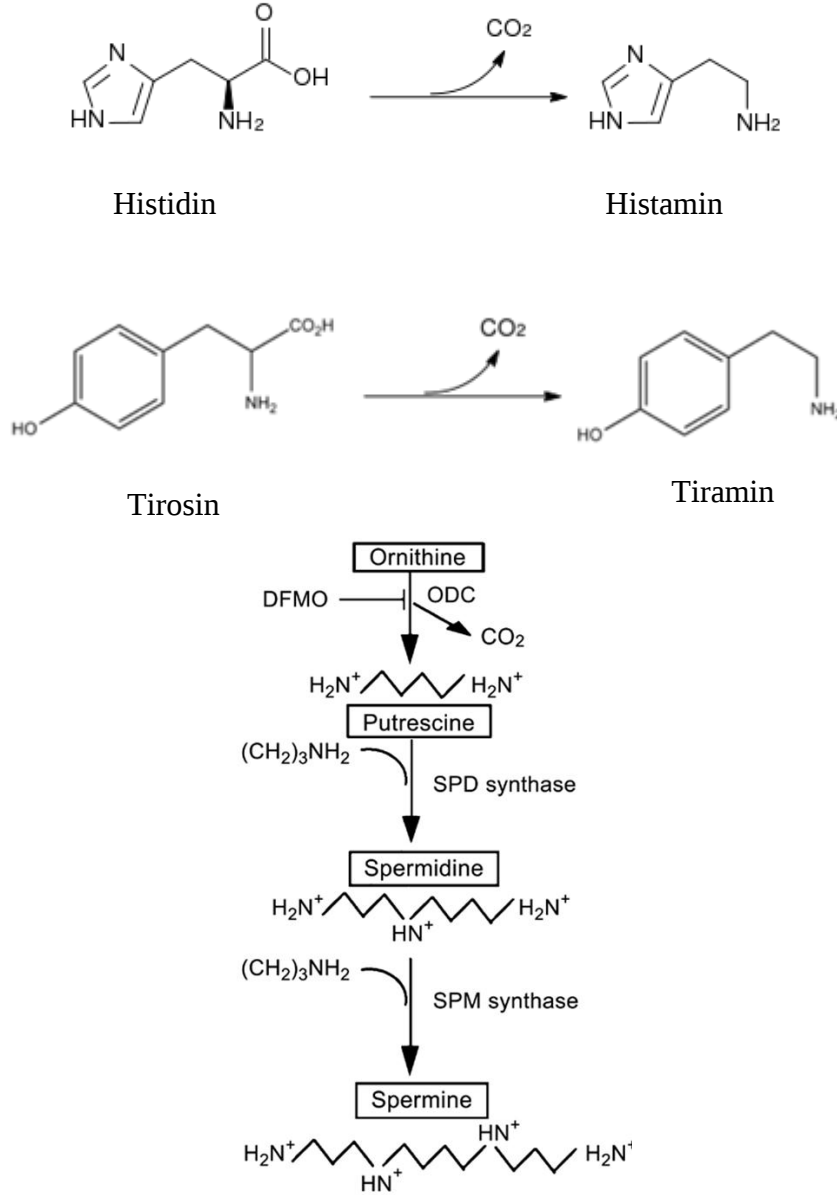
Biojenik aminler amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu oluşurlar. Amino asit dekarboksilasyonu alfa-karboksil grubunun uzaklaşmasıyla meydana gelir [22]. Amino asitlerden karbondioksitin ayrılmasıyla bu amino asidin amini oluşmaktadır. Bu olay organizmaya özgü enzimlerle olabildiği gibi mikrobiyal olarak da gerçekleşebilmektedir. Amino asitlerden karbondioksitin ayrılmasına dekarboksilasyon, ilgili enzime de dekarboksilaz ismi verilir [23].



Şekil 3.1 : Amino asitlerin dekarboksilasyonu.

Biojenik aminlerin oluşumu serbest amino asitlerin varlığı, dekarboksilaz aktivitesi yüksek mikroorganizmaların gelişimi ve dekarboksilazlar için uygun koşulların var olması faktörlerine bağlıdır.

Biyojenik amin oluşumu ortamın pH'sını yükseltmekte bu da mikroorganizmayı asidik ortam etkisinden korumaktadır [24]. Bazı biyojenik aminlerin, ilgili amino asitlerinden oluşumu aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 3.2 : Bazı biyojenik aminlerin oluşumları [25].

3.1 Biyojenik Aminlerin Etkileri

Birçok biyojenik amin insan ve hayvanların fizyolojik fonksiyonlarında önemli rol oynar. Bazı aminler insanlarda hormon olarak etki gösterirler. Kan sirkülasyonunun düzenlenmesinde, transmitter madde olarak sinir sisteminde ve düz kaslarda önemli rol oynarlar [26].

Histamin ve tiramin doku hormonlarıdır. Histaminin en önemli etkisi damarların genişlemesi ve mide sekresyonunun artması, alerjik reaksiyonların belirmesidir. Histamin organizmada lokal kanamaları düzenleyici olarak da etki eder. Tiramin kan basıncını yükseltir ve düz kasları uyarır [26].

Histaminin diğer etkileri de damar düz kaslarını gevşetmesi, damar dışı yapıların düz kaslarını büzmesi ve dış salgı bezlerini (tükrük, gözyaşı, bronş mukozası, bağırsak mukosazı bezleri ve pankreasın dış salgısı) uyarmasıdır. Damarlar histamin etkisine en duyarlı yapılardır. Histamin damar genişlemesi sonucu kan basıncını düşürür. Bu durumu tolere etmek isteyen kalp atışı ise yaşamı tehdit edecek boyutlara ulaşır. Yüz, boyun ve göğsün üst kısmında cilt damarları belirgin şekilde genişler, kan akışı artar ve kızarıklık görülür. Beyin damarlarının genişlemesi ile de zonklayıcı nitelikte baş ağrısı hissedilir [26].

Spermin genellikle hayvanlar ve bitkilerde, putresin ve spermidin ise birçok bakteride görülür. Bu aminler nükleik asit fonksiyonlarının düzenlenmesinde, DNA ve RNA'nın makromoleküler yapısının katyon stabilitesinin sağlanmasında, protein sentezinde ve membran stabilizasyonunda önemlidir. Bitkilerde putresin, spermidin ve spermin hücre bölünmesi, çiçek açma, meyve gelişimi gibi fizyolojik olaylarla ilişkilidir [27].

Biyojenik aminlerin bu fonksiyonları yanında başka etkileri de vardır. Enzimatik olmayan esmerleşme olayında etkilidirler. Nükleik asit, alkaloid ve protein sentezinde azot kaynağıdır. Gıdaların kalite kontrolünde tamamlayıcı unsur olarak görev alırlar. Bu nedenle de gıdalarda biyojenik amin varlığı hem gıdanın bozulması hem de gıda güvenliği açısından önem taşımaktadır [28].

Biyojenik aminler gıdalarla alımında yüksek oranlarda tüketilmedikçe veya bireyin doğal katabolizma mekanizması sınırlı veya genetik olarak kusurlu olmadıkça sağlık tehlikesi oluşturmaz [22].

Bireysel alerjik durumlarda veya monoaminoksidaz inhibitörlerinin meşgul olması halinde biyojenik aminler vücutta birikir. Biyojenik amin zehirlenmesinin tipik semptomları ishal, bulantı, baş ağrısı, hiper veya hipotansiyondur. Hastalığın teşhisi hastalarda görülen semptomlara, başlama zamanına ve antihistamin tedavi etkisine dayalıdır. Şüpheli gıda, biyojenik amin seviyesini belirlemek amacıyla bir iki saat içinde analize alınmalıdır.

En çok rastlanan biyojenik amin zehirlenmesi histaminden kaynaklanmaktadır. Scomberesidae ve Scombridae familyasına dahil olan uskumru, palamut, ton balığı gibi balıkların tüketilmesiyle sıkça görüldüğü için ‘histamin zehirlenmesi’ veya ‘scombroid zehirlenmesi’ adını alır. Çok sık rastlanan bir diğer biyojenik amin zehirlenmesi de peynirlerde yaygın olarak bulunabilen tiraminden kaynaklanmaktadır [27].

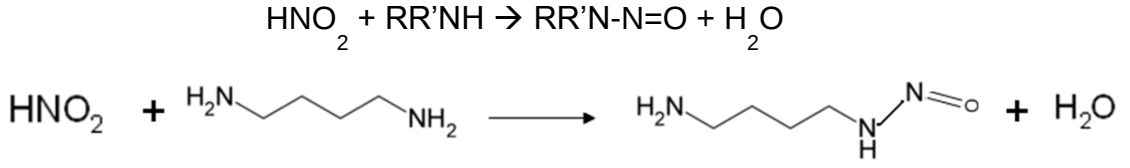
Bazı biyojenik aminlerin farmasötik etkileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Biyojenik aminlerin farmasötik etkileri [29].

Amin	Oluştugu bileşik	Farmasotik etkisi
Histamin	Histidin	Adrenalin ve noradrenalin miktarını artırır, sensörleri ve motor nöronları uyarır, gastrik asit salgılanmasını kontrol eder
Tiramin	Tirozin	Kan şekeri seviyesini, solunumu artırır, migrene neden olur, noradrenalin seviyesinin artmasına neden olur, kalp atışlarını hızlandırır.
Putresin Kadaverin	Ornitin ve Lisin	Hipotansiyona neden olur, diğer aminlerin toksik etkisini artırır
β -Feniletilamin	Fenilalanin	Noradrenalin seviyesinin artmasına neden olur, kan basıncını artırır, migrene neden olur.
Triptamin	Triptofan	Kan basıncını artırır.

Biyojen aminlerin toksisitesi ile ilgili kesin limitler vermek çok zordur. Tüketilen gıdanın çeşidi, miktarı ve amin içeriği gibi faktörler ile inhibitörlerin varlığı biyojenik aminlerin toksisitesi ile ilgili limitlerin belirlenmesini güçleştirmektedir. Bir öğünde alınan 40 mg üzeri biyojenik aminin potansiyel olarak toksik olduğu düşünülmektedir [29].

Bunların dışında, biyojenik aminlerden putresin ve kadaverin gıda ürünlerine ilave edilen nitroz asit ile kanserojen nitrozaminleri oluşturabilir [4].



Şekil 3.3 : Biyojenik aminlerden nitrozamin oluşumu.

3.2 Şarapta Bulunan Biyojenik Aminler

Biyojenik aminler; peynir, et, balık, bira ve şarap gibi ürünlerde oluşmaktadır [30,31]. Ancak bunların dedeksiyonu şarap ve meyve sularındaki kompleks matris ve düşük biyojenik amin miktarları sebebiyle kolay değildir.

Üzümdeki biyojenik amin miktarı; üzüm çeşidine, toprak tipine ve gübreleme prosedürüne göre çeşitlilik göstermektedir. Şaraplarda biyojenik aminler sıradan, alkol fermantasyonu sırasında mayalardan ve malolaktik fermantasyonu gerçekleştiren bakterilerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca şarapta bulaşma yoluyla bulunan Klebsiella ve Proteus gibi enterik bakteriler de biyojenik amin oluşumuna yol açabilmektedir. Hijyenik koşullarda üretilen şaraplarda ise biyojenik amin düzeyleri çok düşüktür ya da bulunmaz [4].

Alkol fermantasyonundan sonra meydana gelen malolaktik fermantasyon, kırmızı şaraplarda ve bazı beyaz şaraplarda gereklidir. Bunun temel sonucu, malik asit dekarboksilasyonu yoluyla malik asidin giderilmesi ve ikincil mikrobiyal metabolizma ile duyusal kalitenin geliştirilmesidir. Ancak şaraplarda meydana gelen malolaktik fermantasyonla biyojenik amin düzeyinin artışının bağlantılı olduğu bulunmuştur [32].

Şarapta birkaç amino asit dekarboksile edilebilmektedir. Bunun sonucunda histamin, tiramin, putresin, spermidin, kadaverin ve feniletilamin oluşmaktadır. Özellikle histamin, tiramin ve putresin şaraplarda en sık karşılaşılan biyojenik aminlerdir. Amin düzeyi, mikroflora ve alkol fermantasyonundan sonra şarabın amino asit bileşimi ile yakından ilişkilidir. Üzüm çeşidi ve asmanın beslenmesi şarabın bileşimi üzerinde etkili faktörlerdir. Maya metabolizması da bileşimi etkilemektedir. Ayrıca şaraplar, maya tortusu ile muhafaza edilirse laktik asit bakterileri, hidrolize ve dekarboksile etmek için daha fazla peptid ve serbest amino asit bulmaktadır. Bu

durum, tortu ile uzun süre temasta kalan şaraplarda daha yüksek biyogenik amin düzeylerine yol açmaktadır [32].

Diğer gıda ürünleriyle karşılaştırıldığında şaraplarda biyogenik aminler daha düşük miktarlarda bulunmaktadır. Ancak alkollü içeceklerde; etanolle biyogenik aminler arasında oluşan sinerjik etkiden dolayı bu bileşiklerin toksik etkisi artmaktadır [33].

3.2.1 Şarapta biyogenik amin miktarını etkileyen faktörler

Şaraplarda aminlerin oluşumu yalnızca belirli mikroorganizmaların varlığına bağlı olmayıp, birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörleri şöyle sıralayabiliriz;

- a. Şarap üretim prosesinin teknolojik koşulları ve hammaddenin kalitesi,
- b. Şıradaki serbest amino asit içeriği,
- c. SO₂ düzeyi,
- d. pH,
- e. Kırmızı şarap üretiminde mayşe fermantasyonunun süresi,
- f. Bentonit uygulaması,
- g. Uçucu asit konsantrasyonu,
- h. Malolaktik fermantasyonun yoğunluğu,
- i. Sıcaklık,
- j. Alkol konsantrasyonu [34].

3.2.2 Şarapta biyogenik amin oluşumunun önlenmesi

Fermante içeceklerdeki biyogenik aminlerin önemi açıklığa kavuşturulmamış olmakla birlikte; aminlerin, fermante içecekler çok az tüketilmeleri durumunda dahi baş ağrısı ve deride kızarıklık gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir. Devamlı şarap içenlerde siroz hastalığının ortaya çıktığı ve özellikle histaminin sirozun bir etkeni olduğu bildirilmekte, sağlık açısından histaminin alkolle birlikte alınmasının vücuttaki zararlı etkiyi arttırdığı ifade edilmektedir. Bu yüzden şarapta biyogenik aminlerin oluşma koşulları ve sınırlandırılmaları ile ilgili olarak;

- Isıtma uygulaması ile kırmızı şarap üretme tekniğinin uygulanabileceği,
- Mayşe fermantasyonu süresinin ve şıradaki amin asit içeriğinin biyogenik aminleri arttırabileceği,

- Malolaktik fermentasyonun önlenmesi ya da belirli laktik asit bakterilerinin (Leuconostoc'ların) çalışmasına izin verilmesi gerektiği,
- Şarap üretiminde bakteriyel fermentasyonun engellenerek saf maya suşlarının kullanılmasının histamin oluşumunu azaltacağı,
- Fermantasyondan sonra hemen mayadan ileri gelen tortunun ayrılması gerektiği,
- Alkolün histamin absorpsiyonunu hızlandırdığı,
- Alkol ve aldehitin birlikte aminooksidazların çalışmasını engellediği,
- Ortamdaki diğer biyojenik aminlerin toksik etkiyi arttırdığı,
- Katyon değiştirici kullanılmasının önerilebileceği belirtilmektedir.

Özellikle beyaz şarap üretiminde bentonit kullanımı ile histaminsiz şarap elde edilebileceği ya da miktarının öngörülen 2 mg/L'lik sınırın altına düşürülebileceği ifade edilebilir [34].

3.3 Nar Ekşisinde Bulunan Biyojenik Aminler

Kapiler elektroforez yöntemi, nar sularında karbonhidrat [37], organik asit [38] ve amino asit [10] analizi amacıyla kullanılmıştır. Nar suyu veya nar ekşisinde biyojenik amin analizi yapılan bir çalışma bulunamamıştır.

Son yıllarda, nar meyvesi (*Punica granatum*) sağlık üzerindeki olumlu etkisi sebebiyle dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalar narın antidiabetik, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiviral ve antikarsinojenik etkilerini kanıtlamıştır [5]. Bu etkilerin temel kaynağı nar meyvesinin antioksidan kapasitesidir.

Nar ekşisi ise nar suyunun içindeki şekerin karamelize olmasını sağlayıp suyunun uçurulması ve ağır ağır kaynatılması sonucu elde edilen koyu bir şerbettir. Nar ekşisinin hazırlanış basamakları göz önüne alınarak biyojenik amin varlığından şüphelenilmiştir.

4. DENEYSEL KISIM

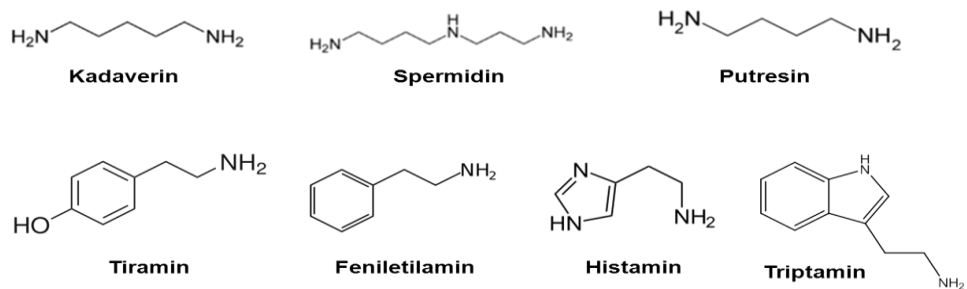
4.1 Malzemeler

Feniletilamin (PEA), tiramin (Tyr), kadaverin (Cad) ve histamin (His) Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya); triptamin (Trp), spermidin (Spd), putresin (Put) ve floreseyin izotiosiyanat izomer I (FITC) Fluka'dan (Buchs, Almanya) temin edilmiştir. Brij 35, dodesilsülfat sodyum tuzu (SDS), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ve aseton Merck'ten (Darmstadt, Almanya); susuz sodyum karbonat Carlo Erba'dan (Rodano, İtalya) temin edilmiştir. Bütün çözeltiler Elga Purelab Option-7-15 model sistemi ile elde edilen saf su kullanılarak saflaştırılmıştır. Şarap, nar suyu ve nar ekşisi örnekleri ise marketten alınmıştır.

4.1.2 Standartların türevlendirilmesi

15,0 mM Tyr; 10,5 mM PEA; 9,36 mM Trp; 6,8 mM Cad; 5,18 mM Sper; 9,9 mM His ve 9,0 mM Put standart çözeltileri hazırlanmıştır. Aseton içerisinde 19,2 mM FITC çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiler -4°C sıcaklıkta buzlukta muhafaza edilmiştir [12].

1 mL standart çözelti 0,15 mM Tyr, PEA ve Trp ; 0,3 mM Cad, Spd, His ve Put ; 9,5 mM FITC ve tampon çözelti, 84 mM Na_2CO_3 içerecek şekilde stok çözeltilerden hazırlanmıştır. Çözelti NaOH yardımıyla pH 9,6'ya ayarlanmış ve karanlıkta 40°C 'de 4 saat süreyle türevlendirilmiştir. Bu koşullar pik alanının en büyük değerine göre optimize edilmiştir. Çözelti iki kademde 1000 kat seyreltilmiş ve kapiler kolona enjekte edilmiştir.



Şekil 4.1 : Analizi yapılan biyojenik aminler.

4.1.3 Örneklerin türevlendirilmesi

Örneklerden en iyi sinyalin eldesi amacıyla kırmızı şarap ve nar ekşisi örnekleri değişen miktarlarda FITC çözeltisi ile muamele edilmiştir. Elektroferogramlarda artan FITC'ye ait pik belirlenerek örnek türevlenmesinin tamamlandığına karar verilmiştir. Kırmızı şarap örneği türevlendirmesi için 20 µL şarap örneği, 100 µL 19,2 mM FITC ve 380 µL 0,3 M Na₂CO₃ uygun görülmüştür. Bu çözelti 40°C'de 4 saat süreyle türevlendirilmiş ve 1 :50 ile 1 :200 arası oranlarda seyreltilerek enjekte edilmiştir.

Nar ekşisi örneği için, 1,25 g örnek tartılarak 2,5 mL 0,3 M Na₂CO₃ içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltiden alınan 50 µL örnek, 200 µL 19,2 mM FITC ve 250 µL 0,3 M Na₂CO₃ ile karıştırılarak şaraplara uygulanan prosedür ile türevlendirilmiştir. 1 :100 ve 1 :300 oranında seyreltilerek enjekte edilmiştir.

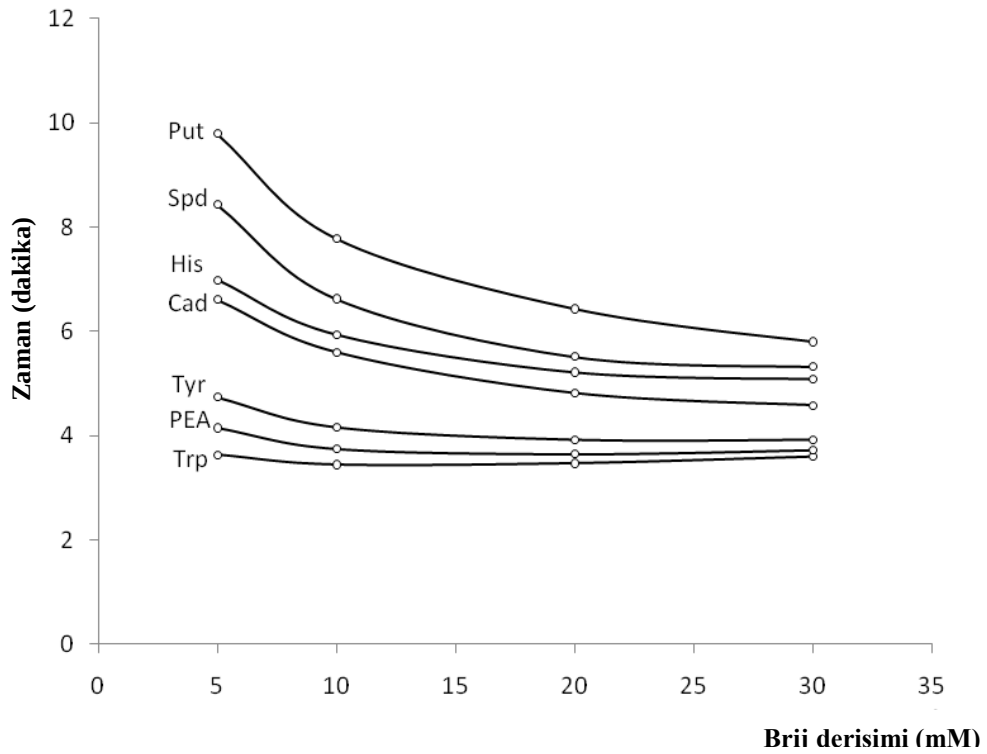
4.2 Cihazlar ve Enjeksiyon Koşulları

Ayrımlar Agilent kapiler elektroforez sisteminde (Waldbronn, Almanya) gerçekleştirilmiş ve ZETALIF 2.000 lazer indüklenmiş floresans dedektörde (Picometrics, Montlaur, Fransa) dedekte edilmiştir. 488 nm'de Ar-iyon lazer ile uyarılmıştır. Veri eldesi ve değerlendirmesi Agilent ChemStation programında yapılmıştır. Ayrım 25 kV potansiyel uygulanarak 25°C'de, enjeksiyonlar 50 mbar basınçta 6 saniyede gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan silika kapiler kolon 50 µm iç çapına sahiptir ve Polymicro Technologies'den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir. Toplam uzunluğu 58 cm ve etkin uzunluğu 50 cm'dir. Yeni silika kapiler ilk kullanımda 1 M NaOH ile 30 dakika, su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Gün başlarında kapiler kolon 1 M NaOH ile 15 dakika, su ile 2 dakika ve tampon çözelti ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Enjeksiyon aralarında 2 dakika 0,1 M NaOH ve su, 5 dakika süreyle tampon çözelti ile yıkama yapılmıştır.

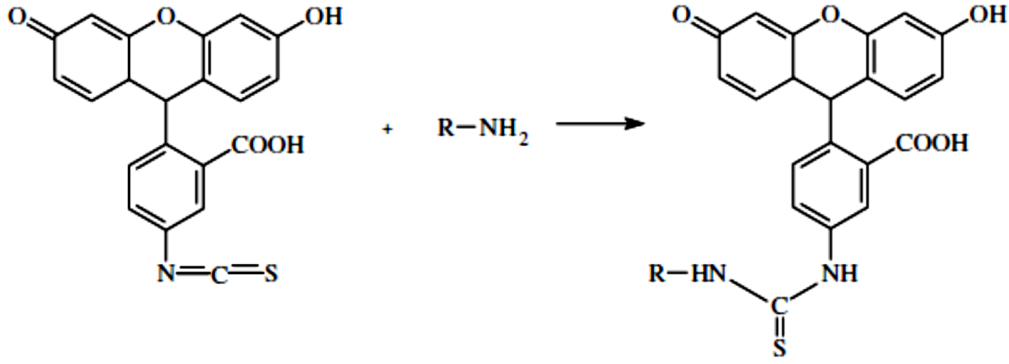
5. SONUÇLAR

Bu çalışmada şaraplarda bulunan biyogenik aminlerden Trp, PEA, Tyr, Cad, His, Spd ve Put ayırımı, dedeksiyonu ve yüksüz yüzey aktif içeren tampon çözeltide nicel analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.1’de pH’ı 9,6 olan 75 mM borat tamponunda Brij 35 derişimine karşı biyogenik aminlerin göç süreleri gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi yedi biyogenik amin için 5 ile 30 mM arası Brij derişimlerinde yeterli rezolüsyon sağlanmıştır. Ayrıca bu aralıkta akım sabit kalmıştır. Matris pikleri ile biyogenik amin pikleri arası uygun rezolüsyonu sağlamak amacıyla gerçek örnekler için optimum Brij derişimi belirlenmiştir.



Şekil 5.1 : Brij 35 derişimine karşı biyogenik aminlerin göç süreleri.

Uygulanan MECK metodunda Brij 35 yüzey aktif maddesi yüksüz miseller oluşturmuş ve bu miseller EOF etkisiyle katoda doğru göç etmiştir. FITC türevlendirilmiş biyogenik aminler ise negatif yüklü analitlerdir (Şekil 5.2) ve anodik uca göç etme eğilimindedirler. FITC türevlendirilmiş biyogenik aminler ve yüksüz miseller arasındaki etkileşim, biyogenik aminlerin ters yöndeki göçünü azaltmış ve ayırım süresi önemli ölçüde düşürülmüştür [12].



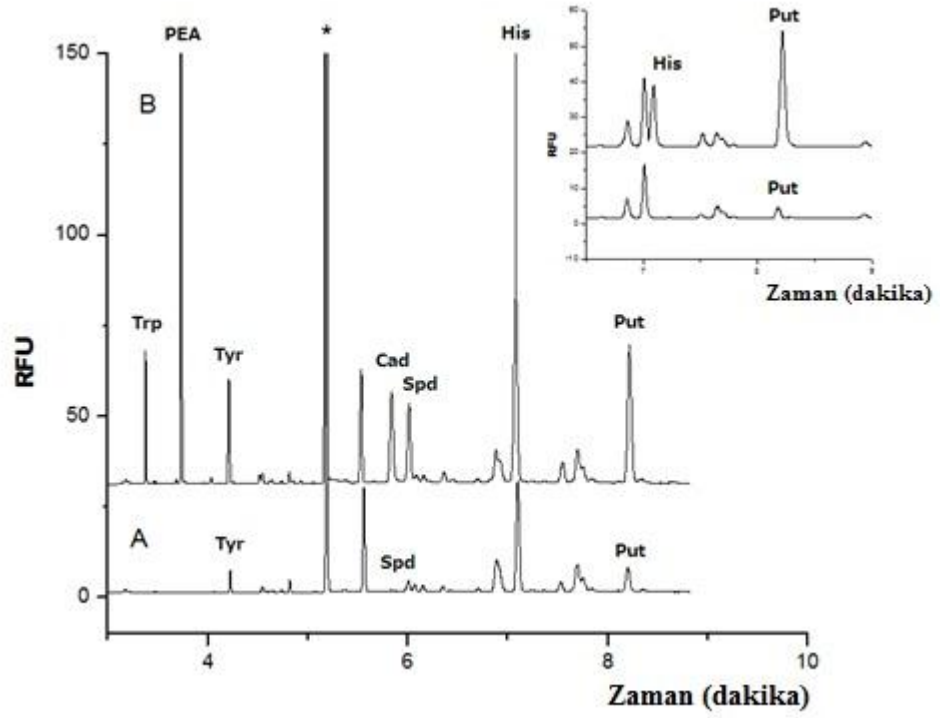
Şekil 5.2 : Amin bileşiklerinin FITC ile türevlendirilmesi.

Şekil 5.3'te optimum deney koşullarında elde edilen şarap örneğine ait elektroferogram, şekil 5.4'te nar ekşisi örneğine ait elektroferogram bulunmaktadır. Ayırma elektroliti olarak 75 mM borat tamponunda 9 mM Brij 35 çözeltisi seçilmiştir. Biyojenik aminler standart çözelti eklenerek tespit edilmiştir. Bu prosedür sayesinde yedi FITC türevlenmiş biyojenik amin ve artan FITC'ye ait pik (yıldız ile işaretlendi) gözlenerek 9 dakika içerisinde ayırım gerçekleştirilmiştir. His için yapılan eklemelerde pik başında gözlenen yarıma şüphe uyandırmış ve daha seyreltik enjeksiyonlarda ekleme tekrar edilmiştir. Üst kısımdaki elektroferogram 1 :200 oranında seyrelmiş şarap örneğine aittir. Eklenen histamin standardı şüpheli pik yanında yeni pik olarak gözlenmiş ve histamin olmadığına karar verilmiştir.

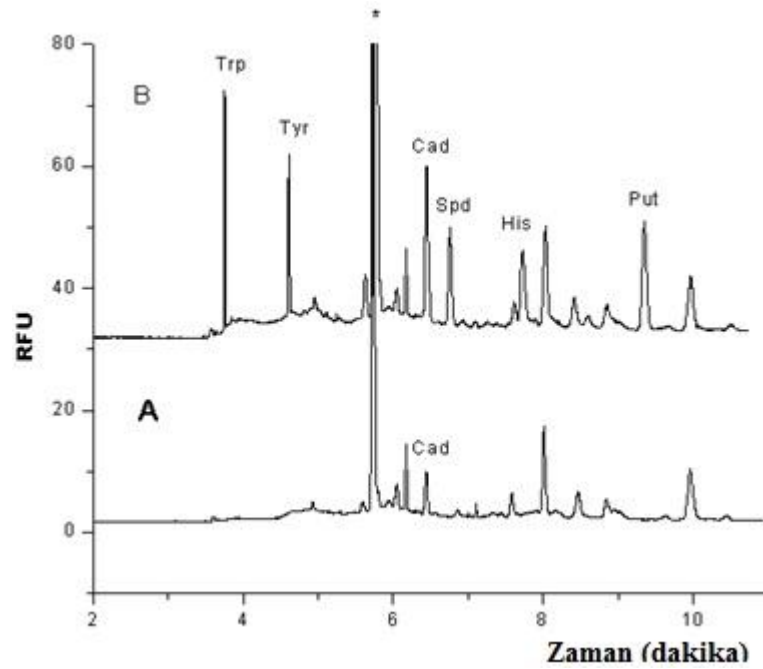
Çizelge 5.1'de elektroferogramlardan elde edilen veriler sonucu hesaplanan biyojenik amin miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 5.1 : Şarap (mg/L) ve nar ekşisi (mg/kg) örneklerinde biyojenik amin miktarları.

Örnek	Trp	PEA	Tyr	Cad	Spd	His	Put
Şarap 1	-	-	11,7 ± 0,15	-	15,3 ± 0,41	-	12,9 ± 0,28
Şarap 2	-	-	9,13 ± 0,09	-	12,0 ± 0,38	-	12,6 ± 0,23
Şarap 3	-	-	5,28 ± 0,07	-	3,31 ± 0,10	-	9,03 ± 0,16
Nar	-	-	-	70,0 ± 1,3			
Ekşisi							



Şekil 5.3 : (a) 1 :100 seyreltilmiş şarap örneğine ait elektroferogram (b) Biyojenik amin standartları eklenen şarap örneğine ait elektroferogram.



Şekil 5.4 : (a) 1 :300 seyreltilmiş nar ekşisi örneğine ait elektroferogram (b) Biyojenik amin standartları eklenen nar ekşisi örneğine ait elektroferogram.

Trp, PEA ve Tyr için 1-300 nM; Cad için 6-300 nM; Put için 4-600 nM; Spd için 6-800 nM ve His için 6-1000 nM aralığında kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. En küçük kareler yöntemi ile hesaplanan korelasyon sabiti değerleri 0,994-0,999 arasındadır.

Biyojenik aminler için tespit limiti (LOD) 0,416-1,26 nM arasında hesaplanmıştır. Tekrarlanırlık sonuçları düzeltilmiş pik alanları için %RSD cinsinden gün içinde üçten az, günler arası altıdan az değerlere sahiptir.

Her bir örnek üç kez analiz edilmiştir. Biyojenik amin miktarları çizelge 5.1’de gösterilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi Tyr, Spd ve Put bütün kırmızı şarap örneklerinde tespit edilmiştir. Nar ekşisi örneğinde sadece Cad bulunmuş, nar suyunda ise biyojenik amine rastlanmamıştır.

Geri kazanım çalışmaları, örneklerin üç ayrı derişimde biyojenik amin standartları eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Tatmin edici geri kazanım değerleri %93-104 olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2 : Şarap ve nar ekşisi örneklerine ait geri kazanım değerleri.

Örnek	Biyojenik amin	Örnekteki miktar (µM)	Eklenen miktar (µM)	Yüzde geri kazanım
Şarap	Tyr	0,016	0,009	102 ± 1,3
		0,016	0,018	101 ± 0,8
		0,016	0,030	104 ± 0,2
Şarap	Spd	0,025	0,018	99,9 ± 2,0
		0,025	0,036	93,0 ± 2,0
		0,025	0,060	102 ± 1,8
Şarap	Put	0,080	0,036	94,2 ± 1,8
		0,080	0,060	100 ± 1,0
		0,080	0,15	94,4 ± 0,7
Nar ekşisi	Cad	0,12	0,060	99,0 ± 2,4
		0,12	0,12	102 ± 1,9
		0,12	0,19	101 ± 1,0

Literatürde farklı bölgelerden elde edilen şarapların biyojenik amin içerikleri incelendiğinde hem biyojenik amin tiplerinin hem de biyojenik amin miktarlarının oldukça değişik olduğu gözlenmiştir [4,39,40]. Biyojenik amin miktarları 10mg/L’nin birkaç kat üstünde veya altında rapor edilmiştir. Ayrıca, aynı bölgeden elde edilen şaraplarda da yıllara göre biyojenik amin miktarının değiştiği görülmektedir. Türk şarapları üzerinde yapılan bir çalışmada amin içerikleri, bu çalışmada bulunan değerlerin altında rapor edilmiştir [30]. Şarapların biyojenik amin

içeriklerinde şimdilik Avrupa veya Amerika’da belirli bir sınırlama yoktur ancak bu yönde çalışmalar sürmektedir. Bazı ülkeler ithal edilen şaraplar için kendi sınırlamalarını koymuşlardır. Genel olarak, şarap üreticileri biyogenik amin miktarının 50-100 mg/L üstünde olması durumunda, aroma üzerinde etkili olduğunu iddia etmektedirler. Diğer yanda nar ekşisinin biyogenik amin içeriği konusunda bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak şaraplarda biyogenik amin türleri ve miktarları üzüm çeşidine, üretim aşamalarına ve hijyen koşullarına göre değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan MEKC-LIF metodu, şarap üretimi sırasında çeşitli basamaklarda şarapların biyogenik amin miktarlarının tespiti amacıyla kullanılabilecek hızlı ve ekonomik bir analiz yöntemidir. Metodun hassasiyeti, düşük derişimlerde biyogenik amin içeriklerinin tespitine imkan sağlamaktadır. Bu metot, nar ekşisi örneğinde olduğu gibi, meyve sularından elde edilen özellikle fermante ürünlere de kolaylıkla uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E., ve Yalçın, İ.**, 2004. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2
- [2] **Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A.**, 1998. A Principles of Instrumentation analysis 5th Edition Thomson Learning.
- [3] **Kalac, P., and Krausova, P.**, 2005: "A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods," *Food Chemistry*, vol. **90**, pp. 219.
- [4] **Del Prete, V., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., and Garcia-Moruno, E.**, 2009: "Occurrence of Biogenic Amines in Wine: The Role of Grapes," *Food Chemistry*, vol. **112**, pp. 474.
- [5] **Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., and Perez-Alvarez, J.A.**, 2010: "Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review," *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, vol. **9**, pp. 635.
- [6] **Tezcan, F., Gultekin-Ozguven, M., Diken, T., Ozcelik, B., and Erim, F.B.**, 2009: "Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices," *Food Chemistry*, vol. **115**, pp. 873.
- [7] **Zhang, N., Wang, H., Zhang, Z.X., Deng, Y.H., and Zhang, H.S.**, 2008: "Sensitive determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with a new fluorogenic reagent 3-(4-fluorobenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde," *Talanta*, vol. **76**, pp. 791.
- [8] **Male, K.B., and Luong, J.H.T.**, 2001: "Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, vol. **926**, pp. 309.
- [9] **Nouadje, G., Simeon, N., Dedieu, F., Nertz, M., Puig, P., and Couderc, F.**, 1997: "Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, vol. **765**, pp. 337.
- [10] **Simo, C., Moreno-Arribas, M.V., and Cifuentes, A.**, 2008: "Ion-trap versus time-of-flight mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis to analyze biogenic amines in wine," *Journal of Chromatography A*, vol. **1195**, pp. 150.

- [11] **Santos, B., Simonet, B.M., Rios, A., and Valcarcel, M.,** 2004: "Direct automatic determination of biogenic amines in wine by flow injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. **25**, pp. 3427.
- [12] **Baskan, S., Tezcan, F., Kose, S., Oztekin, N., and 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*, vol. **31**, pp. 2174.
- [13] **Heiger D.,** 2000. High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction, *Agilent Technologis*, Germany.
- [14] **Tanbay, E.,** 2010. Protein Ayırma Saflaştırma Yöntemleri, Elektroforez ve İki yönlü Elektroforez, Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kayseri.
- [15] **Hjérten, S.,** 1990: "Zone broadening in electrophoresis with special reference to high performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice," *Electrophoresis*, vol. **11**, pp. 665–690.
- [16] **Terabe, S.,** 1989: "Electrokinetic chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography," *Trends Analytical Chemistry*, vol. **8**, pp. 129-134.
- [17] **Nutku, M.S.,** 1998. The Effect of Polyelectrolyte in the Capillary Electrophoretic Separation of Inorganic Anions, Organic Acids and DNA, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstanbul.
- [18] **Takeyuki, T., Hiroaki, I., Hiroyuki, K., Toyonori, N., and Eiji, T.,** 2005: "The Application of Laser Induced Fluorescence Spectroscopy to Measurement of Purity Level in Textiles," *Jido Seigyo Rengo Koenkai*, vol. 48, pp. 1-15.
- [19] **Url-1** <<http://bart.chemi.muni.cz/courses/Lab>> 02.04.2011.
- [20] **Silla-Santos, M. H.,** 1996: "Biogenic amines: their importance in foods," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 29, pp. 213.
- [21] **Bardöcz, S.,** 1995: "Polyamines in food and their consequences for food quality and human health," *Trends in Food Science And Technology*, vol. **6**, pp. 341-346.
- [22] **Rice, S.L., Eitenmiller, R.R., and Kohler, P.E.,** 1976: "Biologically active amines in food: A review," *Journal of Milk Food Technology*, vol. **39**, pp. 353-358.
- [23] **Sinell, H.J.,** 1978: "Biogene Amino als Risikofaktoren in der Fischhygiene," *Archiv für Lebensmittelhygiene*, vol. **29**, pp. 206-210.
- [24] **Maijala, R.,** 1994: "Histamine and tyramine production by a Lactobacillus strain subjected to external pH decrease," *Journal of Food Protect*, vol. **57**, pp. 259-262.
- [25] **Url-2** <http://en.wikipedia.org/wiki/Biogenic_amine> 02.04.2011.

- [26] **Yerlikaya, P., and Gökoğlu, N.,** 2002: "Biyojen aminler ve önemi," *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Dergisi*, vol. 6, pp. 24-30.
- [27] **Halasz, A., Barath, L.S.S., and Holzapfel, W.,** 1994: "Biogenic amines and their production by microorganisms in food," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 5, pp. 42-49.
- [28] **Ölmez, H.K.,** 2000: "Biyojenik Aminler," *Gıda-Dergisi*, vol. 5, pp. 51-57.
- [29] **Shalaby, A.R.,** 1996: "Significance of biogenic amines to food safety and human health," *Food Research International*, vol. 29, pp. 675-690.
- [30] **Anlı, R.E., and Bayram, M.,** 2009: "Biogenic Amines in Wines," *Food Reviews International*, vol. 25, pp. 86.
- [31] **Ancin-Azpilicueta, C., Gonzalez-Marco, A., and Jimenez-Moreno, N.,** 2008: "Current Knowledge About the Presence of Amines in Wine," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, pp. 257.
- [32] **Lonvaud-Funel, A.,** 2001: "Biogenic Amines in Wines: Role Of Lactic Acid Bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 199, pp. 9-13.
- [33] **Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., and Borrull, F.,** 1997: "Determination of Biogenic Amines in Wines By High-Performance Liquid Chromatography With On-Column Fluorescence Derivatization," *Journal Of Chromatography A*, vol. 757, pp. 311-318.
- [34] **Gürbüz, O.,** 2002: "Şarapta Biyojen Aminler," *Gıda*, vol. 27, pp. 85-90.
- [35] **Anlı, R.E.,** 2002: "Şaraplarda Bazı Biyojen Aminlerin Belirlenmesi," *Gıda*, vol. 27, pp. 225-227.
- [36] **Bakırcı, İ.,** 2000: "Peynirde Biyojen Amin Oluşumu ve Etkili Faktörler," *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri*, pp. 328-331.
- [37] **Gurel, A., Hizal, J., Oztekin, and N., Erim, F.B.,** 2006: "CE Determination of Carbohydrates Using a Dipeptide as Separation Electrolyte," *Chromatographia*, vol. 64, pp. 321.
- [38] **Tezcan, F., Gultekin-Ozguven, M., Diken, T., Ozelik, B., and Erim, F.B.,** 2009: "Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices," *Food Chemistry*, vol. 115, pp. 873.
- [39] **Zhijun, L., Yongning, W., Gong, Z., Yunfeng, Z., and Changhu, X.,** 2007: "A survey of biogenic amines in chinese red wines," *Food Chemistry*, vol. 105, pp. 1530-1535.
- [40] **De Borja, B.M., and Rohrer, J.S.,** 2007: "Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 1155, pp. 22-30.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sesil Uzaşçı

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 04.09.1988

Yüksek Lisans: Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2011

Lisans: Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2009

Yayın:

Uzaşçı S., Başkan S., and Erim F.B., 2011: “Biogenic Amines in Wines and Pomegranate Molasses - A Non-Ionic Micellar Electrokinetic Chromatography Assay with Laser-Induced Fluorescence Detection,” *Food Analytical Methods*, DOI 10.1007/s12161-011-9220-6 (Basım aşamasında).