İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA ÖRNEKLERİNE HEDEFLİ KAPİLER ELEKTROFOREZ-LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORESANS TEKNİĞİ İLE YENİ ANALİZ YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Filiz TEZCAN TEKELİ

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

KASIM 2014

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA ÖRNEKLERİNE HEDEFLİ KAPİLER ELEKTROFOREZ-LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORESANS TEKNİĞİ İLE YENİ ANALİZ YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Filiz TEZCAN TEKELİ
(509082203)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

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

KASIM 2014

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509082203 numaralı Doktora Öğrencisi **Filiz TEZCAN TEKELİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"GIDA ÖRNEKLERİNE HEDEFLİ KAPİLER ELEKTROFOREZ-LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORESANS TEKNİĞİ İLE YENİ ANALİZ YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN** .....
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **25 Eylül 2014**

Aileme,

ÖNSÖZ

Azim, sabır ve emek… Bu uzun yolculukta danışmanımdan öte her daim yanımda olduğunu bildiğim gerçek "hoca", gerçek "araştırmacı" sayın Prof. Dr. F. Bedia Erim BERKER'e yalnız doktora sürem değil İTÜ'deki akademik hayatım boyunca bana kattığı, öğrettiği her şey için; her defasında yoluma ışık tuttuğu için sonsuz teşekkürler…

İTÜ'deki yıllarımı güzelleştiren Analitik Kimya katındaki neşe dolu can dostlarıma, varlıklarıyla güç bulduğum TEZCAN ve TEKELİ ailelerine,

Desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a (108T873 nolu proje kapsamında) ve İTÜ- BAP birimine yürekten teşekkür ederim.

Eylül 2014

Filiz TEZCAN TEKELİ
Yüksek Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xvii**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ **5**
2.1 Çalışma Prensibi 5
2.2 Kapiler Elektroforez Cihazı ve Parçaları 8
2.2.3 Dedektör 10
2.2.3.1 Lazer indüklenmiş floresans (LIF) dedektörleri 10
2.2.4 Numune verme 11
2.3 Kapiler Elektroforez Yöntemleri 12
2.3.1 Kapiler Zon elektroforez (CZE) 12
2.3.2 Misel Elektrokinetik Kromatografi 13
3. TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLEN ANALİTLER **15**
3.1 Amino Asitler Hakkında Genel Bilgi 15
3.1.1 Amino asitlerde konfigürasyon ve optikçe aktiflik 17
3.1.2 Amino asitlerin sudaki çözünürlüğü 18
3.1.3 Amino asitlerin ışık absorpsiyonu 18
3.1.4 Amino asitlerin sınıflandırılması 18
3.1.4.1 Yan grup R'nin özelliklerine göre sınflandırma 18
3.1.4.2 Biyolojik özelliklerine göre sınıflandırma 18
3.1.5 Amino asitlerin biyolojik işlevleri 19
3.2 Riboflavin (B2 Vitamini) 20
4. DENEYSEL KISIM **23**
4.1 Amino Asitlere Ait Deneysel Çalışmalar 23
4.1.1 Kullanılan malzemeler ve cihazlar 23
4.1.2 Kiral amino asitlerin ayırma ortamının seçimi 24
4.1.3 Standart amino asit çözeltilerinin türevlendirilme şartlarının tespiti 25
4.1.4 Meyve suyu örneklerinin türevlendirilmesi 26
4.2 Riboflavin Molekülüne Ait Deneysel Çalışmalar 27
4.2.1 Kullanılan malzemeler ve cihazlar 27
4.2.2 Riboflavin molekülünün ayırma ortamının seçimi 28
4.2.3 Riboflavinin bitkilerden ekstraksiyon şartlarının tespiti 29
5. SONUÇLAR **33**
5.1 Kiral Amino Asit Analiz Yöntemi 33
5.1.1 Metod validasyon sonuçları 35
5.2 Amino Asit Analiz Yönteminin Gıda Örneklerine Uygulaması 36

5.2.1 Nar sularının amino asit profillerinin saptanması 36
5.2.2 Nar suyunun elma suyu ile hilelendirilmesinin teşhisi..... 39
5.2.3 Nar suyunun üzüm suyu ile hilelendirilmesinin teşhisi 41
5.3 Riboflavin Analiz Yöntemi 42
5.3.1 Metod validasyon sonuçları 43
5.4 Riboflavin Analiz Yönteminin Gıda Örneklerine Uygulaması 44
5.5 Tartışma ve Yorum..... 45
KAYNAKLAR..... 49
ÖZGEÇMİŞ..... 53

KISALTMALAR

μ_e	**:** Elektroforetik Mobilite
μ_a	**:** Görünen Mobilite
μ_{eo}	**:** Elektroosmotik Mobilite
CE	**:** Kapiler Elektroforez
CZE	**:** Kapiler Zon Elektroforez
MEKC	**:** Misel Elektrokinetik Kromatografi
CGE	**:** Kapiler Jel Elektroforez
UV-GB	**:** Ultraviyole-Görünür Bölge
FITC	**:** Floresein izotiyosiyanat
LIF	**:** Lazer İndüklenmiş Floresans
HPLC	**:** Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
GC	**:** Gaz Kromatografisi
RF	**:** Riboflavin
RFU	**:** Bağıl Floresans Birimi
SDS	**:** Sodyum Dodesil Sülfonat
SDBS	**:** Sodyum Dodesil Benzen Sülfonat
LOD	**:** Tespit sınırı
LOQ	**:** Tayin sınırı
CD	**:** Siklodekstrin

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kapiler Elektroforez'de kullanılan dedeksiyon türleri ve limitleri 10
Çizelge 3.1 : Standart amino asitler ve kısaltmaları 15
Çizelge 3.2 : Standart amino asitlerin P_{Ka} ve P_I değerleri 16
Çizelge 3.3 : Çeşitli gıdalara ait Riboflavin içeriği 21
Çizelge 5.1 : Standart kiral amino asit piklerinin rezolüsyon değerleri 34
Çizelge 5.2 : Standart kiral amino asit çözeltilerinin kalibrasyon değerleri..... 35
Çizelge 5.3 : Standart kiral amino asit piklerine ait validasyon sonuçları..... 35
Çizelge 5.4 : Amino asit çalışmasına ait geri kazanım sonuçları 36
Çizelge 5.5 : Nar suyu numunelerinin amino asit içeriği 38
Çizelge 5.6 : Elma suyu numunelerinin amino asit içeriği..... 40
Çizelge 5.7 : Üzüm suyu numunelerinin amino asit içeriği..... 41
Çizelge 5.8 : Riboflavin çalışmasına ait validasyon sonuçları 43
Çizelge 5.9 : Riboflavin çalışmasına ait geri kazanım sonuçları..... 44
Çizelge 5.10 : Çay numunelerine ait Riboflavin sonuçları..... 45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kapiler kolonunun yüklenmesi 6
Şekil 2.2 : Kolon içindeki türlerin sistemi terk etme zamanları 7
Şekil 2.3 : a) Eletroosmotik akış **b)** Parabolik akış ve sonuçları 7
Şekil 2.4 : Kapiler Elektroforez cihazı 8
Şekil 2.5 : Eritilmiş silika kapiler kolonun iç kesiti 9
Şekil 2.6 : Enjeksiyon sistemleri: **a,b,c:** Hidrodinamik **d:** Elektrokinetik Enjeksiyon 12
Şekil 2.7 : Kapiler Zon Elektroforez'de türlerin ayrımı 13
Şekil 3.1 : Ortamın pH'ına bağlı olarak amino asit moleküllerinin yüklenmesi 16
Şekil 3.2 : Alanin amino asidinin L- ve D- konfigürasyonları 17
Şekil 3.3 : Riboflavin molekülü 20
Şekil 4.1 : FITC ile türevlendirilmiş amino asit molekülü 25
Şekil 4.2 : Riboflavin molekülünün floresans şiddetine pH etkisi 28
Şekil 4.3 : Riboflavin molekülünün floresans şiddetine tampon derişiminin etkisi .. 29
Şekil 4.4 : Farklı demlenme çözeltilerinde, zamana karşı RF miktar değişimi 30
Şekil 4.5 : Farklı demleme çözeltilerinde, çay numunesindeki hesaplanan RF miktarı 31
Şekil 5.1 : Farklı tampon kombinasyonlarının kiral amino asit pikleri üzerinden etkisi 34
Şekil 5.2 : 1/50 oranında seyreltilen konsantre A marka nar suyu elektroferogramı 37
Şekil 5.3 : 1/200 oranında seyreltilen sıkma nar 1 suyu elektroferogramı 38
Şekil 5.4 : 1/200 oranında seyreltilen yeşil elma suyu elektroferogramı 39
Şekil 5.5 : Nar ve elma sularına ait L-Asn miktarları 40
Şekil 5.6 : 1/500 oranında seyreltilen beyaz üzüm 1 suyu elektoferogramı 41
Şekil 5.7 : Nar ve üzüm sularının L-Pro ve L-Arg miktarlarının karşılaştırılması 42
Şekil 5.8 : 0,3 µM Riboflavin standartına ait elektroferogram 43
Şekil 5.9 : a) 1/2 oranında seyreltilen S1 marka adaçayı, **b)** 1/2 oranında seyreltilen S1 marka adaçayı üzerine eklenen 0,3µ RF standartı ile elde edilen elektroferogram 44

GIDA ÖRNEKLERİNE HEDEFLİ KAPİLER ELEKTROFOREZ-LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORESANS TEKNİĞİ İLE YENİ ANALİZ YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Günümüzde, tüketicilerin kullandıkları gıda ürünlerinin kalite ve güvenilirliğine dair artan bilgilendirme talepleri; gıda örneklerine yönelik daha güvenilir daha hassas ve daha hızlı analitik tekniklerin geliştirilmesini ihtiyaç haline getirmiştir. HPLC ve GC gibi klasik kromatografik yöntemlerin yanı sıra Kapiler Elektrofez (CE) bu ihtiyaç doğrultusunda; çok farklı gıda örneklerine başarı ile uygulanabilen alternatif bir ayırma tekniğidir. Analitlerin yüksek bir elektrik alan altında, silika kolon içinde ayrımlarının gerçekleştiği bu yöntemin; yüksek hızda ayırma gücü, ayırma etkinliği ve kullanılan örnek hacminin azlığı başlıca avantajlarındandır. Kapiler Elektroforez sistemlerinde ayrıca sisteme dahil edilebilen çeşitli dedektörler vasıtasıyla türler kolaylıkla tespit edilmektedir. Son yıllarda Kapiler Elektroforez sistemine Lazer İndüklenmiş Floresans (LIF) detektörün bağlanabilmesi floresans özellik gösteren maddelerin çok duyarlı tayinini mümkün kılmıştır. Gerçekleştirilen bu doktora çalışmasında da, gıda ürünlerinin içeriklerinin belirlenmesi amaçlı yeni Kapiler Elektroforez-Lazer İndüklenmiş Floresans teknikleri geliştirilmiştir.

Bilindiği üzere amino asitler, insanlar için besleyici değeri yüksek olan gıda bileşenlerindendir. Uzunca bir süre canlı organizmalarında sadece L- formundaki amino asitlerin varlığına inanılsa da; geliştirilen yeni metotlar sayesinde bitkilerde, meyvelerde ve hatta insan vücudunda doğası gereği D- formundaki amino asitlerinde var olduğu ortaya çıkmıştır. Bu yaklaşımlar D- formundaki amino asitlerin biyolojik rollerinin öneminin aydınlatılmasında yeni araştırma kapılarının açılmasına zemin hazırlamıştır. Günlük beslenme zincirinde gerek L- gerekse D- formundaki amino asitleri içeren gıdalar yer aldığından, bu ürünlerin kiral amino asit içeriklerinin saptanabilmesi amacıyla daha hassas analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doktora çalışmasının ilk amacı da; gıda örneklerine yönelik kiral amino asitlerin tespiti için Kapiler Elektroforez- Lazer İndüklenmiş Floresans yöntemi geliştirmek olmuştur.

Çalışmada floresans özellik göstermeyen amino asit moleküllerinin türevlendirici ajanı olarak 488 nm'de uyarılabilen ve 520 nm'de emisyon yapabilen floresein isotiyosiyanat (FITC) molekülü kullanılmıştır. FITC molekülünün floresans şiddetinin pH=9 civarında yüksek olması sebebiyle analizlerde kullanılacak tampon çözelti olarak pH'ı 9,6 olan borat tamponu seçilmiştir. İlk olarak içeriği bilinen standart amino asit çözeltilerinin floresein isotiyosiyanat ajanı ile birleşme oranı irdelenmiştir. Bu amaçla farklı toplam amino asit derişimi: karışım çözeltisindeki son FITC derişim oranları denenmiştir. Toplam amino asit derişimi: FITC derişimi oranı 1:20, 1:10, 1:5, 1:2 ve 1:1 olacak şekilde karışımlar hazırlanmıştır. Benzer şekilde farklı sıcaklıklarda ve farklı türevlendirme süreleri irdelenmiştir. Oda sıcaklığı- 30-40-50-60 ^{o}C denenen sıcaklıklar arasında olup 1, 3, 4, 8, 16 saat gibi farklı türevlendirme süreleri test edilmiştir.

Elde edilen tüm deneme çözeltileri seçilen uygun bir çalışma tamponu içinde gerekli seyreltmeler uygulanarak analiz edilmiştir. Tüm denemeler sonucunda en verimli türevlendirme; toplam amino asit derişiminin FITC derişimine oranının 1:1 olduğu, 40 ^{o}C 'de 4 saat süre ile gerçekleştirilen prosedür olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın devamında siklodekstrin (CD) ve türevlerinin kiral moleküllerin ayrımındaki etkileri irdelenmiştir. Bu amaçla α, β, γ-CD, heptakis β-CD ve 2-hydroksipropil-*β*-CD gibi kiral ayrımı sağlayan çözeltiler 5-20 mM arasında değişen derişimlerde denenmiştir. Kiral çiftlerin en iyi ayrımı β-CD varlığında elde edilmiştir. Detaylandırılan çalışmada bağıl floresans şiddetinin arttırılması için çalışma elektrolitine farklı polimerik çözeltiler ve yüzey aktif maddeler ilave edilerek tampon ilavelerinin türevlendirilmiş amino asitlerin floresans şiddetine etkileri araştırılmıştır. Denenen farklı kombinasyonlar sonucu en yüksek floresans şiddeti Sodyum dodesilbenzen sülfonat (SDBS) yüzey aktif molekülünün varlığında elde edilmiştir. Standart kiral amino asit karışımının ayrımı sonuç olarak 50 mM borat, 10 mM β-CD ve 5 mM SDBS çözeltileriyle oluşturulan tampon çözelti içinde başarıyla gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen bu yöntemin literatürdeki diğer metodlardan farklı olarak iki önemli avantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki; pik yüksekliği diğer sistemlerden farklı olarak yaklaşık 1,5-2 kat arttırılmıştır. Diğer avantaj ise; kiral moleküller için benzer ayrımcılık çok daha düşük derişimdeki β-CD varlığında tespit edilmiştir.

Bu aşamadan sonra analizi gerçekleştirilen tüm amino asit molekülleri için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bir standart için ayrı ayrı kalibrasyon denklemleri oluşturulmuş ve en düşük korelasyon sabiti 0,992 olarak hesaplanmıştır. Validasyon çalışmalarının devamında düzeltilmiş alan hesabı (alan/zaman) ile gün içi tekrarlanırlık değerlerinin % bağıl standart sapma değeri %4,63'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada yapılan hesaplamalar sonucu amino asit standart çözeltilerinin LOD değerleri 0,848-3,99 nM mertebesinde bulunmuştur.

Geliştirilen bu yeni analiz metodu nar sularının amino asit profilinin aydınlatılmasında kullanılmıştır. Şimdiye kadar birçok meyvenin amino asit içeriği aydınlatılmış olsa da; son yıllarda insan sağlığı üzerinde olumlu etkileriyle popüler olan nar (*Punica granatum*) için bu bilgilerin eksikliği göze çarpmaktadır. Bu çalışma sayesinde ilk kez nar sularının amino asit profilleri oluşturulmuş ve amino asit içerikleri açıkça irdelenmiştir.

Gıda örnekleri olarak üç adet taze sıkılmış nar suyu ile üç adet marketlerden temin edilen %100 ticari nar suları kullanılmıştır. Tespit edilen türevlendirme koşulları örneklere uygulanmıştır. Nar suyunda dokuz farklı L- formunda amino asit tespit edilirken, D- formunda iki farklı amino asit tespit edilmiştir.

Gıda ürünlerindeki hilelendirme hem kalite hem de insan sağlığı açısından yaygın bir problem haline gelmiştir. Özellikle ticari değeri daha yüksek olan gıdaların üretilmesinde bu durum giderek artan bir problemdir. Bu yüzden; gerek insan sağlığı gerekse ekonomi açısından herhangi bir olumsuzluğa neden olmaması için gıda içeriklerinin aydınlatılması önemli bir araştırma konusudur. Gıdalarda tespit edilecek olağan dışı herhangi bir kimyasal bileşen bu hilelerin ortaya çıkmasında önemli bir ip ucu olmaktadır.

Nar suyu gerek yoğun talep gerek kısa hasat süresi gerekse üretim alanının darlığı sebebiyle "gıda hilelendirilmesi" ne maruz kalan bir üründür. Ticari nar suları genellikle daha ucuza ve daha uzun süre temin edilebilen üzüm ve elma sularıyla karıştırılarak hilelendirilmektedir. Bu üç farklı gıda ürününde tespit edilebilecek

amino asit farklılığı piyasaya sürülen ticari ürünün aydınlatılmasında önemli bir kanıt olacaktır.

Bu hedefle yola çıkılarak; üç farklı tipteki elma ve yine üç farklı tipteki üzüm suları hazırlanarak, aynı yöntemle amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir. Üç farklı tipteki meyve suyunun amino asit profili irdelendiğinde L-Asparajin miktarının elma suyunda nar suyuna göre anlamlı oranda, L-Arjinin'in üzüm suyunda nar suyuna göre anlamlı oranda fazla olduğu tespit edilmiştir. Nar suyunun ortalama amino asit profilinde L-Asparajin artışı elma suyu ilavesini, L-Arjinin artışı üzüm suyu ilavesini tanımlamada kullanılabilecek yöntem olarak önerilmiştir.

Doktora çalışmasının ikinci basamağında yine aynı dedektör sistemiyle bu kez kendiliğinden floresans özelliği olduğu bilinen, suda çözünebilen B2 vitamininin (Riboflavin, RF) analizi gerçekleştirilmiştir.

Riboflavin vücutta sentezlenemediğinden ve de depolanamadığından günlük beslenme zincirinde yer alması gereken bir vitamindir. Gıda örneklerin kompleks matriksi ve B2 vitamininin doğal gıdalardaki az miktarı nedeniyle B2 analizleri güçtür. Bu açıdan doğal floresans özellik gösteren bu vitaminin çok hassas LIF detektörle tayini hedeflenmiştir.

Bazik çözeltilerde negatif yük kazandığı bilinen Riboflavin analizi için denenen borat ve fosfat tamponları sonucunda fosfat tamponu ile devam edilmeye karar verilmiştir. Daha sonraki aşamada floresans şiddetinin pH ve konsantrasyon ile ilişiği irdelenmiştir. 5-12 denenen pH aralığı olup pH=9,9 pik yüksekliği bakımından en iyi neticeyi vermiştir. Benzer şekilde tampon konsantrasyonunun etkisi 15-75 mM arasında araştırılmıştır. Sonuç olarak ayırma ortamı olarak pH değeri 9,9 olan 30 mM fosfat tamponu seçilmiş ve analiz 4 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığı 0,01-5 µM aralığında, 0,999 korelasyonla tespit edilmiştir. Çalışılan bu şartlar altında beklenildiği üzere düşük LOD değerine (1,08 ng/mL) ulaşılmıştır. Yapılan tekrarlanırlık çalışmalarının bağıl standart sapma sonuçları pik alanı için gün içi için %2,48 iken günler arası bu değer %4,58 olarak hesaplanmıştır.

Bu yöntem Türk insanının günlük hayatta oldukça sık tükettiği farklı tipteki toplam 14 adet çay numunelerinin B2 içeriğinin tayinine başarı ile uygulanmıştır. Seçilen bir tipteki çay numunesinde RF'nin tamamının ekstrakte edilebilmesi için çeşitli demleme prosedürleri uygulanmıştır. Su banyosu üzerinde bekletilmek suretiyle kaynar su, 80 ^{o}C'ye kadar ısıtılmış NaOH ve HCl gibi farklı demleme çözeltileri denenmiştir. Benzer şekilde 5-10-15 dk olmak üzere farklı demleme sürelerinin ekstrakte edilen Riboflavin miktarına etkisi araştırılmıştır.

Sonuç itibariyle, RF'nin tamamının çekilebildiği en etkin demleme reçetesi; kaynar su içinde 5 dk süre ile su banyosunda bekletmek olarak tespit edilmiştir. Bu ön hazırlık haricinde hiçbir türevlendirme işlemi gerektirmeyen çay örnekleri sisteme doğrudan verilmiştir. Bitki çaylarında hesaplana Riboflavin içeriği 0,34-10,36 µg/g olarak tespit edilmiştir.Hesaplanan bu miktarla bitki çaylarının uygun birer B2 vitamini kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu yöntem ile literatürde ilk defa siyah çay, adaçayı ve biberiye çaylarının B2 vitamini içeriği aydınlatılmıştır.

DEVELOPMENT OF NOVEL CAPILLARY ELECTROPHORESIS - LASER INDUCED FLUORESCENCE TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF FOOD SAMPLES

SUMMARY

Nowadays, increasing consumer demands on being informed on the quality and safety of their food necessitates developments of new more reliable, more sensitive and faster analytical techniques for the analysis of different food samples. Among the classical chromatographic techniques like HPLC and GC, capillary electrophoresis (CE) is a comparatively new alternative separation technique. However this separation method has already been successfully applied to a large variety of food samples. The main advantages of CE are fast separation speed, very small sample consumption and high separation efficiency. CE is based on the separation of analytes inside a silica capillary column under a high electrical field. The separated analytes are detected on-line with a detector coupled with capillary electrophoresis system. Recently the use of laser induced fluorescence (LIF) detectors with CE provided very high sensitivity. In the present study, new CE-LIF methods were developed for the analysis of food ingredients.

Amino acids are one group of food ingredients, which have important nutritional values for humans. It has been long believed that living organisms contain only the L-form of amino acids. The evolution of analytical methods has revealed that D-amino acids are naturally present in many plants and fruits, and also in the human body. The health effects of D- amino acids are a challenging subject and have been highly investigated. Thus, a new research area has been opened on the investigation of the biological roles of D- amino acids. Since both D- and L- amino acids are consumed as part of the normal human diet, a need exists to develop more sensitive analytical techniques that are easily applicable to determine the contents of chiral pairs of amino acids in a large variety of foods. The first goal of this work was to develop a CE-LIF method for the fast and sensitive determination of chiral amino acids.

Since amino acids do not have native fluorescence, it is necessary to derivatize them before performing LIF detection. In the present study, fluorescein isothiocyanate (FITC) has been chosen as a fluorescent label for amino acids because its excitation wavelength matches the 488 nm light of the argon laser of CE instrument in laboratory. Since FITC gives maximum fluorescence intensity around pH 9, borate was selected as separation buffer and pH was set at 9.6. Derivatization conditions of amino acids were optimized. Firstly, optimal derivatization ratio between total amino acid concentration and final concentration of FITC molecule was determined. For this purpose, total amino acids/ FITC concentration ratios as 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 were tried. Secondly different temperature values, such as 30, 40, 50 and 60 ^{o}C were studied in order to get the most favorable derivatization efficiency. Furthermore derivatization time was examined. For this step 1, 3, 4, 8 and 16 hours for derivatization times were studied.

Considering the most the favorite fluorescence intensity and the shortest derivatization time, optimal derivatization conditions were selected as 1:1 molar ratio of total amino acid concentration to FITC. The mixture was prepared in borate buffer and allowed to stand in the dark at 40 ^{o}C for 4 h.

Different chiral selectors were tested to obtain the resolutions of enantiomer pairs namely, α-CD (cyclodextrin), β-CD, γ-CD, heptakis β-CD and hydroxypropyl- β-CD. Chiral selectors were added to the separation buffer in the concentrations changing between 5 and 20 mM. The best resolution of chiral molecules' peaks was achieved by means of β-CD. Then, different buffer additives were studied to enhance the fluorescence intensities of FITC derivatized amino acid molecules. For this purpose, several organic solvents like methanol, buthanol and isobutyl alcohol, several water soluble polymers like sodium alginate, m-OH-propylcellulose and polystyrene and several surfactants like sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium dodecyl benzene sulphonate (SDBS) and Brij 35 were tested. Amongst the tested buffer additive, SDBS gave the best result. Consequently, optimal separation electrolyte composition was selected as 50 mM borate, 10 mM β-CD and 5 mM SDBS considering the best peak resolutions and fluorescence intensities of enantiomer pairs. In the present study, SDBS was used first time in the amino acid separation by CE. Comparing separations of chiral amino acid pairs by capillary electrophoretic methods reported in the literature, two main advantages of the SDBS containing separation buffer were observed. The peak heights increased 1.5–2 folds and the same resolutions were obtained with comparatively less β-CD concentration. Low chiral selector consumption in the proposed system allows the test of expensive selectors.

The analysis method was validated in order to find quantitative amounts of amino acids. Good linearity results are obtained by plotting peak areas *vs*. analyte concentrations, with correlation coefficients larger than 0.992. For the precision of the method, the amino acid mixture was injected five times in one day. The RSD values of peak areas are smaller than 4.63. The limit of detection was calculated as three times the average noise taken for three different baseline areas. The limit of detection values changed between 0.848 and 3.99 nM.

This new analysis method was used to identify the amino acid profile of pomegranate juices. Pomegranate fruit (*Punica granatum*) has taken great attention for its health benefits in the last years. Though amino acid profiles of many fruit juices has been revealed by now, studies on the amino acid profile of pomegranate juices are essentially nonexistent. With the results of this study, the complete amino acid profiles and contents of pomegranate juices were clearly shown.

Three freshly squeezed pomegranate juices, two commercial juices reconstituted from concentrates, and one commercial juice not from concentrates gave the same electrophoretic pattern. All the commercial juices claimed that they are 100% pomegranate and that they did not contain any additive. Pomegranate juices were derivatized with FITC and injected directly to optimized separation medium. L-forms of nine amino acid species were detected, namely, arginine, tryptopane, leucine, proline, asparagine, serine, alanine, glutamine, and aspartic acid. Moreover, D-proline was detected in all the juices; D-leucine was detected in one of the commercial juices. Dominant amino acids of all the freshly squeezed pomegranate juices were found as serine, proline, and alanine in gradually decreasing order.

Food adulteration is a worldwide problem in terms of food quality and food safety. Foods having high commercial value are targets to be adulterated. With food adulteration, not only consumers are being defrauded, but also economies of regions and countries are adversely affected due to unfair competition. Therefore, in terms of human health and economic points of view, detection of fraudulent foods is important. Finding a specific marker from chemical constituents of food products could be a way to detect the adulteration or authenticity of the food. Fruit juice adulteration occurs generally with diluting a more expensive product with a less expensive juice. Pomegranate juice has been subject of adulteration due to high product demand, high price, short harvest season and shortage of production in some regions. Pomegranates are generally adulterated with the addition of cheap and widely available juices, mostly grape and apple juices. Like these parameters, if the types and contents of some amino acids are significantly different in these fruit juices, amino acids might be candidates for adulteration markers.

For this purpose, apple juices from three different apple species, namely Starking, Golden, and Granny Smith types of apples and grape juices obtained from white, black and pink grapes were prepared. The juices of these fruits were prepared for analysis similarly to pomegranate juices and injected to the same separation electrolyte system.

Asparagine amount in apple juices was found significantly higher compared to pomegranate juices. Thus, asparagine might be proposed as an apple juice adulteration marker for pomegranate juices. Proline and arginine were found as the major amino acids in grape juices and the quantitative amounts of these amino acids in grapes and in pomegranate juices were compared. Arginine was found significantly higher in grape juices compared to pomegranate juices and this amino acid is therefore proposed a possible grape adulteration marker for pomegranate juices.

In the second part of this study, a CE-LIF method was optimized for water soluble Vitamin B2. Chemical name of Vitamin B2 is Riboflavin (RF). RF cannot be synthesized or stored in the body so it has to be taken from foods. RF is generally found in milk and milk products, meat, yeast and also dark-green vegetables.

The analysis of RF in food samples is difficult because of the complex matrix of food and very low content of RF in foodstuff. In that respect, LIF detection of riboflavin in food samples is favorable since RF molecule has native fluorescent, thereby very small amounts of RF in food samples can be detected with this sensitive detector. In the present study, in order to separate RF molecule from food matrix, a capillary electrophoretic method was optimized and RF molecule was determined with LIF detector combined with CE system. The analysis method was applied for the first time to identify the RF contents of tea samples.

Since RF is negatively charged in basic solutions, borate and phosphate buffers were examined in order to find suitable separation electrolyte. After decision of phosphate buffer; different pH values, between pH 5 and 12, and phosphate concentrations between 15 and 75 mM were tested. Considering shortest migration time and higher fluorescence intensity, 30 mM phosphate buffer at pH 9.9 was selected as the optimal separation electrolyte. The calibration curve of RF was linear between 0.01-5 μM concentration ranges. The calibration equation was calculated as y=0.9544x-0.0375 (R^2 = 0.999). The limit of detection (LOD) was calculated as 3 times of the average noise taken for three different baseline areas and found as 1.08 ng/mL.

The limit of quantification (LOQ) was given as ten times the average noise as 3.58 ng/mL. For the precision of the method, the riboflavin standard solution was injected 5 times in one day. For the day-to-day reproducibility, the same solution was injected five times in three different non-consecutive days. In the same day precision of the corrected peak areas (%RSD) was 2.48. Between days, precision value was 4.58.

With the validated CE-LIF analysis method, riboflavin (Vitamin B2) contents of 14 tea infusions including black, green, sage, and rosemary teas were revealed. RF contents of black tea, sage and rosemary teas were firstly reported with this study.

The extraction of riboflavin from tea leaves were tested with hot water, hot NaOH and hot HCl solutions. The best results were obtained with hot water. The infusion time for the best extraction efficiency was tested as between 5 and 15 min. The volume of extraction solvent was tested for 1 g tea leaves as between 30 and 100 mL. Finally the efficient extraction was achieved for 1g tea sample in 50 mL of boiling water. This solution was incubated on a water bath for 5 minutes. All tea infusions prepared was injected directly to capillary column. Riboflavin values of tea samples were found as between 0.34-10.36 μg/g. The found RF contents of all tea samples suggest that tea infusions are amongst important dietary sources of RF for prevention of diseases caused by Vitamin B2 deficiency. According to our konwledge, although there has been lots of studies about nutritional component of tea infusion, there is a lack of information about Riboflavin content of black tea, sage and rosemary infusions. Hence this study displays a novel, intrinsic method for food analysis.

1. GİRİŞ

Beslenmek, insan hayatında vazgeçilmez aktivitelerden biridir. Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için yiyecek ve içeceklerin de aynı kalitede olması gerekmektedir. Günümüzde marketlerde her türlü gıdanın çeşitli işlemlerle hazır hale getirilmiş olduğuna rastlanılmaktadır. Doğallıktan uzak, her tipte işlem görmüş besin maddeleri çağ ilerledikçe bilinçli tüketiciler tarafından problem olarak görülmektedir. Bu yüzden sağlıklı beslenme için tüketicilerin gıda içeriklerine karşı oldukça hassas olmaları gerekmektedir.

İnsan vücudunun yapı taşlarından olan amino asitler kaliteli beslenmenin basamaklarından birini oluşturmaktadır. Bilindiği üzere 20 çeşit doğal amino asit bulunup her biri insan sağlığı için önemli mekanizmalarda rol almaktadırlar. Amino asitler kendi aralarında en temel anlamda esansiyel (Eksojen) ve esansiyel olmayan (Endojen) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Bunlardan ilki vücuda beslenme yoluyla alınması gereken amino asitler iken diğer grup canlı metabolizması tarafından sentezlenen amino asitlerdir.

Amino asitler kiral özellik gösteren yani D- ve L- formu mevcut olan moleküllerdir. Her ne kadar amino asitlerin sadece L- formunun metabolik olaylarda rol aldığı düşünülse de son yıllarda yapılan çalışmalarda D- formundaki amino asitlerin de canlı metabolizmasında var olduğu ispatlanmıştır [1,2]. D-Amino asitlerin yeni ortaya çıkan spesifik biyolojik rolleri nedeniyle, artık günümüzde farklı gıda ürünlerinin amino asit profilleri çıkarılırken D- ve L- formlarının da belirlenmesi önem kazanmıştır.

Esansiyel (Eksojen) amino asitler gibi insan metabolizmasınca sentezlenmeyen ancak beslenme yoluyla takviye edilmesi gereken bir diğer başlıksa vitaminlerdir. Kendi aralarında suda çözünen ve yağda çözünenler olarak gruplandırılan vitaminler insan metabolizmasında pek çok eksikliği önleyerek kaliteli beslenmenin vazgeçilmez takviyeleri olmuşlardır.

B grubu vitaminleri suda çözünen vitamin gruplarındandır. Bu grubun bir alt üyesi olan B2 vitamini (Riboflavin, RF) birçok enzime koenzimlik görevi yapar. Günlük tavsiye edilen miktarın altından tüketilmesiyle ciddi dermatolojik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. B2 vitamini; gerek gıdalarda az miktarda bulunması gerekse gıdaların matriks etkisi sebebiyle analizi zor olan organik bir maddedir.

Kapiler Elektroforez (CE) yüksek bir elektrik alan etkisiyle irili ufaklı her türlü analitin yük/büyüklük oranlarının farkıyla analizinin gerçekleştirildiği bir ayırma tekniğidir. Sistemde ayrımın gerçekleştiği silika kolonlar dirence oldukça dayanıklı olup diğer ayırma tekniklerinde kullanılan kolonlardan farklı olarak ucuz ve her türlü analit için tekrar tekrar kullanılma özelliğine sahiptirler [3]. Uygun ayırma koşulları sağlanarak sisteme farklı dedektör tiplerinin kombine edilmesi, örnek sarfiyatının azlığı, ayırma hızı ve yüksek ayırma etkinliği yöntemin üstünlükleri arasında yer almaktadır.

Gerçekleştirilen bu doktora çalışmasının ilk basamağında kiral amino asitlerin ayrımı ve lazer indüklenmiş floresans detektörü (LIF) ile tespiti için yeni bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir.

Amino asit moleküllerinin 190 ve 210 nm dalga boylarında zayıf absorbsiyon yaptıkları bilinmektedir. Ancak bu spektrum aralığında çoğu çözücünün ve çeşitli kimyasalların da absorbansı mevcuttur. Dolayısıyla amino asitlerin CE yöntemiyle ayrılmalarından sonra UV detektörle teşhisinde duyarlık çok düşük ve matriks etkisi çok yüksek olduğundan gerçek örneklerin analizine uygulanabilirliği zordur. Buna karşılık son yıllarda CE cihazları ile kombine edilen lazer indüklenmiş floresans detektörlerle birçok maddenin tayin sınırları önemli miktarda düşürülmüştür. Bu çalışmada kiral amino asitlerin lazer indüklenmiş floresans detektörle tayinleri hedeflenmiştir. Amino asit moleküllerinin floresans özelliği olmadığından analiz öncesinde bu moleküllerin uygun bir reaktifle türevlendirilmesi gerekmektedir [4]. Bu doktora çalışmasında da 488 nm dalga boyunda uyarılıp 520 nm dalga boyunda emisyon yaptığı bilinen FITC floresans ajanı olarak kullanılmıştır. Kiral amino asit moleküllerinin bu ajan ile en etkili türevlendirme şartları tespit edilerek, türevlenmiş kiral moleküllerin kapiler elektroforez yöntemi ile ayrılması için yeni bir CE analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Kiral moleküllerin kromatografik ayırımında siklodekstirinler, bazı makrosiklik bileşikler ve taç eterler kiral seçici moleküller olarak kullanılmaktadır [5,6]. HPLC ile kiral molekül ayırımında kiral seçici molekül içeren özel kolonlar gerekmektedir. Halbuki CE de kiral seçici molekülün ayırma elektrolitine ilavesi, kiral ayırımında hem farklı kiral seçicilerin ve onların farklı konsantrasyonlarının kolaylıkla denenmesi kolaylığı ve hem de pahalı kiral seçici kolonlara göre ekonomik avantaj sağlamaktadır. Siklodekstrin türleri enantiomer ayrımları için baskın olarak kullanılan kiral seçici moleküllerdir [7,8].

Bu çalışmada da farklı tipte ve konsantrasyonlarda siklodekstrin türleri denenmiş ve β-siklodekstrin varlığında en etkin ayrım gerçekleştirilmiştir. Ayırma ortamına ilave edilen farklı organik çözücülerin, farklı suda çözünen polimerlerin ve farklı yüzey aktif maddelerin ayırma ve floresans şiddeti üzerine etkileri araştırılmış ve ayırma ortamına ilave edilen sodyum dodesil benzen sülfonatın (SDBS) amino asitlerin duyarlığını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilerek, ayırma yöntemi SDBS miselleri varlığında geliştirilmiştir. Bu çalışmada SDBS yüzey aktif maddesi ilk kez kapiler elektroforez yönteminde amino asit ayırımında kullanılmıştır. Yöntem nar sularının amino asit profillerinin çıkarılmasına uygulanmıştır. Nar suyu son yıllarda pek çok bilimsel çalışmaya konu olan tıbbi yararları nedeniyle popüler olan bir meyve suyudur. Şimdiye kadar pek çok meyve suyunun amino asit profili çıkarılmasına rağmen nar suyu için böyle bir çalışma mevcut değildir. Geliştirilen analiz yöntemi ile ilk kez nar suyunun kiral amino asit profili çıkarılmıştır. Nar suyunun diğer meyve suları ile hilelendirilmesi amino asit profilleri üzerinden incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında ise bu defa doğal floresans özellik taşıdığı tespit edilen B2 vitamininin gıda içeriklerindeki düşük miktarlarını tespit edebilecek bir analiz yöntemi oluşturulmuştur. Gerek tampon derişimi gerekse tampon pH'ı gibi parametreler irdelenerek uygun ayrım koşulları tespit edilmiştir. Riboflavin analizi 4 dakikadan daha az sürede hiçbir türevlendirme metoduna gerek duyulmadan gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analiz yöntemi 4 farklı tipte toplam 14 adet bitki çayının riboflavin içeriğinin tespitine başarı ile uygulanmıştır.

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez, uygulanan yüksek voltaj altında yüklü türlerin farklı göç hızlarında hareket etmeleri demektir. Bu ayırma yöntemi ilk olarak 1937 yılında İsveçli kimyager Arne Tiselius tarafından protein karışımlarını ayırmak üzere kullanılmıştır. Tiseelius bu çalışması ile Nobel ödülü almıştır.

Kapiler Elektroforez (CE), ayrımın silikadan yapılmış kapiler kolonlarda gerçekleştiği, cihaz dizaynı olarak gelişmiş sıvı ve gaz kromatografi sistemlerine dayanan analitik ayırma tekniğidir. Kapiler elektroforez yöntemleri farklı özellikteki birçok kimyasal türe uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerde ayırma ince bir kolon içindeki sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir bant halinde enjeksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Sistemdeki tampon çözeltiye her iki uçta mevcut bulunan platin elektrotlar sayesinde yüksek voltaj uygulanır. Uygulanan bu güç, numunedeki yüklü türlerin ilgi duydukları elektroda doğru ilerlemesini sağlar. Numunedeki taneciklerin sistem içindeki ilerleme bir başka ifadeyle göç hızları yük/büyüklük oranlarındaki farka dayanmaktadır [9].

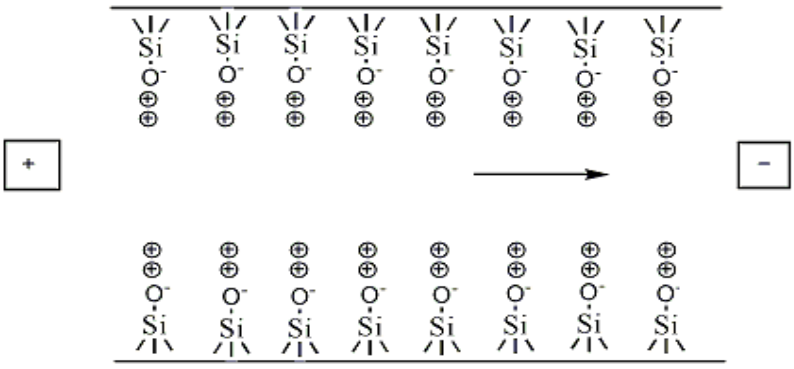
Kapiler Elektroforez tekniklerinin çok çeşitli analitlere uygulabilir olması, analizlerin diğer kromatografik sistemlerin ayırma kolonlarından daha ucuz olan; iç çapı 25-100 µm arasında değişen ve tekrar tekrar kullanıma müsait silika kolonlarda gerçekleştirilmesi, örnek hacminin nanolitre mertebesinde olması, nitel ve nicel analize uygunluğu, yüksek tekrarlanırlık ve yüksek ayrımcılık özelliğine sahip olması, tek bir cihazın farklı dedektör sistemleriyle kombine edilebilmesi son olarak analiz süresinin çok kısa olması bu ayırma yönteminin günümüzde yaygın olarak kullanılmasının başlıca avantajlarıdır.

2.1 Çalışma Prensibi

Tampon çözelti ile doldurulmuş silika kapiler kolon yüksek bir potansiyele maruz kaldığında kapiler içinde elektroosmotik akış oluşur. Elektroosmatik akış kapiler elektroforezdeki en temel kavramdır. Elektroosmatik akışın sebebi, silika/çözelti ara yüzeyinde meydana gelen elektrik çift tabakasıdır.

Eritilmiş silikadan elde edilen ayırma kolonu silanol (SiOH) grupları içerir. pH 2'nin üzerindeki bir çözeltiyle temasta olan silika kapilerin iç yüzeyi, yüzeydeki silanol gruplarının H^+ iyonlarının disosiye olmasıyla SiO^- şeklinde iyonlaşması nedeniyle negatif yüklenir. Kapiler kolonun içindeki elektrolit çözeltisinin (+) yüklü iyonları ile SiO^- grupları arasında ki elektrostatik etkileşim sonucu kapilerin iç yüzeyinde (+) yük yoğunluğu oluşmuş olur. Böylece kapiler iç yüzeyinde bir elektrik çift tabaka ve bir potansiyel farkı oluşur.

Voltaj uygulaması ile (+) yük yoğunluğu katoda doğru yönlenir. İyonlar sulu çözeltide hidratize halde olduklarından çözücüyüde beraberinde sürükleyerek kapiler kolon içinde anottan katoda doğru yığın hareketi halinde elektroosmotik akış oluşur (Şekil 2.1).

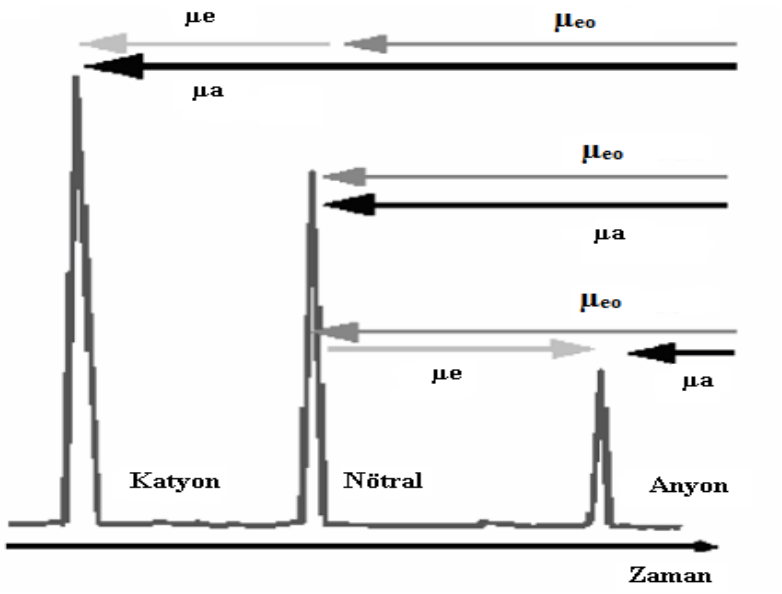


Şekil 2.1 : Kapiler kolonunun yüklenmesi [10].

Elektroosmotik akışın mobilitesi, genellikle iyonların tek başına elektroforetik mobilitelerinden (μ_e) daha büyüktür. Kapiler içinde analitler kendi yüklerine göre göç etseler bile, elektroosmotik akış hızı genelde bütün pozitif, nötral ve hatta negatif tanecikleri katoda doğru sürüklemeye yetecek kadar etkindir. Katod yönüne yerleştirilen detektörle, silika kolon içinde ayrılan türler aynı anda tayin edilirler.

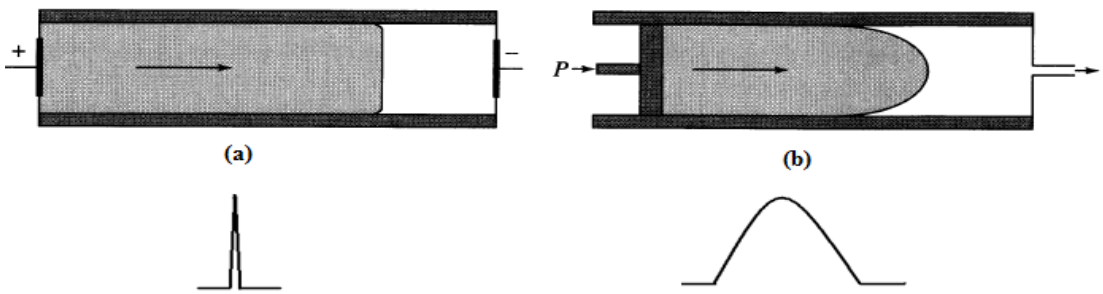
Türlerin göç hızına etki eden en önemli faktör yük/büyüklük oranlarıdır. Sistem içinde var olan pozitif, nötral ve negatif türlerin kendi elektroforetik hızları ile elektroosmotik akış hızının vektörel toplamı türlerin net hızını verecektir. Elektroosmotik akışın katoda doğru olması sebebiyle tipik bir elektroforetik ayırmada kolondan katoda ilgi duyan (+) yüklerin hızla ayrılmaları, ardından hızları elektroosmtik akış hızına eşit olan nötral türlerin sistemi terk etmeleri beklenir. Anyonlar da ise yani (-) yüklü tanecikler, anoda doğru gitmek isteyeceklerdir. Ancak kolon içinde var olan elektroosmotik akış hızı öyle güçlüdür ki; zıt yöne göç etmek

isteyen bu türleri de beraberinde sürükleyerek katoda ulaştırır. Dolayısıyla Şekil 2.2'de de verildiği üzere sistemi en geç terk eden türler anyonlar olacaktır [9]. Bu şekilde gösterilen μ_e, iyonun kendi elektroforetik mobiletisini; μ_{eo} elektroosmotik mobiliteyi; μ_a, ise görünen net mobiliteyi simgelemektedir.



Şekil 2.2 : Kolon içindeki türlerin sistemi terk etme zamanları [11].

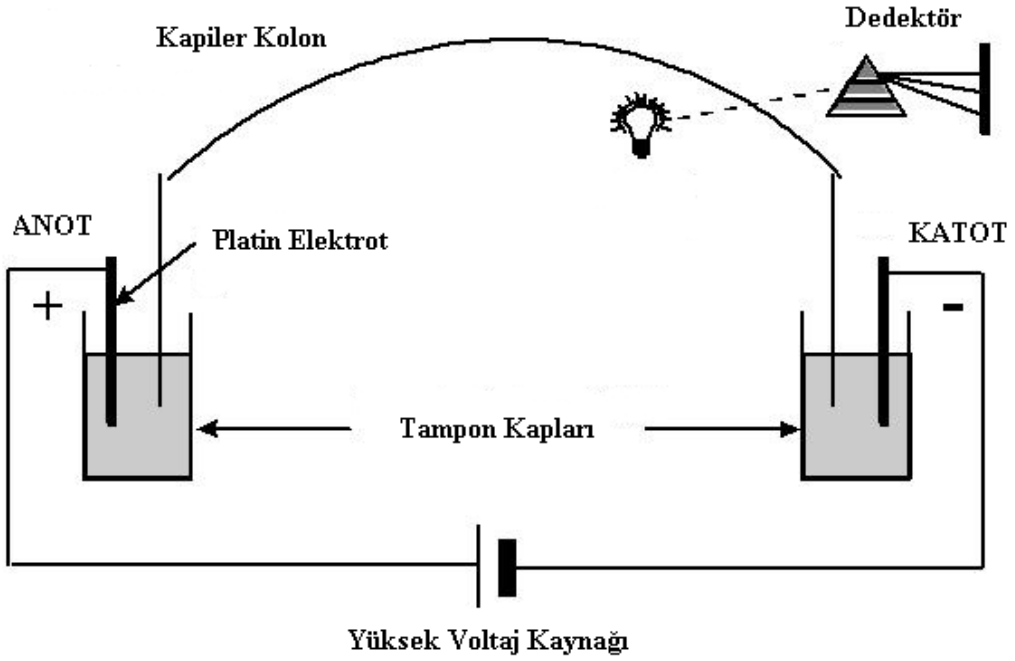
Kapiler Elektroforez'de itici güç olan elektroosmotik akış ile kolon içinde parabolik olmayan düz kesitli çözelti akışına yol açar. Halbuki, sıvı kromatografisinde itici güç pompa ile sağlanan parabolik özellikteki hidrodinamik akıştır. Parabolik akış varlığında geniş yayvan pikler elde edilirken, kapiler elektroforezde dik ve simetrik pikler elde edilir (Şekil 2.3). Bu da kapiler elektroforezin diğer ayırma teknikerinden üstün olan özelliklerinden biridir [12].



Şekil 2.3 : a) Elektroosmotik akış **b)** Parabolik akış ve sonuçları [11]**.**

2.2 Kapiler Elektroforez Cihazı ve Parçaları

Şekil 2.4 ‘de Kapiler Elektroforez cihazının şematik gösterimi verilmiştir. Şemada görüldüğü üzere sistemde iki tampon kabı ve bu kaplara daldırılmış iki platin elektrot ve tampon kapları arasında kapiler kolon bulunmaktadır.

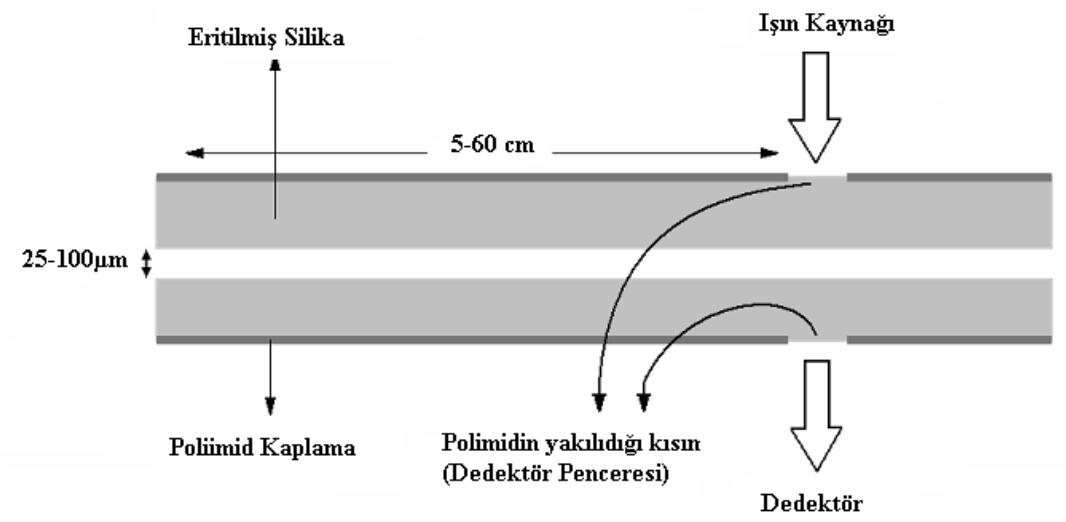


Şekil 2.4 : Kapiler Elektroforez cihazı [13].

Yüksek voltaj kaynağı, detektör ve detektör verilerinin değerlendirildiği veri analiz yazılımına sahip bilgisayar sistemin diğer bileşenlerdir. Numune bir uçtan verilirken ayrılan maddeler diğer uçtan tespit edilir.

2.2.1 Kapiler ayırma kolonları

Eritilmiş silika günümüzde en sık kullanılan kapiler materyalidir. Kapiler kolonun dayanaklığını arttırmak için dış kısım poliimid ile kaplıdır. Piklerin dedeksiyonu için polimid kaplamanın detektör içinden geçen kısmı ışık yolunu kapatmamasını sağlamak üzere yakılarak uzaklaştırılır. Böylelikle detektör penceresi açılmış olur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : Eritilmiş silika kapiler kolonun iç kesiti [11].

Eritilmiş silika kapilerin iç çapı genellikle 25-100 µm arasında değişirken, dış çapı 350-400 µm kalınlığındadır. En çok kullanılan kolonlor iç çapı genellikle 50 veya 75 µm'lik kolonlardır. Kolonun toplam uzunluğu ise ayrılacak analit sayısına ve kombine edilmiş dedektörün özelliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yaygın olarak 20-100 cm uzunluğundaki kolonlar kullanılmaktadır [12].

Kapiler kolonlarının ömrünün uzun olması ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için iyi şartlandırılması gerekmektedir. Cihaza ilk defa takılan bir kolon 30 dakika 1 M NaOH, ardından su ve çalışma tamponu ile yıkanarak silanol guruplarının aktive edilmesi ile sağlanır. Benzer şekilde her analiz günü öncesi 10 dakika gibi bir süre ile kapiler kolon 0,1 M NaOH ile yıkanarak şartlandırılır. Analiz aralarında genellikle kapilerin tampon çözelti ile yıkanması yeterlidir. Güçlü matriks etkisi olan örneklerde özel ara yıkama stratejileri geliştirilebilir. Çalışma bitiminde kolon uçları su içinde bekletmek suretiyle kurumaya karşı korunmalıdır. Şayet uzun süre aynı kolon kullanılmayacaksa kolon içerisinde mikroorganizma üremesini engellemek için kolondan hava geçirilir. Böylelikle kolon kurutulmuş olarak muhafaza edilir.

2.2.2 Güç kaynağı

Elektroforez sisteminin en önemli parçalarından birisi olan yüksek voltaj sağlayan güç kaynaklarıdır. Kusursuz bir ayrım için güç kaynağının sabit değer sağlaması yani kararlılığı gerekir. Sistemlerde kullanılan güç kaynakları maksimum 30 kV voltaj; yaklaşık 300 µA akım değerine ulaşabilmektedir.

2.2.3 Dedektör

Daha önce belirtildiği gibi kapiler Elektrofrez ayırma yönetminin üstünlüklerinden biri de tek bir cihaza farklı tipte dedektör sistemleri kombine olabilmesidir. UV/GB absorbsiyon, floresans, lazer indüklenmiş floresans, amperometri, iletkenlik ve kütle spektrometrisi yaygın kullanılan dedektör türleridir. Çizelge 2.1'de Kapiler Elektroforez'de kullanılan dedektör türleri ve limitleri verilmiştir [12].

Çizelge 2.1 : Kapiler Elektroforez'de kullanılan dedeksiyon türleri ve limitleri [12].

Teknik	Dedeksiyon Limiti (M)
UV absorpsiyon dedeksiyonu	10^{-5} - 10^{-8}
Floresans dedeksiyonu	10^{-7} - 10^{-9}
LIF dedeksiyonu	10^{-14} -10^{-16}
Elektrokimyasal dedeksiyonu	10^{-8} - 10^{-6}
İletkenlik	10^{-7} - 10^{-8}
Kütle Spektrometre dedeksiyonu	10^{-8} - 10^{-9}

2.2.3.1 Lazer indüklenmiş floresans (LIF) dedektörleri

Son yıllarda Kapiler Elektroforez cihazlarında oldukça hassas bir dedeksiyon metodu olan LIF dedektör sistemleri kullanılmaktadır. Yoğun ışın kaynağından faydalanarak gözlenebilme sınırlarını düşürmek amacıyla küçük miktardaki örneği uyarmak için lazerli cihazlar tercih edilmektedir [9]. 1999 yılında yapılan bir çalışmada LIF dedektörlerinin klasik UV-GB dedektörlerinden 1000 kat daha hassas olduğu, dedeksiyon limitlerinin 10^{-14} - 10^{-16} M seviyesine ulaştığı belirtilmiştir [13,14].

Bu tip dedektörlerde Argon iyon (488/515 nm), He-Cd (325/442 nm) ve He-Ne (543/632 nm) gibi lazer kaynakları yaygın kullanılmaktadır. Dedektörün çalışma prensibi spektroskopik yöntemlere benzer. Lazer ışını gibi stabil ve güçlü bir uyarıcı sayesinde türler uyarılır. Bilindiği üzere elektronlar bu uyarılmış seviyede çok uzun süre kalamazlar tekrar temel hale dönerken soğurduklarından daha büyük bir dalga boyunda ışıma yaparlar. Bu ışıma floresans şiddeti olarak ilgili dedektör tarafından tespit edilerek sinyale dönüştürülür.

Analiz edilecek türün florofor grubu olmaması halinde çalışılan lazer kaynağı türüne göre türevlendirme (etiketleme) işlemleri uygulanabilir. Bu sayede sınırlı sayıdaki floresans veren analit sayısı sıkıntısı aşılarak yüksek hassasiyetteki yöntem

uygulanabilirliği artar. Floresein izotiyosiyanat (FITC), fenil isotiyosiyanat (PITC), naftalin-2,3-dikarboksialdehit (NDA), 5-karboksiflurosein süksimidil ester(CFSE), 9-florenmetil kloroformat (FMOC) literatürde karşılaşılan etiketleme ajanlarından birkaçıdır. FITC molekülünün uyarılma ve emisyon dalga boyları 488/520 nm olup Argon iyon lazer kaynağı ile kullanımı uygundur. Bu ajan genellikle primer ve sekonder amin gruplarının uygun koşullarda floresans özellik kazandırdığı bilinmektedir [15-17].

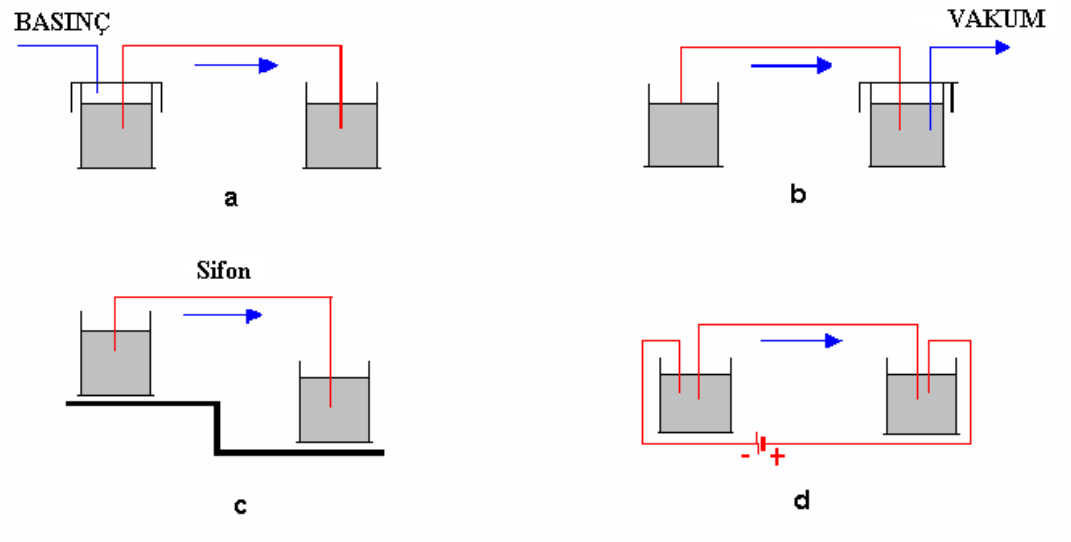
2.2.4 Numune verme

Uygun çözücüde çözünmüş, içinde hiçbir partikül içermeyen numune kapiler kolon içine iki farklı metotla enjekte edilir. Bu yöntemlerden ilki diğerine nazaran daha çok tercih edilen Hidrodinamik Enjeksiyon yöntemi, diğeri Elektrokinetik Enjeksiyon yöntemidir.

Hidrodinamik enjeksiyon üç farklı yolla gerçekleştirilebilir. Bunlardan birincisi kapilerin giriş tarafına yerleştirilen örnek kabına basınç uygulanmasıdır. Çoğunlukla uygulanacak basınç 50 mbar olarak tercih edilirken 4-6-8 sn gibi yönteme bağlı olarak değişik sürelerde numune kolona yüklenir. Ardından numune kabı kolondan çekilip tampon kabı tekrar eski yerine getirip yüksek voltaj uygulanmak suretiyle analiz gerçekleştirilir. Hidrodinamik enjeksiyonun bir diğer yöntemi numune kabı kolonun giriş kısmına yerleşmişken kolonun çıkış kısmındaki tampon kabına vakum uygulama suretiyle numune sisteme yollanır. Hidrodinamik enjeksiyonda son teknik ise sifon etkisi yaratmaktır. Numune kabı yine kolonun sisteme giriş kısmına ancak bu kez kolonun uç kısmında yer alan çıkış tamponundan daha yükseğe yerleştirilir. Yer çekimi etkisiyle numune kolaylıkla kapiler kolon içine yüklenmiş olur. Her yöntem gibi bu yöntemde de çalışma tamponları tekrar kolon uçlarına yerleştirildikten sonra voltaj uygulamasıyla analiz yapılır.

Kolon içine numune enjekte etmekte kullanılan bir diğer yöntem ise Elektrokinetik Enjeksiyon'dur. Bu yöntemde örnek kabı ile çıkışta yer alan tampon kabı arasına çalışma voltajından daha düşük değerde çok kısa süreliğine voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alan etkisiyle numune içindeki iyonlar kapiler kolon içine doğru yol alırlar. Hidrodinamik enjeksiyon tekniklerinde olduğu gibi numune kabı tekrar eski yerine getirilip çalışma tamponu kolonun ucuna yerleştirilerek yüksek voltaj altında analiz gerçekleştirilir. Tekrarlanırlık problemi sebebiyle Elektrokinetik enjeksiyon çok

tercih edilen bir numune verme yöntemi değildir [12]. Şekil 2.6'da sisteme numune verme teknikleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6 : Enjeksiyon sistemleri: **a,b,c:** Hidrodinamik
d: Elektrokinetik Enjeksiyon [11].

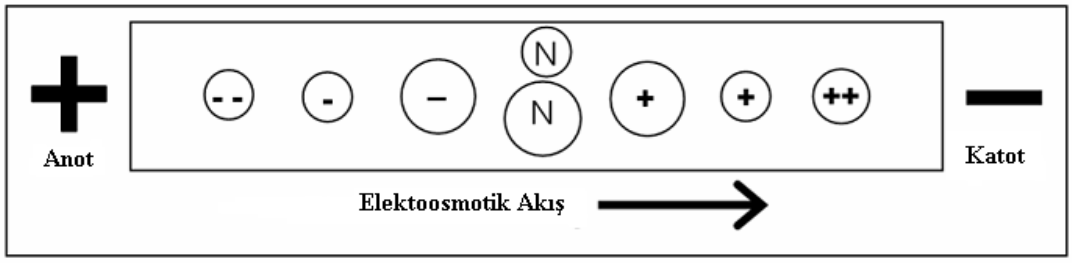
2.3 Kapiler Elektroforez Yöntemleri

Ayrılmak istenen analit türüne göre farklı tipte Kapiler Elektroforez yöntemleri geliştirilmiştir. Kapiler Zon Elektroforez (CZE), Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC), Kapiler Jel Elektroforez (CGE), Kapiler Elektrokromatografi (CEC) bu yöntemlerden birkaçıdır. Aşağıda bu çalışmada kullanılan CZE ve MEKC yöntemleri açıklanmıştır.

2.3.1 Kapiler Zon elektroforez (CZE)

CZE yöntemi ayırmanın kapiler içindeki tampon çözelti ortamında gerçekleştirildiği kapiler elektroforezin en basit yöntemidir. Şayet ayırmak istenilen analit yüklü taneciklerden oluşuyorsa bu yöntem tercih edilir. Yöntemin ayırma prensibi numunede bulunan analitlerin yük/büyüklük oranlarının farkına dayanır. Bölüm 2.1 de açıklanan ayırma prensibi CZE'e aittir. Bu yöntemde anot yönünden enjekte edilen her analit yüküne bakılmaksızın elektroosmotik akış ile negatif elektroda yani detektör yönüne hareket edecektir. Bu esnada yüklü türler yük/büyüklük oranlarındaki farklılıklara göre detektöre farklı zamanlarda ulaşacaktır. Nötral türlerin bu yöntemle ayrılması mümkün değildir. Bu türlerin elektroforetik

mobiliteleri olmadığı için sistemi terk etme hızları elektroosmotik akış hızı ile eş değerdedir. Dolayısıyla tüm nötral türler bir arada pozitif yüklü iyonlardan sonra negatif iyonlardan önce sistemi terk edeceklerdir (Şekil 2.7) [12].



Şekil 2.7 : Kapiler Zon Elektroforez'de türlerin ayrımı [11].

2.3.2 Misel Elektrokinetik Kromatografi

MEKC, 1984 yılında Terabe ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş bir kapiler elektroforez yöntemdir. Her ne kadar CZE yönteminde ayrılamayan nötral türlerin ayrımın gerçekleştirmek üzere geliştirilmiş bir yöntem olsa da günümüzde yüklü taneciklerin ayrımını güçlendirmede de kullanılan bir yöntem olmuştur [12].

Yöntemde esas olan çalışma elektrolitine kritik misel konsantrasyonu üzerinde yüzey aktif madde ilavesi yapmaktır. Bilindiği üzere yüzey aktif maddeler kritik misel konsantrasyonlarının üzerinde misel adı verilen yığın molekülleri oluştururlar. Hidrofilik bir çözücü içinde, her misel yapısında hidrofilik özellikte bir uç yapı birde merkezdeki çekirdeği oluşturan hidrofobik bir yapı mevcuttur. Nötral maddelerin de farklı hidrofilik ve hidrofobik özelliği olması sebebiyle; bu analitlerin tampon içindeki misel yapısında geçirecekleri süre farklı olacaktır. Şayet hidrofilik grubunun oranı ağır basarsa bu tür daha çok çözücü fazda vakit harcarken, hidrofobik grubu ağır basan nötral bir tür daha çok misel içinde vakit geçirecektir. Bu farklılık nötral moleküllerin mobilitelerini dolayısıyla sistemi tek tek terk etme sürelerini etkileyecektir. Bir başka ifadeyle MEKC'de nötral türlerin ayrılmasını sağlayan yapılarındaki hidrofilik ve hidrofobik grupların miktarına bağlı olarak, nötral molekülün misel ve ayırma elektroliti arasında farklı paylaşımıdır [12].

3. TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLEN ANALİTLER

3.1 Amino Asitler Hakkında Genel Bilgi

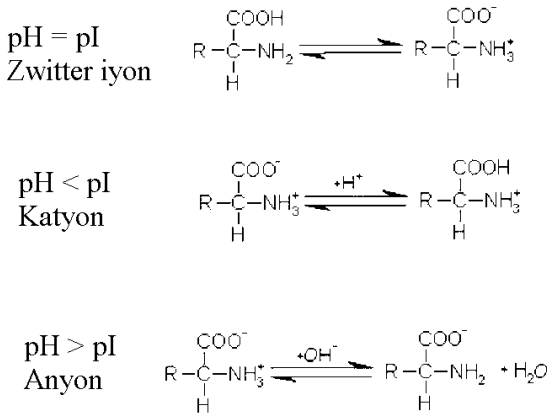
Molekülünde hem amino grubu (-NH_2) ve hem de karboksil grubu (-COOH) bulunan bileşiklere "Amino asitler" denir. Karboksilik asit grubuna göre -NH_2 grubunun bağlandığı yer α, β, γ… şeklinde olabilir. Amino asitlerde bu iki fonksiyonel grup şayet aynı karbon atomuna bağlı ise bu amino asitler standart α-amino asidi; bağlı oldukları bu karbon atomu da alfa karbon atomu olarak adlandırılır (α-C). Doğada 300 kadar amino asit bulunmasına karşın bunlardan ancak 20 tanesi standart amino asitler olarak bilinir. İnsan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan proteinlerin yapısını oluşturan bu 20 amino asit α-amino asitlerdir. Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler [18].

Çizelge 3.1 : Standart amino asitler ve kısaltmaları [19].

Amino asidin adı	Üç harfli simgesi	Tek hafli simgesi	Amino asidin adı	Üç harfli simgesi	Tek hafli simgesi
Glisin	Gly	G	Treonin	Thr	T
Alanin	Ala	A	Sistein	Cys	C
Valin	Val	V	Metiyonin	Met	M
Lösin	Leu	L	Asparajin	Asn	N
Izolösin	Ile	I	Glutamin	Gln	Q
Prolin	Pro	P	Aspartik Asit	Asp	D
Fenilalanin	Phe	F	Glutamik Asit	Glu	E
Tirozin	Tyr	Y	Lizin	Lys	K
Triptofan	Trp	W	Arjinin	Arg	R
Serin	Ser	S	Histidin	His	H

Molekül yapılarında bulunan NH_2 grubu baz ve COOH grubu asit özelliği gösterir. Bunun sonucu olarak, amino asitler amfoter bir yapıya sahiptirler; yani hem asidik hem de bazik özellikler taşırlar.Amino asitler nötral çözeltilerinde karboksil protonunun azot atomuna göçmesiyle oluşan iyonlaşmış molekül (dipolar iyonlar) halinde yani zwitter iyon şeklinde bulunmaktadırlar. Bir amino asidin sulu çözeltisi ne kadar asidik ise, amino asidin o kadar büyük bir kısmında amin grubunun proton bağlaması sonucu katyon oluşur ve elektrolizde katoda doğru göç eder. Çözelti ne

kadar bazik ise, karboksil grubunun protonu ile nötralleşme reaksiyonu vererek, karboksil grubunun negatif yüklenmesi sonucu anyon oluşur ve elektrolizde anoda doğru göç eder. İki hal arasında kesin belirlenmiş bir pH değeri bulunur ki, orada amino asit molekülleri elektrikçe nötral olup elektrik alan altında net olarak göç etmezler. Net bir göçün görülmediği bu pH değerine izoelektrik nokta adı verilir ve pI ile gösterilir. Bir amino asit, izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında anyon şeklinde; izoelektrik nokta değerinden düşük pH ortamında katyon şeklinde bulunur (Şekil 3.1) [18].



Şekil 3.1 : Ortamın pH'ına bağlı olarak amino asit moleküllerinin yüklenmesi.

Bir amino asidin pI değeri α-karboksil grubuna ait pK_{aC} değeri, α-amino grubuna ait pK_{aN} ve R yan grubuna ait pK_{aR} değerlerinden yararlanarak bulunur. Standart amino asitlere ait bu değerler Çizelge 5.2'de verilmiştir.

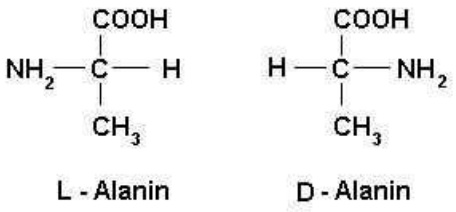
Çizelge 3.2 : Standart amino asitlerin pK_a ve pI değerleri [19].

Amino asit	**pK_{aC}**	**pK_{aN}**	**pK_{aR}**	**pI**
Alanin	4,4	9,9		6,15
Lösin	2,3	9,7		6
Prolin	2	10,6		6,3
Serin	2,2	9,2		5,7
Asparagin	2,1	8,7		5,4
Fenilalanin	2,2	9,3		5,75
Lisin	2,2	9,1	10,5	9,8
Arginin	1,8	9,0	12,5	10,75
Aspartik Asit	2	9,9	3,9	2,95
Glutamik Asit	2,1	9,5	4,1	3,1

3.1.1 Amino asitlerde konfigürasyon ve optikçe aktiflik

Glisinden (Gly, G) başka bütün standart amino asitlerde α-karbon atomu asimetriktir; α-karbon atomuna bir amino grubu ($-NH_2$), bir karboksil grubu (−COOH), bir R grubu ve bir H atomu olmak üzere dört farklı grup bağlanmıştır; standart amino asitlerin α-karbon atomu, asimetrik merkez olarak tanımlanır. Asimetrik α-karbon atomu içeren standart amino asitler optikçe aktif iki stereoizomere veya enantiyomere sahiptirler [18].

Amino asitlerin stereoizomerlerinin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi, asimetrik olan α-karbon atomuna ekli dört yapının mutlak konfigürasyonuna dayanır. Doğal amino asitlerin yapıları üzerindeki çalışmalarda bir trioz olan L-Gliseraldehit referans alınmıştır. Amino asidin amino grubu ($-NH_2$) ile Gliseraldehidin hidroksil grubu (OH) aynı tarafta ise, amino asit ile Gliseraldehit aynı seridendirler [20]. Karboksil grubu yukarıda, alkil grubu aşağıda olmak üzere yazılan formülde amino grubu sol tarafta ise L konfigürasyonuna, sağ tarafta ise D konfigürasyonuna sahiptir. Şekil 3.2'de Alanin için bu durumun görseli yer almaktadır.



Şekil 3.2 : Alanin amino asidinin L- ve D- konfigürasyonları.

Son yıllara kadar, canlı organizmaların yapısında yalnızca L konfigürasyonundaki amino asitler bulunmuş olup çok ender olarak bazı hücrelerde D konfigürasyonuna sahip amino asitlere de rastlanılmıştır. D- konfigürasyonlu amino asitlere genelde bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptit yapılarında ve de bazı polipeptit yapılı antibiyotiklerde rastlanılmıştır. Hücreler özellikle amino asitlerin L- izomerlerini sentezleyebilir, enzimlerin aktif bölgeleri asimetriktir ve katalizledikleri tepkimelerin stereo özgüllüğüne neden olur [18, 21]. Ancak analitik tekniklerin gelişmesiyle son yıllarda pek çok bitki ve meyvelerde hatta insan vücudunda D- amino asitlerin varlığı tespit edilmiştir [22-24].

Kiral moleküller farklı seçicilikler gösterebilirler. Limonen olarak adlandırılan bir bileşiğin bir enantiyomerik şekli portakalların kokusundan sorumlu iken bir diğeri limonların kokusundan sorumludur. Benzer şekilde kiral moleküller farmakolojik açıdan da önem taşır. 1963'ten önce uzun yıllar, Talidomid hamile kadınlarda sabah bulantılarını yatıştırmak için kullanılmıştır. Bu ilacın kullanımını takiben pek çok çocukta Talidomidin korkunç doğum kusurlarına neden olduğu saptanmıştır. Daha sonraları Talidomidin enantiyomerlerinden (D- formu) sabah bulantılarını tedavi etkisine sahipken ilaçta eşit miktarda var olan diğer enantiyomerin doğum kusurlarının nedeni olabileceğini belirten kanıtlar ortaya çıkmaya başlamıştır [25].

3.1.2 Amino asitlerin sudaki çözünürlüğü

Sistein ve Tirosin hariç hemen hemen tüm amino asitlerin sudaki çözünürlükleri oldukça fazladır. Amino asitlerin polar karakterleri sebebiyle organik çözücülerde çözünürlükleri oldukça azdır [26].

3.1.3 Amino asitlerin ışık absorpsiyonu

Birçok amino asidin UV bölgesinde tanıtıcı bir absorpsiyonu yoktur. Sadece 208 nm'de Triptofan oldukça büyük, Tirozin ise orta şiddette bir absorpsiyon verir. Fenilalanin'in ise 260 nm'de zayıf bir absorbsiyonu olduğu bilinmektedir [19].

3.1.4 Amino asitlerin sınıflandırılması

Amino asitler hem yan gruplarını oluşturan R zincirinin özelliklerine göre hem de biyolojik rollerine göre sınıflandırılırlar.

3.1.4.1 Yan grup R'nin özelliklerine göre sınflandırma

Amino asitler R gruplarının özelliklerine göre, Alifatik ve Aromatik Amino Asitler olmak üzere iki farklı gruba ayrılırlar. Glisin, Alanin, Valin, Prolin alifatik grupta yer alırken; Fenilalanin, Triptofan ve Tirozin aromatik grupta yer alan amino asitlerdir.

3.1.4.2 Biyolojik özelliklerine göre sınıflandırma

Amino asitler, insan vücudunda sentez edilip edilmemesine göre ikiye ayrılır. 1. Esansiyel (Eksojen) amino asitler: Vücutta yapılamadıklarından dışarıdan hazır alınması gerekir. Bir başka ifadeyle günlük besin zincirinde bu tip amino asitleri içeren gıda maddeleri yer almalıdır. Bu amino asitler; Triptofan, Treonin, Fenil

Alanin, Metionin, Lizin, Lösin, İzolösin ve Valindir. Çocuklarda, Histidin de sentez edilmediğinden bu listeye dahil olur. Ayrıca biyolojik işlevleri ilerleyen bölümlerde detaylı olarak aktarılmıştır.

2. Esansiyel olmayan (Endojen) amino asitler: Vücutta temel organik maddelerden yapılabilen amino asitlerdir. İnsanoğlu protein ihtiyacını hayvani ve nebati (bitkisel) gıdalardan temin eder. Bu amino asitler; Glisin, Alanin, Serin, Prolin, Arjinin, Asparajin, Aspartik asit ve Glutamik asittir. Farklı besin kaynaklarının hem amino asit miktarı hem de bu proteinin içindeki esansiyel amino asit miktarı farklıdır [27].

3.1.5 Amino asitlerin biyolojik işlevleri

Her bir amino asit spesifik bir fonksiyona sahip olup çeşitli hastalık semptomlarının gelişmeden önlenmesinde çok önemli ihtiyaçtırlar. Kısaca amino asitlerin biyolojik işlevleri aşağıda anlatılmıştır.

L-Alanin : L-Alanin canlı vücudunda karbohidrat metabolizmasında rol alan amino asittir.

L-Arjinin : Vücutta kas oluşması ve yağların yakımında rol alır. Eksikliğinde karaciğer rahatsızlıkları meydana gelir.

L-Asparajin : L-Asparajin, merkezi sinir sisteminin dengesinin korunması için gereklidir.

L-Aspartik Asit : Yorgunluğa iyi gelir. Kronik yorgunluk Aspartik asit seviyesinin düşüklüğüne bağlı olarak gelişen hücresel enerji eksikliğinin bir sonucudur. Bu amino asit aynı zamanda aşırı amonyağı vücuttan atarak karaciğeri korur. L-Aspartik asit diğer amino asitlerle birleşerek kandaki toksinleri absorbe ederek kanı temizleyen bir molekül oluştururlar. Aynı zamanda RNA/DNA üretimi için gerekli olan hücresel faaliyetlere yardımcı olur.

L-Glutamik Asit : Bu amino asit kişilik bozukluklarının düzeltilmesine yardımcı olur. Glikoz yanında glutamik asit beyin yakıtı olarak kullanılabilen tek maddedir. Beyin glutamik asidi beyin hücre aktivitelerini düzenleyen bir maddeye dönüştürür.

L-Glisin : Merkezi sinir sistemi fonksiyonları ve prostat sağlığı için gereklidir. Bu amino asit bipolar depresyon tedavisinde kullanılır. Bu amino asidin çok fazla olması durumunda glukozu metabolik zincirden çıkararak yorgunluğa sebep olur. Uygun miktarlarda olması durumunda ise daha fazla enerji üretir.

L-Lösin : L-Lösin yükselmiş olan kan şeker seviyesini düşürür. Daima isolösin ve valin ile birlikte dengeli bir şekilde alınmalıdır. Bu önemli amino asit kemiklerin, cilt ve kas dokusunun iyileşmesinde rol oynar.

L-Lisin : L-Lisin bütün proteinlerin esansiyel yapı bloğu olarak çocuklarda büyüme ve kemik gelişimi için gereklidir. Yetişkinlerde kalsiyum absorbsiyonuna yardımcı olur ve azot dengesini muhafaza eder. Eksikliğinde enerji düşüklüğü, konsantrasyon yetersizliği, saç dökülmesi, anemi ve büyüme gecikmesi görülür.

L-Prolin : L-Prolin kollojen üretimine yardımcı olarak cildi düzeltir. Kıkırdakları, eklemleri, tendonları ve kalp kaslarını güçlendirir.

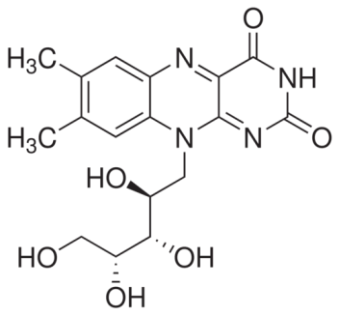
L-Serin : L-Serin yağ ve yağ asidi metabolizması, kas gelişimi ve immün sistemi için varlığı önemlidir. Ayrıca immünoglubulinlerin ve antibadilerin üretimine yardımcı olur.

L-Triptofan : L-Triptofan insan davranışlarını stabilize eder. Seratonin üretiminde kullanılır. Hiper aktif ve agresif çocukların kontrolünde kullanılır. Kalbe iyi gelir. Kilo kontrolüne yardımcı olur. Vitamin B-6 üretimi için gerekli olan büyüme hormonlarının salınmasında faydalıdır.

L-Valin : L-Valin, lösin ve isolösin ile birlikte karbohidrat metabolizmasında rol almaktadır. Ayrıca doku onarımı ve azot dengesi gibi metabolik faaliyetler için kullanılır [27-29].

3.2 Riboflavin (B2 Vitamini)

Riboflavin, RF (B2 vitamini), B grubu vitaminlerinden $C_{17}H_{20}N_4O_6$ kapalı formülüne sahip molekül ağırlığı 376.36 g/mol olan, sarı renkli ve de suda çözünebilen bir kimyasaldır. Bu vitamin adını yapısındaki beş karbonlu karbohidrat olan riboz ve sarı renkli pigment olan flavin grubundan almaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 : Riboflavin molekülü.

Riboflavin karbohidrat, protein ve yağ metabolizmalarında görev alan bir vitamindir. Ayrıca antioksidan özelliği gösterdiği de bilinmektedir. İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen Riboflavin beslenme zincirinde yer alması gereken bir vitamindir [30]. Yeşil yapraklı sebzeler, kurubaklagiller, süt ve yoğurt, peynir gibi süt ürünleri, karaciğer, tavuk eti ve yumurta Riboflavin bakımından zengin gıdalardır. Çizelge 3.3'de çeşitli gıdalara ait Riboflavin içeriği verilmiştir.

Çizelge 3.3 : Çeşitli gıdalara ait Riboflavin içeriği [30].

Gıda Maddesi	Riboflavin (mg/100 g)
Süt	0,17
Yoğurt	0,16
Yumurta	0,30
Buğday	0,11
Karaciğer	3,50
Tavuk	0,19
Kırmızı et	0,24
Brokoli	0,20
Ispanak	0,14

Riboflavin ısıya karşı dayanıklı bir molekülken ışığa karşı hassas bir moleküldür. Gıda ürünlerinin konserve haline getirilme işlemleri veya ısıl işlem görmeleri Riboflavin içeriğini etklilememektedir. Ancak bu vitaminin ışığa maruz kalması halinde miktarında ciddi azalmalar gösterdiği bilinmektedir [30]. Örnek vermek gerekirse, düşük şiddetli ışığa maruz bırakılan bir süt numunesi 24 saat içinde başlangıçtaki Riboflavin içeriğinin %30'nu; yazın direk gün ışığına maruz bırakılması halinde ise 2 saat içinde Riboflavin içeriğinin %70'ni kaybettiği tespit edilmiştir [31].

RF molekülünün su ve etanol içindeki çözünürlüğü sırasıyla 10-13 mg/100 mL ve 4,5 mg/100 mL olarak bilinmektedir. Ayrıca RF molekülü seyreltik asit ve alkali çözeltilerde çözünürken; aseton, dietileter ve kloroform gibi organik çözücülerde çözünmemektedir [32].

Riboflavin kimyasalı florofor özellik taşıyan yani kendiliğinden floresans yapabilen bir moleküldür. 2007 yılında yapılan bir çalışmada sulu çözeltisi hazırlanan RF

molekülünün floresans spekturumu alınmıştır. Spekturum bilgilerine göre RF'nin maksimum uyarılma dalgaboyu 450 nm iken maksimum emisyon yaptığı dalgaboyu 530 nm olarak belirlenmiştir [33].

Riboflavin daha önce de belirtildiği gibi canlı metabolizması için gerekli bir vitamindir. Food and Nutrition Board tarafından verilen bilgilere göre Riboflavin için günlük tavsiye edilen alınması gereken miktar çocuklarda 0,5-0,6 mg, yetişkin kadınlarda 1,1-1,4 mg ve yetişkin erkeklerde 1,2-1,4 mg'dır [34].

Vücutta Riboflavin eksikliği metabolik, dermatolojik ve sinir sistemi hastalıklarına neden olmaktadır. Benzer şekilde ağız içi yaraları, dilde ve dudakta oluşan yara ve iltihaplanmalar, beyaz kan hücrelerinde azalmalar, iskelet ve kas sisteminde meydana gelen deformasyonlar RF eksikliğinde karşılaşılan hastalıklardır [30].

Riboflavin suda çözünen bir molekül olduğundan gereğinden fazlası vücüda alınsa bile idrarla atılabileceği için bu vitamin toksik bir etki yaratmamaktadır. Fare ve köpeklerde yapılan bir çalışmada hayvanların vücut ağırlığı başına 2-10 gr RF takviye edilmesine rağmen canlı metabolizmasında herhangi bir yan etkiye sebep olmadığı tespit edilmiştir [35].

4. DENEYSEL KISIM

Gerçekleştirilen bu doktora çalışmasında kapiler elektroforez-lazer floresans tekniği ile iki farklı analiz yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmanın ilk basamağı floresans özelliği bulunmayan kiral amino asitler için geliştirilen analiz yöntemini kapsamaktadır. Doktora çalışmasının ikinci basamağınında ise doğal floresans özelliği bulunan Riboflavin (RF) molekülü için geliştirilen yöntem bulunmaktadır. Her iki analiz yöntemi gıda örneklerinin analizlerine uygulanmıştır.

4.1 Amino Asitlere Ait Deneysel Çalışmalar

4.1.1 Kullanılan malzemeler ve cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, Fluoresein izotiyosiyanat izomer I (FITC) Fluka (Buchs, Switzerland) firmasından, disodyum tetraborat dekahidrat ve sodyum dodesil sülfat (SDS) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, D ve L-amino asit standartları, sodyum dodesillbenzen sülfonat (SDBS), β-siklodekstrin (β-CD), heptakis (2,6-di-O-methyl)- β-siklodekstirn (heptakis-β-CD), 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin (2-HP-β-CD) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan amino asit stok çözeltileri derişimleri 10 mM olacak şekilde deiyonize suda, FITC stok çözeltisi 20 mM olacak şekilde asetonda hazırlanmıştır.

Yöntemin uygulandığı gıda örneklerinden (nar, elma, üzüm) %100 ticari meyve suları marketlerden temin edilmiştir. Manavlardan temin edilen nar, elma ve üzüm suları laboratuarda taze olarak sıkılarak analiz edilmişlerdir.

Deneylerde kullanılan kapiler elektroforez cihazı Agilent (Waldbronn, Almanya) marka olup, ZETALIF (Picometrics, Montlaur, Fransa) marka lazer indüklenmiş floresans dedektör ile kombine edilmiştir. Sistemde lazer kaynağı olarak 488 nm'de uyarılma sağlayan Argon iyonundan faydalanılmıştır. Cihazda Polymicro Technogies'den (Phoenix, AZ, ABD) temin edilen 50 μm iç çapında 60 cm toplam uzunluğu 45 cm etkin uzunluğu olan kapiler kolon kullanılmıştır. Cihaza takılan yeni

kolon önce 30 dk 1 M NaOH ardından 10 dk su ile yıkanarak aktive edilmiştir. Her günün başlangıcında ise kolon belli sürelerde sıra ile 1 M NaOH, su, 0,1 M NaOH tekrar su ve günlük taze hazırlanan tampon çözelti ile yıkanmıştır.

Ayırma voltajı 25 kV, sistem sıcaklığı 250 ^{o}C olarak seçilmiştir. Standart çözelti ve örnek injeksiyonları hidrodinamik olarak 6 sn süreyle 50 mbar basınç uygulanarak yapılmıştır. İnjeksiyon aralarında kapiler kolon 2'şer dakika 1 M NaOH ve su ardından 2 dakika çalışma tamponuyla yıkanmıştır.

4.1.2 Kiral amino asitlerin ayırma ortamının seçimi

Ayırma ortamının seçiminde kiral çiftler arasında en büyük ayırımı sağlayacak kiral seçici maddenin saptanması ve kiral amino asitlerin duyarlığını literatür değerlerine göre arttıracak tampon ilave maddelerinin saptanması hedeflenmiştir.

FITC'ın en yüksek floresans şiddetinin pH 9,5 civarında olduğu rapor edildiğinden [36], ayırma tamponu olarak borat tampon seçilerek tampon pH değeri 9,6 ya ayarlanmıştır. Kiral seçici moleküller ve tampon ilave maddeleri; konsantrasyonu 50 mM da sabit tutulan borat tamponuna ilave edilerek kiral amino asitler için en uygun ayırma ortamı bulunmaya çalışılmıştır.

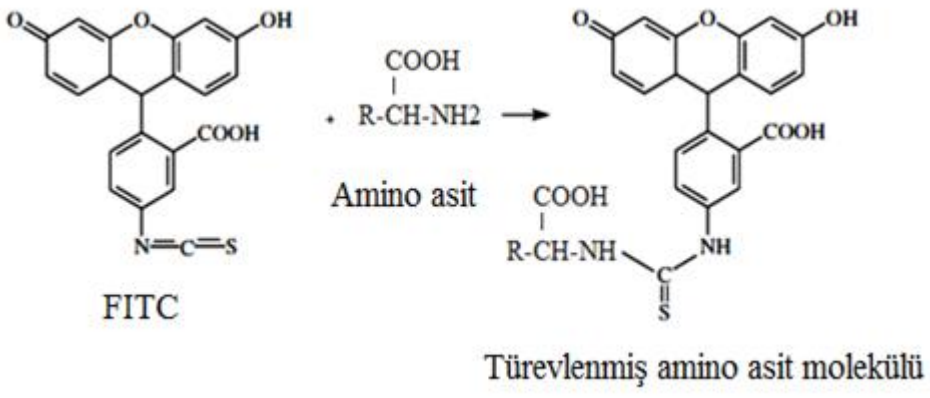
Ayırma ortamına ilave edilerek kiral ayırımı sağlayabilecek kiral seçici maddeler siklodekstrinlerdir. Bu amaçla suda çözünen farklı siklodekstrin (CD) türevlerinin bu çalışmada kullanılan cihaz düzeninde ve tampon sisteminde en iyi ayırmayı sağlayan tipini seçmek için kiral amino asit türleri ile bir seri ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tüm tampon kombinasyonları ön deneme olarak 4 farklı amino asit çiftine yani toplam 8 adet amino asit (D,L-Arjinin, D,L-Prolin, D,L-Alanin ve D,L-Aspartik Asit) molekülüne uygulanmıştır.

CD tipinin seçimi için 5 farklı tip CD molekülü 5-20 mM arasında değişen konsantrasyonlarda 50 mM borat tamponu içine ilave edilerek, hazırlanan ayırma ortamı kombinasyonlarının kiral ayırımcılığına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla denenen CD türleri sırasıyla α-CD, β-CD, γ-CD, heptakis β-CD, 2-hidroksipropil-β-CD (2-HP-β-CD)' dir. Yapılan ön denemeler sonucu kiral çiftler arasında en iyi ayırımı ve en kısa analiz süresini sağlayan β-CD ayırma ortamına ilave edilecek kiral seçici molekül olarak saptanmıştır.

Kiral ayırımcılığı sağlayacak molekül tespit edildikten sonra borat ve β-CD içeren ayırma ortamına organik çözücü, suda çözünen polimerler ve yüzey aktif tipinde ilave maddeler katılımı ile amino asitlerin floresans şiddetinin değişimi izlenmiştir. Bu amaçla organik çözücü olarak metanol, isopropil alkol, butanol ve asetonitril %3-6 arasında değişen oranlarda denenmiştir. Suda çözünen polimerlerden aljinat, m-hidroksi propil selüloz, polivinilprolidon ve polistiren sülfonat %0,25 (a/h) konsantrasyonuna varan miktarlarda denenmiştir. Yüzey aktif madde olarak ayırma ortamına Brij 35 ve sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) ilavesi denenmiştir. Denenen tampon ilavelerinden SDBS'ın floresans şiddetini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilerek bu yüzey aktif maddenin ayırma ortamında kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.3 Standart amino asit çözeltilerinin türevlendirilme şartlarının tespiti

Floresein izotiyosiyanat (FITC) molekülü, primer ve sekonder amino gruplarını rahatlıkla türevlendirerek floresans özellik kazanmasını sağlayan etkili bir ajandır. FITC molekülü 488 nm dalga boyunda uyarılma, 520 nm dalga boyunda emisyon yapabilme özelliğine sahip olması sayesinde ışın kaynağı Argon iyonu olan sistemleriyle uyumlu çalışabilmektedir. Türevlerinin kolay oluşturulması, farklı reçetelerin uygulanmasına imkan tanıması ve güçlü floresans sinyali üretebilmesi bakımından amino asit türevlendirmelerinde tercih edilen bir moleküldür [37]. Türevlendirme reaksiyonu Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1 : FITC ile türevlendirilmiş amino asit molekülü [37].

Standart amino asitlerin FITC ile türevlendirilme şartlarının tespitinde, aminoasit/FITC derişim oranları incelenerek amino asitleri tümüyle türevlendirecek ve ayırmayı etkilemeyecek oranda ufak bir fazlasının türevlendirme çözeltisinde kalacağı FITC konsantrasyonunun tespiti için standart amino asit çözeltileri ile seri denemeler gerçekleştirilmiştir. Toplam amino asit derişimi: FITC derişim oranı 1:20, 1:10, 1:5, 1:2 ve 1:1 olacak şekilde karışımlar hazırlanmıştır. Türevlendirme işlemi bazik ortamda gerçekleştiği için türevlendirme tampon ortamı olarak karbonat ve borat çözeltileri denenmiştir.

FITC ile amino asitlerin türevlendirme reaksiyonlarının süresini azaltmak için türevlendirme reaksiyonuna sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla farklı amino asit/FITC oranlarında çözelti kombinasyonları oda sıcaklığından 60 ^{o}C'ye kadar farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerde türevlendirme reaksiyonuna sokularak hem en verimli hem de en hızlı türevlendirme şartları tespit edilmiştir.

Ön denemeler sonucu toplam standart amino asit/FITC derişim oranı 1:1 olacak şekilde 100 mM borat tamponu içinde, 40 ^{o}C'de 4 saat boyunca karanlıkta ve su banyosunda çalkalanarak gerçekleştirilen türevlendirilme işlemi en uygun şartlar olarak tespit edilmiştir.

4.1.4 Meyve suyu örneklerinin türevlendirilmesi

Amino asit standartları için saptanan türevlendirme koşulları meyve sularına göre modifiye edilmiştir. Meyve sularını türevlendirirken tüm amino asitlerin türevlendiğinden emin olunacak küçük bir miktar FITC pikinin elektroferogramda görülmesine dikkat edilmiştir. Gerek ticari gerekse laboratuvarda hazırlanan meyve suları mikrofiltreden süzüldükten kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Meyve suları için en uygun örnek türevlendirme prosedürü; 40 µL meyve suyunun 40 µL 20 mM FITC ve 920 µL 100 mM'lık Borat çözeltisi ile karıştırılması olarak tespit edilmiştir. Örnekler de standartlar gibi 4 saat 40 ^{o}C'lik su banyosunda çalkalama işlemine maruz bırakılarak türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme sonucu elde edilen numuneler 50-200 kat arasında uygun gelen seyreltme oranları tespitinden sonra injeksiyona hazır hale getirilmişlerdir.

4.2 Riboflavin Molekülüne Ait Deneysel Çalışmalar

4.2.1 Kullanılan malzemeler ve cihazlar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallardan Riboflavin Sigma Chemical Co (Steinheim, Germany) firmasından, di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na_2HPO_4. $2H_2O$) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan tüm çözücüler (sodyum hidroksit ve hidroklorik asit) analitik saflıkta olup, tüm deneylerde Elga Purelab Option-7-15 (Elga, UK) model su cihazından elde edilen deiyonize su ile hazırlanmıştır.

Riboflavin analizi için geliştirilen yöntem 4 farklı tipte toplam 14 adet çay numunesinin Riboflavin içeriklerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Çalışılan çaylardan ilk grup yerel marketlerden temin edilen poşet siyah çay olup B1, B2, B3 ve B4 olarak kodlanmıştır. Çayların etiket bilgilerine göre B1 çayı Doğu Karadeniz menşeine ait iken sırasıyla; B2 çayı Kenya ve Sri Lanka, B3 çayı Türk, Kenya ve Endenozya siyah çayları karışımı, B4 çayı ise Türk, Sri Lanka, Kenya ve Hindistan siyah çayları karışımlarıdır. Deneyleri gerçekleştirilen iki farklı markada poşet yeşil çay numuneleri yine yerel marketlerden satın alınmış olup G1 ve G2 olarak kodlanmıştır.

Çay gruplarından diğer ikisi adaçayı ve biberiye bitkilerine aittir. Yerel marketlerden ikişer, Boston (ABD) marketlerinden ikişer adet olmak üzere toplam 4 marka adaçayı ve yine toplam 4 marka biberiye çayı temin edilmiştir. Yerli adaçayları S1 ve S2; Amerika menşeili olan adaçayları S3 ve S4 olarak kodlanırken; yerli biberiye R1 ve R2; Amerika menşeili olan biberiyeler R3 ve R4 olarak kodlanmıştır.

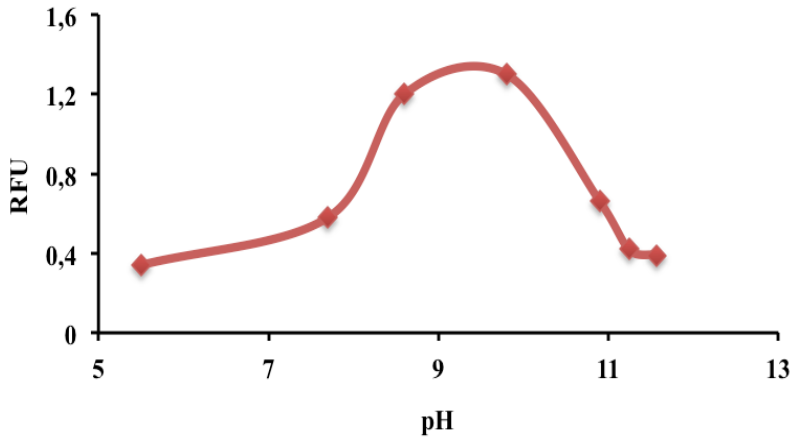
Deneylerde kullanılan kapiler elektroforez cihazı Agilent (Waldbronn, Almanya) marka olup, ZETALIF (Picometrics, Montlaur, Fransa) marka lazer indüklenmiş floresans dedektör ile kombine edilmiştir. Sistemde lazer kaynağı olarak 488 nm'de uyarılma sağlayan Argon iyonundan faydalanılmıştır. Cihazda Polymicro Technogies'den (Phoenix, AZ, ABD) temin edilen 50 µm iç çapında 67 cm toplam uzunluğu 50 cm etkin uzunluğu olan kapiler kolon kullanılmıştır. Cihaza takılan yeni kolon önce 30 dk 1 M NaOH ardından 10 dk su ile yıkanarak aktive edilmiştir. Her günün başlangıcında ise kolon belli sürelerde sıra ile 1 M NaOH, su, 0,1 M NaOH ve tekrar su ve günlük taze hazırlanan tampon çözelti ile yıkanmıştır.

Riboflavin analizi için ayırma potansiyeli 25 kV, sistem sıcaklığı 25 ^{o}C olup injeksiyon basıcı ve süresi 50 mbar ve 6 sn olarak tespit edilmiştir. Bu optimum koşullar altında analiz 4 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanmaktadır.

4.2.2 Riboflavin molekülünün ayırma ortamının seçimi

Riboflavin (RF) molekülü suda çözünen ve nötral sulu çözeltide yüksüz bir moleküldür. pKa değeri 9,69 olan Riboflavin molekülü bazik ortamda negatif yük ile yüklenir [38] . Bu bilgi doğrultusunda ilk tampon denemeleri için bazik ortamda tampon özelliği olan fosfat ve borat çözeltilerinden yararlanıldı. Sisteme enjekte edilen suda hazırlanmış RF molekülü için gerek pik yüksekliği gerekse pik simetrisi bakımından fosfat tamponunun daha uygun olduğu gözlendi.

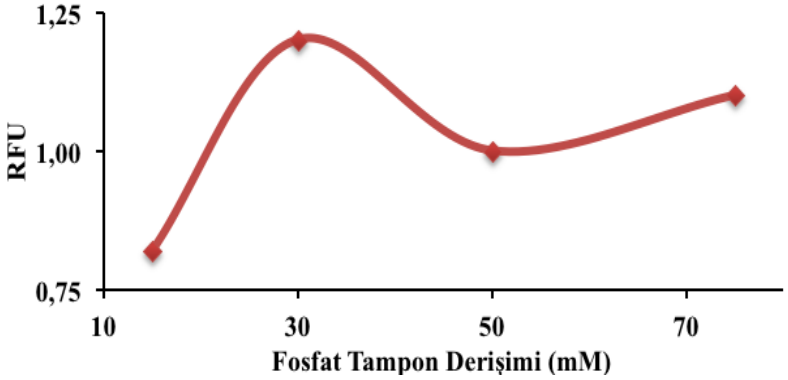
Fosfat tamponuna karar verilmesi aşamasından sonra RF molekülünün floresans şiddetinin tampon çözeltisinin pH değerinden nasıl etkilendiğinin anlaşılması için pH taramaları yapıldı. Derişimi 30 mM olan ve pH değerleri 5,50-11,56 arasında değişen fosfat tamponları hazırlandı. Şekil 4.2'de 30 mM fosfat tampon içine enjekte edilen deiyonize suda hazırlanan 0,5 µM RF pikinin floresans şiddetinin tampon pH değeriyle nasıl değiştiği verilmiştir.



Şekil 4.2 : Riboflavin molekülünün floresans şiddetine pH etkisi.

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi RF molekülü için cihaz tarafından okunan bağıl floresans birimi (RFU) pH değerinin artmasıyla artmakta, pH 10 civarında en yüksek değere ulaşmakta ve pH ın daha fazla artmasıyla RFU değerinde ciddi düşüş görülmektedir. Tüm bu veriler doğrultusunda tampon çözeltinin uygun pH değeri olarak pH= 9,9 seçilmiştir.

RF molekülün analizi için fosfat tamponunun pH değerine karar verildikten sonra uygun derişim taramasına geçilmiştir. Bu amaçla 15, 30, 50 ve 75 mM derişime sahip fosfat çözeltileri belirlenen pH'da hazırlanmıştır. Tampon derişimine karşı RF pikinin bağıl floresans değişimi Şekil 4.3'de verilmiştir. Çalışma tamponu 30 mM derişimde pH=9,9 olan Na_2HPO_4 olarak tespit edilmiştir.

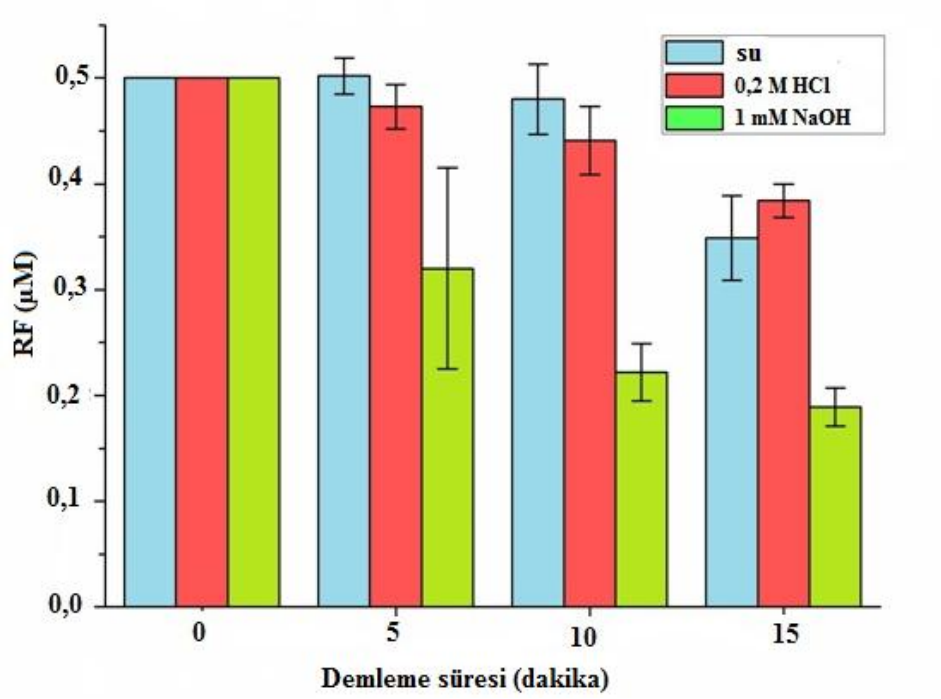


Şekil 4.3 : Riboflavin molekülünün floresans şiddetine tampon derişiminin etkisi.

4.2.3 Riboflavinin bitkilerden ekstraksiyon şartlarının tespiti

Riboflavin suda çözünen ve ısıya dayanıklı bir molekül olduğu için riboflavin molekülünün bitki çaylarından sıcak su ile demleme usulü ekstraksiyonu hedeflenmiştir. Suya ilave edilen asit ve baz çözeltilerin ekstraksiyon verimini arttırıp arttırmayacağı da kontrol edilmiştir. Demlemeler benmari usülü, bitki ve sıcak su içeren demliğin sıcak su banyosunun üstünde belli sürelerde bekletilmesi ile yapılmıştır. Riboflavin ışıktan etkilenen bir molekül olduğu için bitkileri içeren demlik kısmı alüminyum folyo ile sarılarak demleme çözeltisi ışıktan korunmuştur. Buna rağmen demleme süresi zarfında Riboflavin molekülünde bir bozulma olup olmadığı standart riboflavin çözeltileri kullanılarak kontrol edilmiştir.

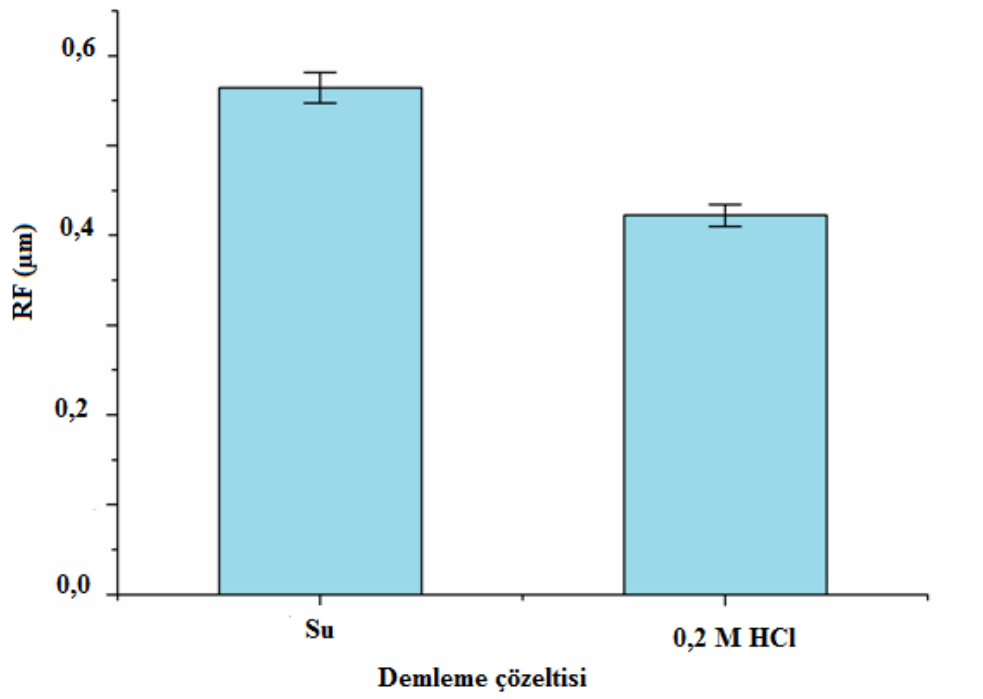
Bu denemeler için öncelikle RF standart çözeltisi aynı derişimde olmak şartıyla deiyonize suda, 0,2 M HCl ve 0,1 mM NaOH çözeltilerin içinde hazırlandı. Hazırlanan bu 3 farklı standart çözeltiler, oluşturulan su banyolarında belli sıcaklıklara kadar ısıtıldı. Sulu çözeltide bu sıcaklık 100 ^oC, asit ve baz çözeltileri için 80^0 C olarak ölçülmüştür. Riboflavin standartları üç farklı çözücü ortamında eş zamanlı su banyosunda 5-10 ve 15 dakika bekletilerek ilk RF miktarının zamanla ne kadar değiştiği incelendi. Su banyosunda farklı çözeltilerde ve farklı sürelerde beklenen standart RF maddesinin miktarındaki değişimler Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4 : Farklı demleme çözeltilerinde, zamana karşı RF miktar değişimi.

Şekil 4.4'de görüldüğü üzere ilk 5 dakika içinde suda hazırlanan derişimi bilinen RF miktarında bir değişim yokken 0,2 M HCl içindeki standart RF miktarında minik bir azalma 0,1 mM NaOH içinde hazırlanan RF miktarında ise ciddi bir azalma göze çarpmaktadır. Sürenin artmasıyla suda hazırlanan RF miktarında bir miktar düşüş gözlense de, kullanılan diğer çözeltilerde gözlenen düşüş miktarı yanında azalma çok daha azdır. Ayrıca alkali ortamdaki azalış oldukça dikkat çekicidir.

Yukarıdaki ön deneme sonucu çayların demlenme süresi 5 dakika olarak saptandı ve bazik ortamın ekstraksiyon ortamı olarak uygun olmadığı saptandı. Sulu çözelti ile asidik çözeltinin ekstraksiyon verimi çay örneğinin suda ve asitli çözeltide 5 dakika demlenmesi sonunda demleme çözeltisindeki Riboflavin miktarının karşılaştırılması ile yapıldı. 5 dakika sonunda süzülüp soğutulduktan sonra analizi gerçekleştirilen çay numunesinde hesaplanan miktarlar Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 : Farklı demleme çözeltilerinde, çay numesinedeki hesaplanan RF miktarı.

Şekilden görüldüğü gibi asit çözeltisi ekstraksiyon verimini arttırmamakta aksine asitli çözeltide riboflavin miktarında azalma gözlenmektedir.

Yapılan ön denemeler sonucunda, bitkilerin ve 100^{o}C daki suyun içindeki bulunduğu demliğin, gene 100^{o}C su banyosu üzerinde 5 dakika boyunca bekletilmesi bitki örneklerinin RF ektraksiyonu için en uygun ekstraksiyon işlemi olarak seçilmiştir.

Tüm çay numenelerinden alınan 1 gr lık tartım 50 mL kaynamış su içinde 5 dakika süre içinde su banyosu üzerinde demlenmiştir. Su miktarı 100 mL ye çıkarılmış ancak ekstrakte olan RF miktarında bir değişim görülmemiştir. Soğutulup süzülen örnekler ayrıca hiçbir işleme gerek duyulmadan cihaza enjekte edilmiştir.

5. SONUÇLAR

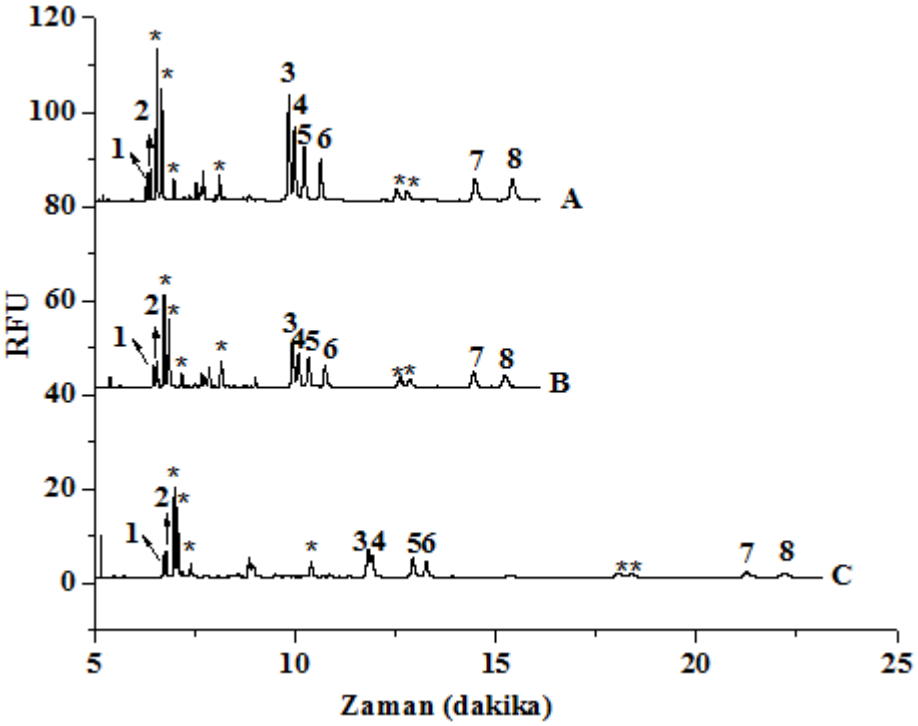
5.1 Kiral Amino Asit Analiz Yöntemi

Deneysel kısımda açıklandığı gibi ön denemeler sonucu kiral amino asitlerin ayırımcılığı ve duyarlığı açısından en uygun ayırma ortamı olarak 50 mM borat, 5 mM SDBS ve 10 mM β-CD kompozisyonu seçilmiştir. Bu ayırma ortamında ön denemelerde kullanılan 4 kiral amino asit çiftinin ayırma elektroferogramı Şekil 5.1'de A sembolü ile verilmiştir. Literatürde sadece bir grup tarafından, CE-LIF yöntemi ile kiral amino asit çalışması rapor edilmiştir [39].

Bu doktora çalışmasında seçilen ayırma ortamının kiral amino asitler için literatürde rapor edilen CE-LIF çalışmasına göre iki önemli iyileştirmesi şekilde görünmektedir. Literatür raporunda ayırma ortamı olarak birçok CE çalışmalarında genel olarak kullanılan yüzey aktif madde olan SDS kullanılmıştır. Şekil 5.1' de B sembollü elektroferogramda görüldüğü gibi, bu çalışmada elde edilen ayırma zamanına ulaşabilmek için SDS li ortama 30 mM kiral seçici molekül ilave etmek gerekmiştir. Halbuki bu çalışmada ayırma 10 mM kiral seçici molekül, yani literatür çalışmasına göre 1/3 oranında daha az kiral seçici molekül kullanılmıştır. Kiral seçici moleküller pahalı kimyasallar olduğu için yöntem ekonomisi açısından bu sonuç olumludur.

Şekil 5.1 'de C sembollü elektroferogramda görüldüğü gibi SDS içeren tamponda CD konsantrasyonu 20 mM indirildiğinde ayırma süresi önemli ölçüde uzamakta, bazı amino asitlerin kiral ayrımı ortadan kalkmakta ve son gelen pikler yaygınlaşmaktadır. CD konsantrasyonu bu çalışmada kullanılan değer olan 10 mM indirildiğinde ise SDS'li ortamda denenen tüm kiral çiftlerin ayırımı ortadan kalkmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan ayırma ortamının literatür raporuna göre ikinci avantajı SDBS kullanımı ile SDS kullanılan ayırma ortamına göre pik boylarının yani analiz duyarlılığının 1,5-2 kat arası artmasıdır.



Şekil 5.1: Farklı tampon kombinasyonlarının kiral amino asit pikleri üzerine etkisi. **A:** 50 mM Borat + 5 mM SDBS + 10 mM β-CD, **B:** 50 mM Borat + 20 mM SDS + 30 mM β-CD , **C:** 50 mM Borat + 20 mM SDS + 20 mM β-CD **1)** 0,6µM D-Arg, **2)** 0,6µM L-Arg, **3)** 0,6 µM L-Pro, **4)** 0,6 µM D-Pro **5)** 0,6 µM D-Ala, **6)** 0,6 µM L-Ala **7)** 1,2 µM D-Asp, **8)** 1,2 µM L-Asp **(*)** FITC'nin fazlası.

Kiral amino asitler için en uygun ayırma elektroliti olarak 50 mM Borat, 5 mM SDBS ve 10 mM β-CD'den oluşan pH=9,6 olarak ayarlanan çözeltide çalışılmıştır. Meyve sularında bulunma olasılığı yüksek amino asitlerden 9 enantiyomer çifti (18 amino asit standardı) enjekte edilerek kiral amino asitlerin seçilen analiz ortamında rezolüsyon değerleri tespit edilmiştir. Çizelge 5.1' de görüldüğü gibi 9 enantiyomer çiftin tamamının; seçilen ayırma ortamında ayrımı gerçekleşmektedir.

Çizelge 5.1: Standart kiral amino asit piklerinin rezolüsyon değerleri.

Amino Asitler	Kiral Çiftlerin Rezolüsyon Değerleri
Arg	3,22
Leu	5,08
Trp	2,42
Pro	1,87
Asn	4,05
Ser	3,69
Ala	5,30
Glu	9,27
Asp	8,82

5.1.1 Metod validasyon sonuçları

11 amino asit standardı için kalibrasyon eğrisi çizilebilecek doğrusal derişim aralıkları, bu derişim aralıklarında çizilen kalibrasyon doğrularının denklemleri ve regrasyon değerleri Çizelge 5.2' de verilmiştir.

Çizelge 5.2: Standart kiral amino asit çözeltilerinin kalibrasyon değerleri.

Amino Asitler	Lineer Aralık (μM)	Kalibrasyon Denklemi	Korelasyon Sabiti(R^2)
L-Arg	0,03-0,75	y=0,296x-0,005	0,994
D-Leu	0,03-1,50	y=0,162x-0,004	0,998
L-Trp	0,03-1,50	y=0,153x-0,019	0,999
L-Leu	0,03-1,50	y=0,129x-0,0004	0,994
L-Pro	0,03-0,90	y=0,204x-0,002	0,995
D-Pro	0,03-0,90	y=0,204x-0,003	0,997
L-Asn	0,03-1,50	y=0,134x+0,003	0,997
L-Ser	0,03-1,50	y=0,065x+0,0005	0,998
L-Ala	0,03-1,50	y=0,102x-0,0003	0,996
L-Glu	0,06-2,25	y=0,0447x+0,0032	0,992
L-Asp	0,06-2,25	y=0,0336x+0,0011	0,999

Amino asit standart çözeltileri art arda 5 kez injekte edilerek elde edilen pik düzeltilmiş alanlarının (A/t) % bağıl standart sapmaları (%RSD) değerleri tespit edilmiştir. Çizelge 5.3'de verilerden görüleceği gibi yöntemin kesinliği CE çalışmalarında kabul edilen % RSD değerleri içindedir. Yöntemin herbir amino asit için belirleme değerleri (LOD) gürültünün 3 katı konsantrasyona, kantitatif tayin sınırları (LOQ) gürültünün 10 katı konsantrasyon değerlerine eş değer olarak hesaplanmış ve Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.3: Standart kiral amino asit piklerine validasyon sonuçları.

Amino Asitler	LOD (nM)	LOQ (nM)	A/t (%RSD)
L-Arg	1,09	3,63	1,62
D-Leu	1,24	4,15	2,58
L-Trp	1,36	4,54	2,46
L-Leu	1,33	4,42	3,97
L-Pro	0,848	2,83	2,68
D-Pro	0,998	3,32	3,21
L-Asn	1,32	4,38	2,79
L-Ser	2,81	9,36	1,98
L-Ala	1,87	6,22	3,26
L-Glu	3,70	12,3	4,54
L-Asp	3,99	13,3	4,63

Bölüm 5.2'de analiz sonuçları açıklanan nar suyu örneklerinde yöntemin geri kazanım sonuçları bulunmuştur.

Yöntemin doğruluğu amino asit analizi yapılan bir nar suyuna standart amino asit ilavesi ve geri kazanım sonuçlarının bulunması ile gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım sonuçları Çizelge 5.4'de verilmiştir. Çizelgeden görüldğü gibi geri kazanım değerleri %84,4 ile %104 arasında değişmektedir.

Çizelge 5.4 : Amino asit çalışmasına ait geri kazanım sonuçları.

Amino Asit	Örnekteki miktar (µM)	Eklenen miktar (µM)	Yüzde geri kazanım
L-Arg	0,43	0,25	91,6 ± 0,9
		0,5	104 ± 1
D-Leu	0,47	0,25	96,9 ± 0,9
		0,5	97,9 ± 1,0
L-Trp	0,92	0,5	92,0 ± 0,8
		1	103 ± 1
L-Leu	0,43	0,25	92,1 ± 0,9
		0,5	97,2 ± 1
L-Pro	0,49	0,25	99,3 ± 1,0
		0,5	99,6 ± 1,1
D-Pro	1,46	0,75	93,1 ± 0,9
		1,5	97,7 ± 1,0
L-Asn	0,77	0,5	84,7 ± 1,1
		1	99,2 ± 1,0
L-Ser	2,43	1,25	90,3 ± 1,0
		2,5	98,8 ± 1,0
L-Ala	1,57	0,75	84,9 ± 1,3
		1,5	103 ± 1
L-Glu	1,17	0,5	89,6 ± 1,6
		1	99,7 ± 1,0
L-Asp	1,09	0,5	95,6 ± 0,9
		1	101 ± 1,2

5.2 Amino Asit Analiz Yönteminin Gıda Örneklerine Uygulaması

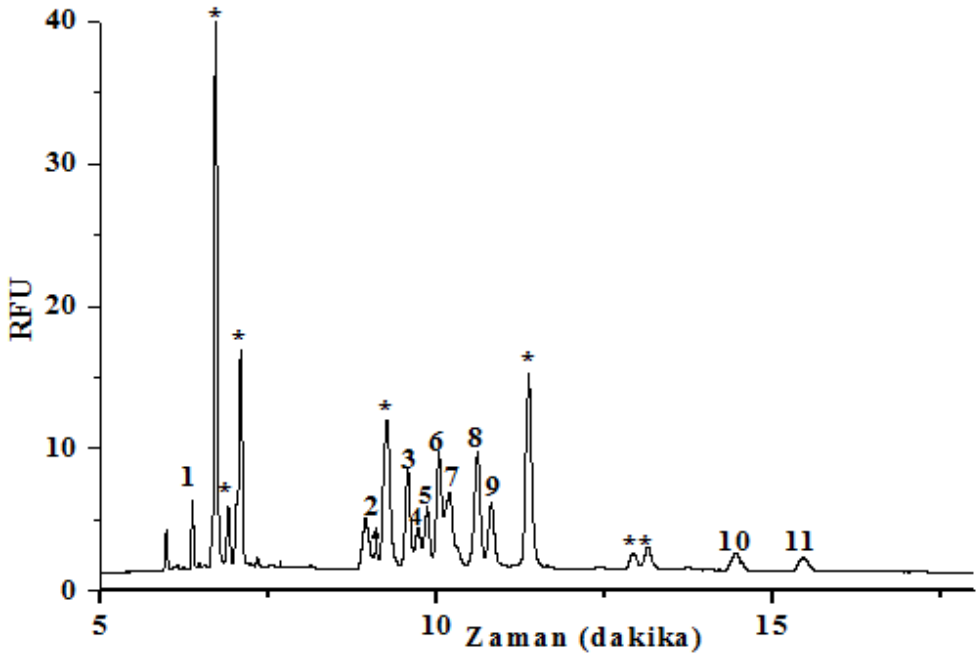
5.2.1 Nar sularının amino asit profillerinin saptanması

Son yıllarda nar suyu, literatürde rapor edilen çok sayıda bilimsel çalışma nedeniyle çok önem kazanmıştır. Nar suyunun vücutta bakteri, virüs, iltihap ve birçok kanser türüne karşı etkileri, kalp hastalıklar, Alzheimer ve erkek üretim sistemine olumlu etkisi son yıllarda birçok önemli bilimsel makalelerin konusu olmuştur [40].

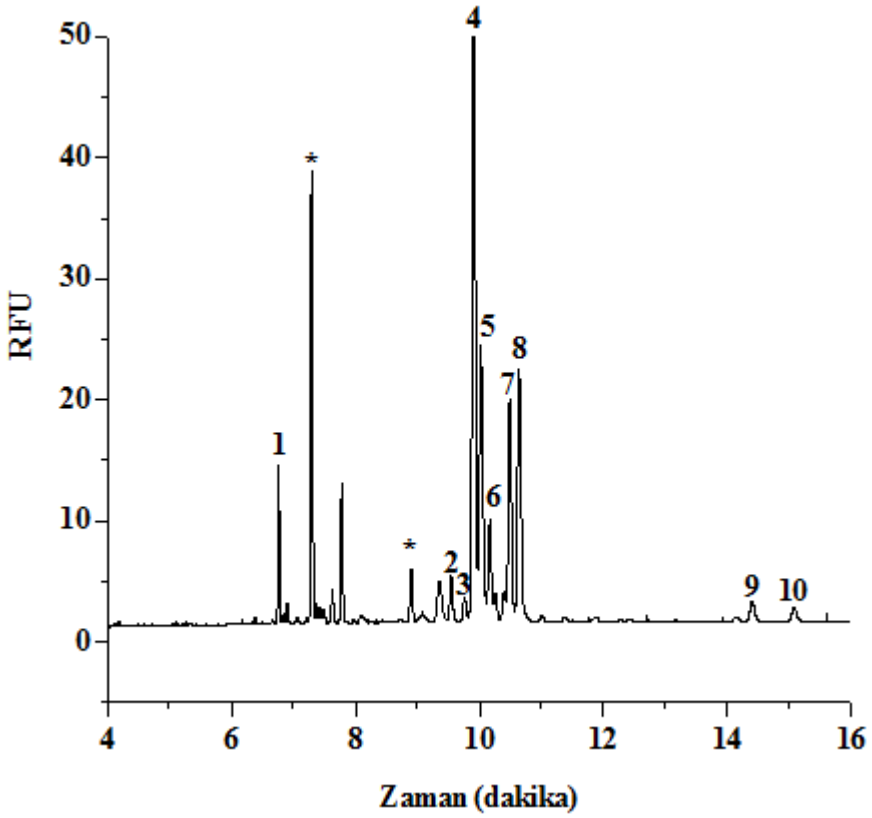
Nar suyuna artan ilgiye parallel olarak, nar suyunun antioksidan aktivitesi , kimyasal ve fiziksel analizleri ile ilgili çalışmalar da literatürde görülmeye başlanmıştır. Ancak diğer meyve sularının amino asit profilleri şimdiye kadar rapor edilmesine karşı nar suyu için böyle bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle geliştirilen analiz yönteminin uygulaması, nar suyunun kiral amino asit profilini aydınlatmak amacıyla ticari ve taze nar suyu örneklerinin analiziyle gerçekleştirilmiştir.

Etiket bilgilerine göre ikisi konsantre meyve suyunun sulandırılması ile elde edilen (Ticari A ve Ticari B); diğeri sulandırılmadan sıkılarak elde edilen (Ticari C) 3 farklı marka ticari nar suyu ve marketlerden temin edilen ve labaratuvar ortamında sıkılan 3 nar meyvesi suyu geliştirilen analiz yöntemi ile analiz edilmiştir. Ticari meyve suları etiket bilgilerine göre meyve sularının tamamı %100 nar suyu olup koruyucu madde ve şeker ilavesi içermemektedir.

Geliştirilen yöntemle analizi gerçekleştirilmiş seçilen bir marka konsantre ticari nar suyuna ait elektroferogram Şekil 5.2 ‘de; laboratuvarda kabuğu ile sıkılarak hazırlanmış nar suyuna ait elektroferogram da Şekil 5.3’de verilmiştir.



Şekil 5.2 : 1/50 oranında seyreltilen konsantre A marka nar suyu elektroferogramı. **(1)** L-Arg, **(2)** D-Leu , **(3)** L-Trp , **(4)** L-Leu , (**5**) L-Pro, **(6)** D-Pro **, (7)** L-Asn, **(8)** L-Ser, **(9)** L-Ala, **(10)** L-Glu **(11)** L-Asp **(*)** reaksiyona girmemiş FITC.



Şekil 5.3: 1/200 oranında seyreltilen sıkma nar 1suyu elektroferogramı.
(1) L-Arg, **(2)** L-Trp, **(3)** L-Leu, **(4)** L-Pro, **(5)** D-Pro, **(6)** L-Asn, **(7)** L-Ser, **(8)** L-Ala

Analizi gerçekleştirilen tüm nar sularının amino asit içerikleri Çizelge 5.5'de verilmiştir.

Çizelge 5.5 : Nar suyu numunelerinin amino asit içeriği.

	Amino Asit İçeriği (mg/L)					
	Ticari A marka	**Ticari B marka**	**Ticari C marka**	**Sıkma Nar suyu 1**	**Sıkma Nar suyu 2**	**Sıkma Nar suyu 3**
L-Arg	44 ± 2	44,2 ± 1,0	276 ±4	80,4 ±2,45	202 ±6	93 ±0,32
D-Leu	7,27±1,50	DE*	DE*	DE*	DE*	DE*
L-Trp	117 ± 54	153 ±3	277 ±2	160 ±18	146 ±4	182 ±19
L-Leu	9,9 ± 2,0	29,4 ±2,0	94,2 ±4,3	38,4 ±3,0	47,6 ±6,5	26,4 ±4,7
L-Pro	29,2 ±2,0	23,4 ±0,1	219 ±6	421 ±9,75	738 ±51	371 ±72
D-Pro	39,1 ±3,0	74,9 ±0,3	61 ±3	202 ±0,30	355 ±25	231 ±46
L-Asn	36,5 ±4,0	60,5 ±4,0	41,6 ±2,24	95,1 ±7,2	137 ±13	90,6 ±2,8
L-Ser	217 ±25	241 ±4	159 ±10	641 ±13,70	846 ±55	780 ±12
L-Ala	54,8 ±7,0	79,1 ±3,5	50,3 ±1,20	252 ±26	545 ±43	291 ±34
L-Glu	81,1 ±4,0	143 ±0,22	85 ±0,80	119 ±12,06	198 ±11	254 ±29
L-Asp	77,1 ±3,0	148 ±9	73,7 ±4,0	67 ±14	159 ±16	102 ±2,50

DE* :Dedekte edilmedi.

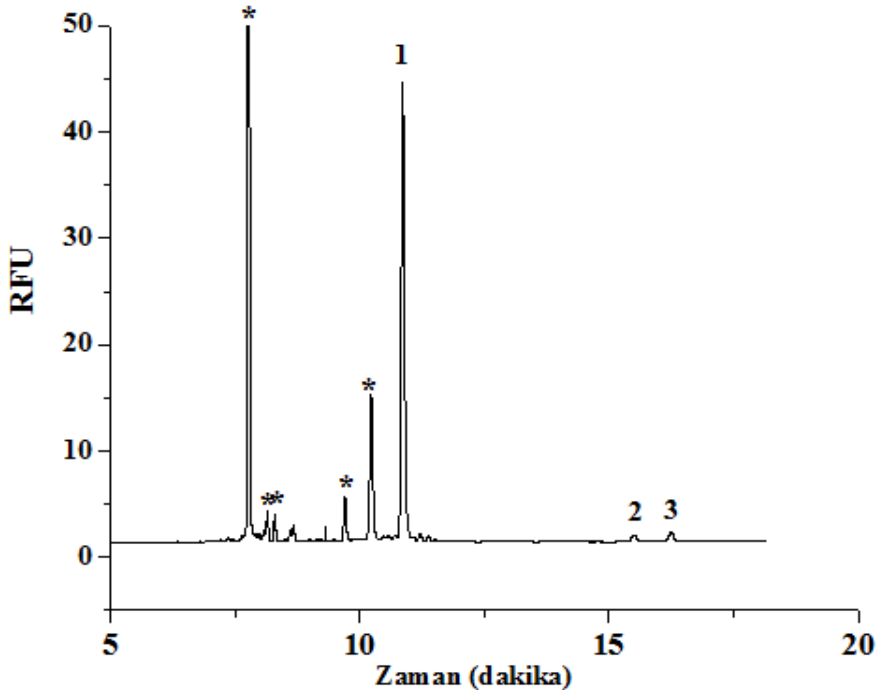
Görüldüğü gibi nar suları çok sayıda amino asit içermektedir. Tüm nar sularında D-Prolin, sadece bir adet ticari nar suyunda D-Leusin tespit edilmiştir.

5.2.2 Nar suyunun elma suyu ile hilelendirilmesinin teşhisi

Nar meyvesi dünya yüzünde üretim alanı ve üretim mevsimi sınırlı olması nedeniyle pek çok ülkede ticari nar suları diğer meyve sularına göre pahalı sulardır. Elma suyunun bazı ticari nar suları ile karıştırılarak bu nar sularının %100 nar suyu fiyatına pazarlandığı meyve suyu piyasasında bilinmektedir.

Bu çalışmada nar suyunun ve elma suyunun amino asit profili farklılıklarını inceleyerek bazı amino asitlerin bu hilelendirmeyi ortaya koyacak bir işaretleyici olup olmadığı araştırılmıştır.

Aynı metod kullanılarak, laboratuvar ortamında rendelenerek suları hazırlanan 3 farklı tipteki starking (kırmızı) , golden (sarı) ve granny smith (yeşil) türü elma sularının nar suyuna nazaran daha az sayıda amino asit içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca elma profilinde göze çarpan en önemli nokta elmanın cinsi ne olursa olsun L-Asn içeriğinin baskın olmasıdır. Granny Smith (yeşil elma) tipi elmaya ait elektroferogram Şekil 5.4'de verilmiştir.



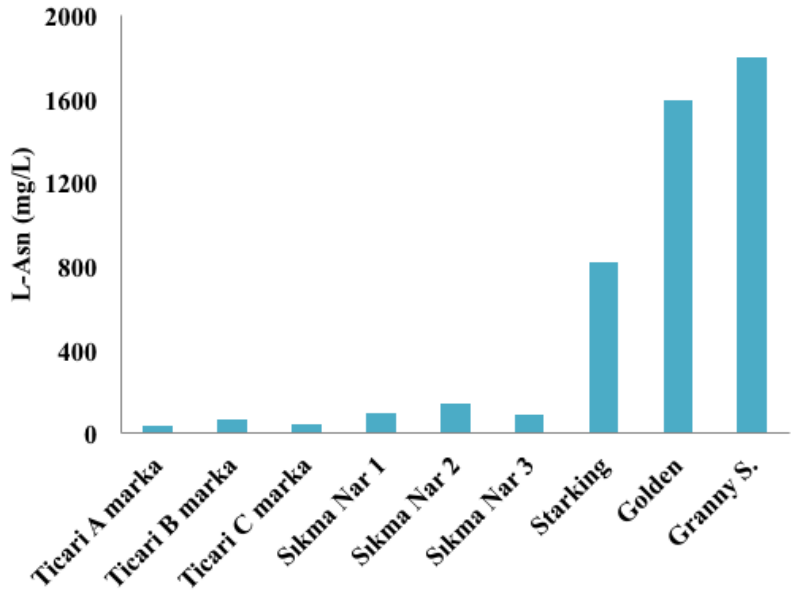
Şekil 5.4: 1/200 oranında seyreltilen yeşil elma suyu elektroferogramı **(1)** L-Asn, **(2)** L-Glu, **(3)** L-Asp **(*)** reaksiyona girmemiş FITC.

Çalışılan tüm elma sularına ait amino asit miktarları Çizelge 5.6 'da verilmiştir.

Çizelge 5.6 : Elma suyu numunelerinin amino asit içeriği.

	Amino Asit İçeriği (mg/L)		
	Kırmızı Elma (Starking)	**Sarı Elma (Golden)**	**Yeşil Elma (Granny Smith)**
L-Asn	817 ± 36	1587 ± 42	1793 ± 39
L-Glu	155 ± 13	65,0 ± 12,9	85,6 ± 9,9
L-Asp	515 ± 25	87,9 ± 6,14	116 ± 11

Çizelge 5.5 ile Çizelge 5.6 incelendiğinde taze sıkma nar suyu ile elma suyunun L-Asn miktarları arasında anlamlı farklılık göze çarpmaktadır. Bu miktarlar doğrultusunda L-Asn miktarının fazlalığı elma suyu için karakteristik bir özellik göstermektedir. Nar ve elma sularının L-Asn miktarlarının karşılaştırıldığı Şekil 5.5 ile bu fark daha kolay anlaşılmaktadır.

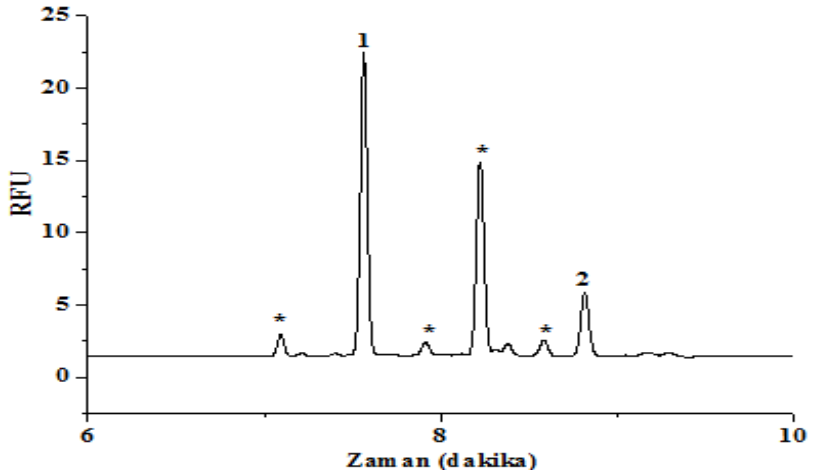


Şekil 5.5: Nar ve elma sularına ait L-Asn miktarları.

Elde edilen sonuçlara göre, ticari nar sularında L-Asn miktarının ortalama değerlere göre fazlalığı nar suyunun elma suyu ile hilelendirilmesinde bir delil olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

5.2.3 Nar suyunun üzüm suyu ile hilelendirilmesinin teşhisi

Tat ve renk açısından nar suyunun hilelendirilmesinde kullanılan bir başka meyve suyu üzüm suyudur. Nar suyu ve üzüm suyu amino asit profilleri arasındaki farklılığı yakalamak için üzüm suyu analizleri de çalışma kapsamında yapılmıştır. Çalışmada labaratuvar ortamında sıkılan beş farklı beyaz, üç farklı siyah ve iki farklı pembe taze üzüm suyu örneklerinin amino asit profilleri geliştirilen analiz yöntemi ile yapılmıştır. Şekil 5.6'da sıkma beyaz üzümlerden 1 kodlu meyve suyunun elektroferogramı verilmiştir. Elektroferogramda baskın olan amino asitler L-Arg ve L-Pro olarak tespit edilmiştir.



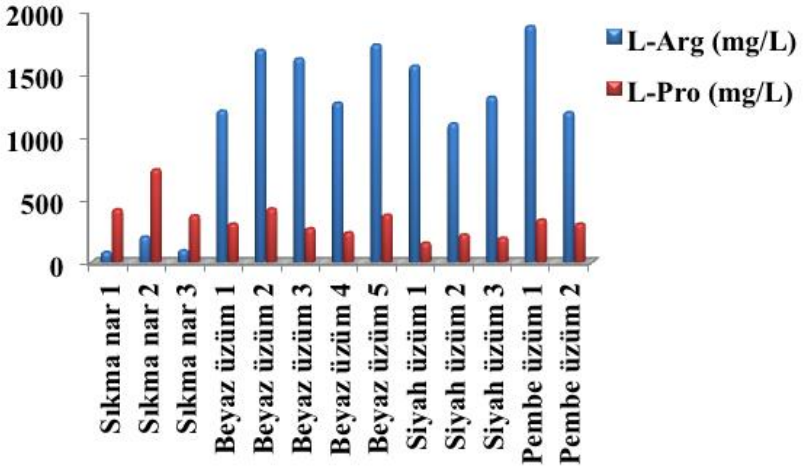
Şekil 5.6: 1/500 oranında seyreltilen beyaz üzüm 1 suyu elektroferogramı.
(1) L-Arg, **(2)** L-Pro, **(*)** reaksiyona girmemiş FITC

Çalışılan üç farklı tipteki üzümlere ait L- Arg ve L-Pro miktarları Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5.7 : Üzüm suyu numunelerinin amino asit içeriği.

	L-Arg (mg/L)	L-Pro (mg/L)
Beyaz üzüm 1	1205 ± 32	306 ± 40
Beyaz üzüm 2	1690 ± 45	426 ± 38
Beyaz üzüm 3	1621 ± 44	268 ± 29
Beyaz üzüm 4	1268 ± 18	236 ± 15
Beyaz üzüm 5	1732 ± 22	376 ± 10
Siyah üzüm 1	1563 ± 36	154 ± 8
Siyah üzüm 2	1103 ± 47	219 ± 8
Siyah üzüm 3	1315 ± 32	193 ± 17
Pembe üzüm 1	1879 ± 48	338 ± 11
Pembe üzüm 2	1193 ± 22	306 ± 19

Nar suları ile kıyaslandığında L-Arg amino asidinin de üzüm suları için karakteristik olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 5.7).



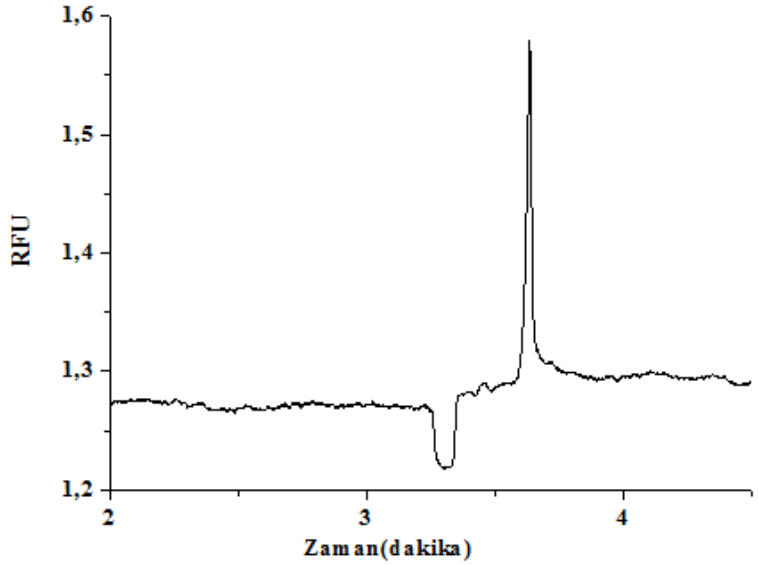
Şekil 5.7 : Nar ve üzüm sularının L-Pro ve L-Arg miktarlarının karşılaştırılması.

Üzüm sularında bulunan L-Pro ve L-Arg miktarları 6 farklı nar meyvesinden sıkılan taze nar suyunun L-Pro ve L-Arg miktarları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 5.7; bu karşılaştırmayı vermektedir. Şekilden görüldüğü gibi üzüm ve nar sularının L-Pro miktarları belirli bir farklılık göstermezken; üzüm sularında L- Arg miktarının nar sularına göre anlamlı miktarda fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre %100 ticari nar sularına üzüm suyu katılması durumunda nar sularının ortalama L-Arg miktarında gözlenebilecek artış ticari nar sularının üzüm suyu ile hilelendirilmesinin bir delili olacaktır.

5.3 Riboflavin Analiz Yöntemi

Bölüm 4.1.2’ de açıklanan ön denemeler sonucu Riboflavin (RF) molekülü için seçilen 30 mM derişimde pH=9,9 olan Na_2HPO_4 ayırma tamponuna enjekte edilen Riboflavin molekülü 4 dakikadan kısa sürede görülmüştür.

0,3 µM Riboflavin standardına ait elektroferogram Şekil 5.8’de verilmiştir.



Şekil 5.8 : 0,3 µM Riboflavin standardına ait elektroferogram.

5.3.1 Metod validasyon sonuçları

Yöntemin doğrusal çalışma aralığını ve kalibrasyon eğrisini tespit etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda riboflavin standart çözeltileri suda çözünerek hazırlanan stok çözeltiden su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Riboflavin için doğrusal kalibrasyon aralığı 0,01-5 µM aralığında tespit edilmiştir. RF molekülüne ait kalibrasyon denklemi y=0,9544x-0,0375 şeklinde olup, kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,999 olarak hesaplanmıştır. Riboflavin için LOD ve LOQ değerleri, güniçi ve günlerarası yapılan tekrarlanırlık çalışmalarına ait % RSD sonuçları Çizelge 5.8'de ; seçilen S4 marka adaçayı numunesine 3 farklı miktarda RF standartı ilave edilerek gerçekleştirilen geri kazanım değerleri Çizelge 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 5.8: Riboflavin için yöntemin tekrarlanırlık, LOD ve LOQ değerleri.

Riboflavin molekülününe ait validasyon sonuçları	
DEĞİŞKEN	**DEĞER**
LOD (ng/mL)	1,08
LOQ (ng/mL)	3,58
% RSD Güniçi tekrarlanırlık için (n=5)	2,48
% RSD Günlerarası tekrarlanırlık için (n=5x3)	4,58

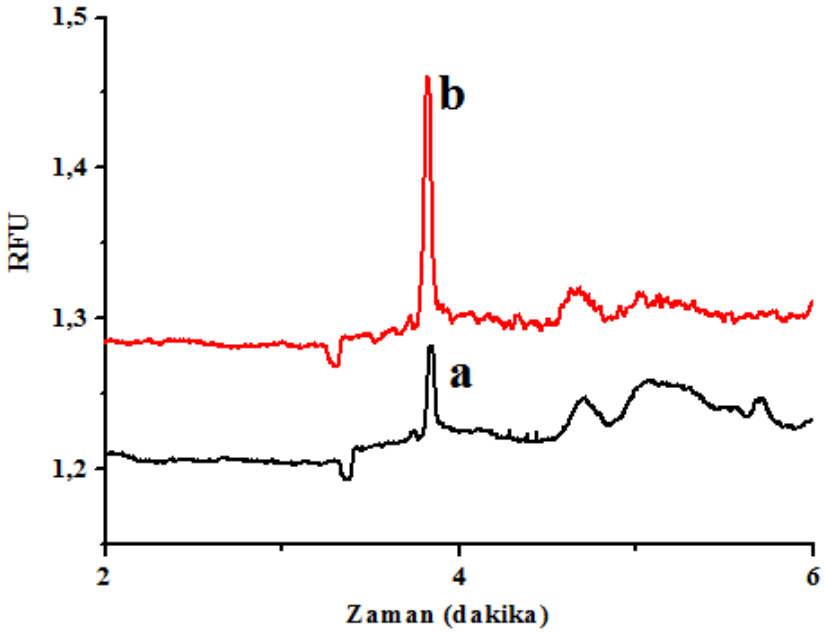
Çizelge 5.9 : Riboflavin çalışmasına ait geri kazanım sonuçları.

	Örnekteki miktar (µM)	Eklenen miktar (µM)	Yüzde geri kazanım
RF	0,247	0,125	99,8 ± 1,7
		0,25	104 ± 1
		0,50	106 ± 2

5.4 Riboflavin Analiz Yönteminin Gıda Örneklerine Uygulaması

Riboflavin analiz yöntemi Bölüm 4.2.1'de kodları verilen 14 adet çay numunesinin riboflavin içeriklerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Çay tüm dünyada çok tüketilen bir gıda türüdür. B2 vitamininin vücuda gıdalarla alınması gerektiğinden; yeşil çay, siyah çayın ve iki önemli bitkisel çay olan adaçayı ve biberiye çayının riboflavin içeriklerinin bu çalışmayla aydınlatılması hedeflenmiştir.

Bölüm 4.2.3' de açıklanan şekilde en uygun ekstraksiyon yöntemi olarak seçilen suda benmari usülü demleme ile elde edilen S1 marka adaçayı numunesi ve bu numune üzerine bilinen miktarda standartın ilavesi sonucu elde edilen örnek bir elektroferogram Şekil 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.9 : **a)** 1/2 oranında seyreltilen S1 marka adaçayı, **b)** 1/2 oranında seyreltilen S1 marka adaçayı üzerine eklenen 0,3 µM RF standartı ile elde edilen elektroferogramlar.

14 farklı çay örneğinin tespit edilen Riboflavin miktarları Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10: Çay numunelerine ait Riboflavin miktarları.

	Riboflavin İçeriği (µg/g)		**Riboflavin İçeriği (µg/g)**
SİYAH ÇAY		**YEŞİL ÇAY**	
B1	3,34 ±0,19	**G1**	3,26 ±0,46
B2	0,58 ±0,16	**G2**	2,83 ±0,10
B3	1,57 ±0,06		
B4	1,07 ±0,05		
ADAÇAYI		**BİBERİYE**	
S1	5,36 ±0,72	**R1**	2,87 ±0,06
S2	5,22 ±0,29	**R2**	0,42 ±0,08
S3	6,18 ±0,31	**R3**	1,72 ±0,35
S4	10,36 ±0,79	**R4**	0,34 ±0,01

5.5 Tartışma ve Yorum

Gerçekleştirilen bu doktora çalışmasında iki farklı kapiler elektroforez analiz yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemlerden ilki kiral amino asitlerin ayrımını hedeflemiştir. Bu çalışmada ilk kez kiral amino asit ayırımında yeni bir yüzey aktif madde, sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS), ayırma ortamı olarak kiral seçici β-siklodekstrin ile birlikte kullanılmıştır. Geliştirilen analiz yöntemi ve uygulaması literatüre iki önemli katkı sağlamıştır.

Bunlardan ilki; kapiler elektroforez çalışmalarında ayırma ortamı olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) genel olarak kullanılan bir yüzey aktiftir. Bu yüzey aktif madde Cifuentes ve grubu tarafından kiral amino asit ayırımlarında kullanılmıştır [2,41,42]. Bu doktora çalışmasında geliştirilen yöntemle ayırma ortamı olarak SDBS kullanıldığında SDS kullanımına göre amino asitlerin tayin sınırı 1,5-2 kat kadar düşürülmüştür. Ayrıca SDS eşliğinde tüm amino asitlerin ayrılması için 30 mM kiral seçici β- siklodekstrin gerekirken, SDBS li ortamda ayırım 10 mM β- siklodekstrin varlığında gerçekleştirilmiştir. Kiral seçimli molekül gereksinimi 1/3 oranında azalmıştır. Genel olarak kiral seçici ajanlar pahalı kimyasallar olduğundan, analiz yöntemi önemli bir ekonomi sağlamaktadır.

Son yıllarda narın tıp alanında kullanımına ait çok sayıda makale yayınlanmaya başlamıştır. Çok yüksek antioksidan gücüne sahip bu meyvenin kalp, Alzheimer

hastalıkları ve özellikle meme ve kolon kanseri başta olmak üzere kansere etkisi üzerine yayınlanan bilimsel çalışmalar bu meyveye olan ilginin artmasına neden olmuştur. Tıbbi çalışmalara paralel olarak farklı bölge narlarının antioksidan aktivitesi, toplam fenolik miktarları, şeker, organik asit ve bazı fenolik bileşiklerinin aydınlatılması konusunda da pek çok bilimsel makale yayınlanmaya başlamıştır. Bu güne kadar pek çok meyve suyunun amino asit ve kiral amino asit profilleri aydınlığa kavuşturulmasına rağmen [2,39,41,42] narın amino asit profili konusunda literatürde bir çalışma bulunmamaktadır . Sadece iki çalışmada spektroskopik yöntemle narın tek bir amino asidinin, prolinin miktarı ölçülmüştür [43,44]. Bu doktora çalışması ile nar suyunun amino asit profili ilk kez literatüre kazandırılmıştır. Nar suyunun çok sayıda amino asit bileşeni içerdiği saptanmıştır. L-Prolin, L-Serin ve L-Alanin amino asitlerinin narda miktarca fazlalığı göze çarpmaktadır. Sulandırılarak konsantreden elde edilen ticari nar sularının sonuçları incelendiğinde ise çoğu amino asit miktarının taze olarak hazırlanan meyve sularından çok daha az olduğu görülmektedir. Buna karşılık doğrudan sıkılarak elde edilen ticari nar suyunda bu farklılık çok azdır. Tüm meyve suları % 100 olmasına rağmen konsantreden elde edilen sularda doğal nar sularında olması gerekenden fazla su ilavesi yapıldığı ve besin değerinin düştüğü gözlenmektedir.

Sağlanan diğer katkı ise; nar meyvesinin üretim alanı sınırlı ve üretim mevsimi kısa olduğundan nar suyu pek çok ülkede diğer meyve sularına göre pahalı bir meyve suyudur. Pahalı meyve sularının ucuz meyve suları ile karıştırılarak hilelendirilmesi önemli bir gıda hilelendirme alanıdır. Nar suyunun hilelendirilmesinde en uygun meyve suları elma ve üzüm sularıdır. Bu çalışmada elma ve üzüm sularının amino asit profilleri nar suyunun amino asit profili ile karşılaştırılarak nar suyunun elma ve üzüm suyu ile hilelendirilmesini teşhis edebilecek iki işaretleyici amino asit bulunmuştur. Elma sularının L-Asn içeriklerinin nar sularının L-Asn içeriklerinden elma cinsine göre 6-12 kez fazla olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan L-Arg miktarının nar suları ve üzüm suları arasında farklı olduğu gözlenmiştir. Taze sıkma nar sularında L-Arg miktarı 80,4-202 mg/L olarak değişirken üzüm sularında 1103-1879 mg/L olarak değişmektedir. Sonuç olarak, elma suyunun asparajin miktarının, üzüm suyunun arjinin miktarının nar suyuna göre anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edilerek ticari nar sularında bu iki amino asidin fazlalılığının hilelendirme için bir delil olabileceği öne sürülmüştür.

Çalışmanın ikinci basamağında önemli bir vitamin olan B2 vitamininin (Riboflavin) gıda örneklerinde analizi için bir yöntem geliştirilmiştir. B2 vitamini gıdalardan vücudumuza alınan bir vitamindir; ancak gıda içeriklerindeki Riboflavin içeriği pek çok analiz yöntemi ile tayin edilemeyecek sınırdadır. Bu çalışmada Riboflavinin doğal floresans özelliğinden ve LIF detektörün gücünden yaralanarak gıda örneklerindeki riboflavin içerklerinin tespiti hedeflenmiştir. Literatürde Riboflavinin kapiler elektroforez yöntemiyle ve normal floresans detektörle analizi rapor edilmiştir [45]. Floresans detektörle tayin sınırları UV detektör kullanımına göre düşürülse bile, detektör duyarlığı birçok gıda maddesi içindeki Riboflavin tayini için yetersizdir. Cataldi ve arkadaşları kapiler elektroforez ve LIF detektör kullanarak riboflavinin tayin sınırını önemli ölçüde düşürmüşlerdir [46]. Ancak grubun çalışmasında kullandığı LIF detektörün ışık kaynağı He-Cd lazerin gürültüsünün yüksek olduğu ve saf standartlarla düşük tayin sınırlarına ulaşılsa bile gerçek örneklerde tayin sınırının saf örneğe göre çok daha yüksek olduğu bilinmektedir.

Bu doktora çalışmasında He-Cd lazerlerinden daha güçlü olan Ar lazer kullanılmıştır. Riboflavin için düşük tayin sınırlarına ulaşılmış ve tekrarlanır analiz sonuçları elde edilmiştir. Örnekler türevlendirme gerektirmeden doğrudan enjekte edildiği ve Riboflavin piki 4 dakika gibi kısa bir sürede görüldüğü için analiz yöntemi kolay ve hızlıdır.

Analiz yönteminin uygulaması bitki çaylarının Riboflavin içeriğinin aydınlatılması alanında yapılmıştır. Bu amaçla siyah ve yeşil çayla, adaçayı ve biberiye için en uygun ekstraksiyon koşulları bulunduktan sonra bu bitki çaylarının Riboflavin içerikleri saptanmıştır. Şimdiye kadar literatürde yeşil çayın Riboflavin içeriğinin rapor edildiği bir çalışmaya rastlanmıştır [33]. Bu çalışmanın sonuçları ile doktora çalışmasında yeşil çay için bulunan sonuçlar uyumludur. Bu doktora çalışması ile ilk kez siyah çay, adaçayı ve biberiye çayının B2 vitamin içerikleri rapor edilmiştir. Farklı tip siyah çaylardan Karadeniz Bölgesi siyah çaylarının Riboflavin içeriğinin diğer karışımlara göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Öte yandan incelen çaylar arasında en yüksek Riboflavin içeriğinin adaçaylarına ait olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak; herhangi bir türevlendirme işlemi gerektirmeden, analizin dört dakika gibi kısa bir sürede başarı ile tamamlandığı analiz yöntemi ile günlük hayatta sıkça tüketilen çayların da iyi birer B2 vitamini kaynağı olduğu ilk kez tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] **Fuchs, S.A., Berger, R., Klomp, L.W.J. & Koning, T.J.** (2005). D-Amino acids in the central nervous system in health and disease, *Molecular Genetics And Metabolism, 85,* 168–180.

[2] **Giuffrida, A., Tabera, L., González, R., Cucinotta, V. & Cifuentes, A.** (2008). Chiral analysis of amino acids from conventional and transgenic yeasts, *Journal of Chromatography B, 875* (1), 243-247.

[3] **Castro-Puyana, M.,Garcia-Canas, V., Carolina, S. & Cifuentes, A.** (2012). Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *Electrophoresis, 33*, 147-167.

[4] **Callejon, R.M., Troncoso, A.M. & Morales, M.L.** (2012). Determination of amino acids in grape-derived products: A review, *Talanta, 81*,1143-1152.

[5] **Yu, Y.P. & Wu, S.H.** (2001). Simultaneous analysis of enantiomeric compositon of amino acid and N-acettyl-amino acids by enantioselevtive chromatography, *Chirality, 13*, 231-235.

[6] **Lammerhofer, M.** (2010). Chiral recognation by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases, *Journal of Chromatography A, 1217* (6), 814-856.

[7] **Tong, M., Payalgala, T., Perera, S., MacDonnel F.M. & Armstrong, D.W.** (2010). Study of a new chiral selector: sodium arsenyl- (L)-(+) tartrate for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A, 1217* (7), 1139-1148.

[8] **Chankvetadze, B.** (2009). Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE, *Electrophoresis, 30*, 211-221.

[9] **Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (**1998). *A Principles of Instrumentation Analysis* (5th ed.) Thomson Learning.

[10] **Url-1 <** *http://tiny.cc/mi36ex*>, erişim tarihi 11.03.2013.

[11] **Url-2** <*http://yunus.hacettepe.edu.tr/~enemutlu/belgeler/CE_seminer.pdf*>, erişim tarihi 11.03.2013.

[12] **Heiger D. (**2000). *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. Germany: Agilent Technologies.

[13] **Url-3** <*http://www.doping.chuv.ch/en/lad-schema-ec-eng.jpg*>, erişim tarihi 11.03.2013.

[14] **Han, F.T., Huynh, B.H., Shi, H.L., Lin, B.B. & Ma, Y**. (1999). Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using Laser-Induced fluorescence detection , *Analytical Chemistry, 71*, 1265-1269.

[15] **Waterval, J.C.M., Lingeman, H., Bult, A. & Underberg, W.J.M.** (2000). Derivatization trendes in capillary electrophoresis, *Electrophoresis, 21*, 4029-4045.

[16] **Lau, S.K., Zaccardo, F., Little, M. & Banks, P**. (1998). Nanomolar derivatization with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A, 809* (1-2), 203-210.

[17] **Pbozy, E., Czarkowska, W. & Trojanowicz, M.** (2006). Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorimetric detection, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 67*, 37-47.

[18] **Kaya, N.** (1993). *Biyokimya*. Atatürk Üniversitesi Yayınları (743). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Basımevi.

[19] **Tüzün, C.** (1992). *Biyokimya*. Ankara: Palme Yayınları.

[20] **Bayülken, S.** (1994). *Bazı Amino Asitlerin Seryum (IV) ile yükseltgenme kinetiği ve mekanizması*. (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[21] **Buxbaum, E.** (2007). *Fundamentals of Protein Structure and Function*. Dominica: Springer.

[22] **Tojo, Y., Hamase, K., Nakata, M., Morikawa, A., Mita, M., Ashida, Y., Lindner, W. & Zaitsu, K.** (2008). Automated and simultaneous two-dimensional micro-high-performanceliquid chromatographic determination of proline and hydroxyproline enantiomers in mammals, *Journal of Chromatography B, 875* (1), 174-179.

[23] **Schieber, A., Brückner, H., Rupp-Classen, M., Specht, W., Nowitzki-Grimm, S. & Classen, H.G.** (1997). Evaluation of D-amino acid levels in rat by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry: no evidence for subacute toxicity of orally fed D-proline and D-aspartic acid, *Journal of Chromatography B, 691*, l-12.

[24] **Morikawa, A., Hamase, K., Inoue, T., Konno, R. & Zaitsu, K.** (2007). Alterations in D-amino acid levels in the brains of mice and rats after the administration of D-amino acids, *Amino Acids*, *32*, 13-20.

[25] **Okay, G. ve Yıldırır,Y.** (2002). *Organik Kimya.* Literatür Yayıncılık, İstanbul.

[26] **Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P.** (2009). *Food Chemistry*. (4th ed., pp. 8-16). Berlin: Springer.

[27] **Keskin, H.** (1987). *Besin Kimyası*. İstanbul: Güryay Matbaacılık.

[28] **Göğüş, F. & Fadıloğlu, S.** (2006). *Food Chemistry*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

[29] **Keha, E. ve Kürefevioğlu, İ**. (1997). *Biyokimya*. Erzurum: Şafak Yayınevi.

[30] **Combs, G.F.** (2008). *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health* (3rd ed., Vol.11, pp. 281-294). Amsterdam: Elsevier Academic Press.

[31] **Scott, K.J. & Bishop, D.R.** (1986).Nutrient content of milk and milk products: vitamins of the B complex and vitamin C in retail market milk and milk products, *Journal of the Society of Dairy Technology, 39*, 32-35.

[32] **Ball, G. F. M.** (2006). *Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability and Stability* (Vol. 8, pp. 168-175). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.

[33] **Hu, L., Yang, X. Wang, C., Yuan & H. Xiao, D.** (2007). Determination of Riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography B, 856* (1), 245-251.

[34] **Food and Nutrition Board** (2000). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline*, Washington, DC: National Academy Press.

[35] **Dutta, P., Gee, M., Rivlin, R.S. & Pinto, J.** (1988). Riboflavin deficieny and glutathione metabolism in rats: Possible mechanisms underlying altered responses to hemolytic stimul, *Journal of Nutrition,118* (9), 1149-1157.

[36] **Ma, L. Y., Wang, H. Y., Xie, H. & Xu, L. X**. (2004). A long lifetime chemical sensor: Study on fluorescence property of fluorescein isothiocyanate and preparation of pH chemical sensor, *Spectrochimica Acta Part A, 60*, 1865–1872.

[37] **Liang, G., Choi, K., Hanj Ahmed, A.Y., ALOthman, Z.A. & Chung, D.S.** (2010). Highly sensitive chiral analysis of amino acids by in-line single drop microextraction and capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta,671*(1), 37-42.

[38] **Dawson, R.M.C., et al**.(1986). *Data for Biochemical Research* (3rd ed., p. 136). New York: Oxford University Press.

[39] **Simo, C., Barbas, C. & Cifuentes A.** (2002). Sensitive micellar electrokinetic chromatography laser-induced fluorescence method to analyze chiral amino acids in orange juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 5288-5293.

[40] **Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J. & 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, 9*, 635–654.

[41] **Carlavilla, D., Moreno-Arribas, M.V., Fanali, S. & Cifuentes, A.** (2006). Chiral MEKC-LIF amino acids in foods: Analysis of vinegar, *Electrophoresis, 27*, 2551-2557.

[42] **Kuneman, D.W., Braddock, J.K., & McChesney, L.L.** (1986). HPLC Profile of Amino Acids in Fruit Juices as Their (1 -Fluoro-2,4-dinitrophenyl-)5 -L-alanine amide Derivatives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36*, 6-9.

[43] **Halilova, H. & Yıldız, N.** (2009). Does climate change have an effect on proline accumulation in pomegranate (Punica granatum L.) fruits? *Scientific Research and Essay*, *12*, 1543–1546.

[44] **Zhang, Y., Krueger, D., Durst, R., Lee, R., Wang, D., Seram, N., et al.** (2009).International multidimensional authenticity specification (Imas) algorithm for detection of commercial pomegranate juice adulteration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,*57*, 2550–2557.

[45] **Zougagh, M. & Ríos, A.** (2008). Supercritical fluid extraction as an on-line clean up technique for determination of riboflavin vitamins in food samples by capillary electrophoresis with fluorimetric detection, *Electrophoresis*,*15*, 3213-3219.

[46] **Cataldi, T.R.I., Nardiello, De Benedetto, G.E. & Bufo, S.A.** (2002). Optimizing separation conditions for riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide in capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography A, 968* (1-2), 229–239.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Filiz TEZCAN TEKELİ

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul 27/08/1982

Adres: T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı İstanbul Laboratuvar Müdürlüğü

E-Posta: f.tezcantekeli@gtb.gov.tr

Lisans: İTÜ Kimya 2006

Yüksek Lisans: İTÜ Kimya 2008

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

2013- ….	T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı İstanbul Gümrük ve Ticaret Laboratuvar Müdürlüğü, Kimyager
2006-2013	İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi
2006	İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Bölüm İkincisi

YAYIN LİSTESİ:

Uzascı, S., Erim, F.B., **Tezcan, F.** (2014). Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by barium ion cross-linked alginate beads, *International Journal of Environmental Science and Technology*, *11* (7),1861-1868.

Evingür, G.A., **Tezcan, F.,** Erim, F.B., Pekcan, Ö. (2012). Monitoring the gelation of polyacrylamide–sodium alginate composite by fluorescence technique, *Phase Transitions: A Multinational Journal, 85* (6), 530-541.

Tezcan, F., Günister, E., Özen, G., Erim, F.B. (2012). Biocomposite films based on alginate and organically modified clay, *International Journal of Biological Macromolecules ,50* , 1165–1168.

Tezcan, F., Kolaylı, S., Sahin, H.,Ulusoy, E., Erim, F.B. (2011). Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys, *Journal of Food and Nutrition Research, 50,* 33-40.

Kolayli, S., Kara, M., **Tezcan, F.**, Erim, F.B., Sahin, H., Ulusoy, E., Aliyazicioglu, R. (2010).Comparative Study of Chemical and Biochemical Properties of Different Melon Cultivars: Standard, Hybrid, and Grafted Melons, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58,* 9764–9769.

Baskan, S., **Tezcan F.**, S.,Kose, 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*(13), 2174-2179.

Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M.,Diken, T., Özçelik, B., Erim, F.B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices , *Food Chemistry, 115,* 873-877.

Tezcan, F., *Erim, F.B* (2008). On-line Stacking Techniques for for the Nonaqueous Capillary Electrophoretic Determination of acrylamide in Processed Food, *Analytica Chimica Acta, 617,* 196-199.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

Tezcan, F., Uzaşçı, S., Uyar, G., Öztekin, N., Erim, F.B. (2013). Determination of amino acids in pomegranate juices and fingerprint for adulteration with apple juices, *Food Chemistry, **141*** (2), 1187-1191.

Tezcan, F., Erim, F.B. Quantification of vitamin b2 in black, green, sage, and rosemary tea infusions by capillary electrophoresis with laser-ınduced fluorescence detection, *Journal of Food Composition and Analysis* dergisinde değerlendirmede.

Tezcan, F., Uzaşçı, S., Uyar, G., Kaygusuz, H., Erim, F.B. Comparison of proline and arginine contents of pomegranate and grape juices for the detection of juice adulteration, *International Journal of Food Properties* dergisinde değerlendirmede.

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

Tezcan, F., Dedetaş, N., Bedia Erim, F. (2013): A rapid capillary electrophoretic-LIF analysis in daily beverages for the food additive E101. *ITP 2013 - 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques,* October 6-9, 2013 Tenerife, Canary Islands , Spain.

Tezcan, F., Erim, F.B. (2013): Beneficial Effect of Popular Tea Samples Such as Black-Green-Rosemary-Sage in Terms of Their Antioxidant Profile. *6BBCAC, 6th Black Sea Basın Conference on Analytical Chemistry,* September 10-14, 2013, Trabzon,Turkey.

Tezcan, F., Erim, F.B. (2012): CE-LIF Analysis Of Riboflavin (Vitamin B2) in Popular Beverages: Black, Green, Sage And Rosemary Teas, *USA ITP 2012—19th International Symposium, Exhibit & Workshops On Electro- And Liquid Phase-Separation Techniques,* September 30 – October 3, 2012, Baltimore Inner Harbor, Maryland, USA**.**

Tezcan, F., Turgut, K., Erim, F.B. (2012): Supplemental Vitamin B2 Analysis Using CE-LIF Technique, *International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS 10th)***,** 26-29 June, 2012, Ankara,Turkey.

Tezcan, F., Çorbacıoğlu, E., Erim, F.B. (2012) : Kapiler Elektroforez-Lazer İndüklenmiş Floresans Tekniği İle Ticari Hayvan Serumlarinda L-Lizin Analizi, *VI.Ulusal Analitik Kimya Konferansı,* 3-7 Eylül, 2012, Hatay,Türkiye.