

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONO VE DİSAKKARİDLERİN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ASLI GÜREL**

**Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Kimyagerlik**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER

HAZİRAN 2005

**MONO VE DİSAKKARİDLERİN KAPİLER
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI GÜREL

Öğrenci No: 509031200

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 9 Mayıs 2005

Tezin Savunulduğu Tarih : 2 Haziran 2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER
Diğer Jüri Üyeleri Prof. Dr. İpek BECERİK (İ.T.Ü.)

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN (İ.Ü.)

HAZİRAN 2005

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, uygulama ve değerlendirmeler süresince her an yakın ilgi ve desteğini gördüğüm sevgili hocam Prof. Dr. F. Bedia Erim Berker'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca bana duymuş oldukları sonsuz güven; vermiş oldukları büyük destek ve sevgi, göstermiş oldukları özveri için biricik annem Birsen Gürel ve biricik babam Mustafa Gürel'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın en yoğun dönemlerinde göstermiş olduğu sabır, destek ve yardımları için müstakbel eşim Özgür Öktem'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İ.T.Ü. araştırma fonunun 31200 ve 30518 numaralı proje desteği ile tamamlanmıştır. Bu destekten dolayı teşekkür ederim.

Mayıs, 2005

Aslı GÜREL

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. Kapiler Elektroforez	3
2.1. Cihaz Bölümleri	3
2.1.1. Elektrotlar	4
2.1.2. Voltaj Kaynağı	4
2.1.3. Örnek İnjesiyonu	4
2.1.4. Örnek Dedeksiyonu	6
2.2. Çalışma Prensibi	6
2.3. Mobilite ve Mobiliteye Etki Eden Faktörler	8
2.3.1. Mobilite	8
2.3.2. İyonik Şiddet	10
2.3.3. pH	11
2.3.4. Tampon Katkı Maddeleri	11
2.3.5. Sıcaklık	11
2.3.6. Voltaj	12
2.4. Ayrımda Etkin Olan Faktörler	12
2.4.1. Geliş Süresi	12
2.4.2. Teorik Plaka Sayısı ve Rezolüsyon	12
2.4.3. Pik Genişlemesi	12
2.5. CE Teknikleri ve Kapiler Zone Elektroforez	13
3. Karbohidratlar	15
3.1. Karbohidratların Sınıflandırılmaları	16
3.1.1. Monosakkaritler	16
3.1.2. Monosakkaritlerin Doğada Bulunuşu	21
3.1.3. Disakkaritler	23
3.1.4. Polisakkaritler	25

3.2. Karbohidratların CE ile Analizi	26
3.2.1. CZE’de Türevlendirilmemiş Karbohidratların Tayini	26
3.2.2. Karbohidratların Türevlendirilmeden İndirek Fotomerik veya Elektrokimyasal Dedeksiyon ile CZE’de Tayini	26
3.2.2.1. İndirek UV Fotometri ile Karbohidratların CZE’de Tayini	27
3.2.2.2. Elektrokimyasal Dedeksiyon ile CZE’de Karbohidratların Tayini	27
3.2.3. Türevlendirilmiş Karbohidratların CZE ile Tayini	27
4. DENEYSEL BÖLÜM	28
4.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	28
4.2. Kimyasal Maddeler	28
4.3. Elektroforetik Koşullar	28
4.4. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması	29
5. SONUÇLAR	30
5.1. Mono ve Disakkaridlerin Ayrılmasına Ait Çalışmalar	30
5.2. Tekrarlanırlık ve Dedeksiyon Limitleri	34
5.3. Yöntemin Meyve Suyu Örneklerinde Karbohidrat Analizine Uygulanması	36
5.4. Sonuç	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	42

KISALTMALAR

CE	: Kapiler Elektroforez
GC	: Gaz Kromatografi
HPLC	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
ATP	: Adenintrifosfat
LIF	: Lazer Floresans
EOA	: Elektroosmatik Akış
EOM	: Elektroosmatik Mobilite
EPM	: Elektroforetik Mobilite
CZE	: Kapiler Zone Elektroforez
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi
CGE	: Kapiler Jel Elektroforez
CITP	: Kapiler İzotakforez
CIEF	: Kapiler İzoelektrik Odaklama
CEC	: Kapiler Elektrokromatografi
EKC	: Elektrokinetik Kromatografi
RSD	: Relative Standart Sapma
LOD	: Dedeksiyon Limiti

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. CE’de kullanılan dedeksiyon çeşitleri.....	6
Tablo 3.1. Biyolojik sistemlerde bulunan ve çalışmalarda kullanılan monosakkaritler	22
Tablo 3.2. Çalışmalarda kullanılan fruktozun biyolojik sistemlerde bulunuşu....	23
Tablo 3.3. Ksilitol ve mannitolün biyolojik sistemlerde bulunuşu	23
Tablo 3.4. Biyolojik sistemlerde sellibioz, maltoz,sakkaroz ve laktozun bulunuşu..	25
Tablo 5.1. Çalışılan amino asitler ve pK değerleri.....	30
Tablo 5.2. Karbohidratların geliş süreleri ve elektroforetik mobiliteleri	31
Tablo 5.3. CZE ile karbohidrat analizine ait RSD değerleri	33
Tablo 5.4. CZE ile karbohidrat analizine ait LOD değerleri.....	34

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : CE'in şematik gösterimi	3
Şekil 2.2 : Silika kapiler kolonun genel yapısı	7
Şekil 2.3 : Silika yapısındaki H ⁺ gruplarının disosiyasyonu.....	7
Şekil 2.4 : Kapiler kolon içerisinde oluşan + yük yoğunluğu	7
Şekil 2.5 : Kapiler içerisinde gerçekleşen akışların vektörel gösterimi.....	8
Şekil 2.6 : CZE'in şematik gösterimi	14
Şekil 3.1 : Monoaldozların yapıları	17
Şekil 3.2 : Doğada oluşan deoksialdozlar.....	18
Şekil 3.3 : Monoketozların yapısı.....	19
Şekil 3.4a : Doğal monosakkaritler ve türevleri.....	20
Şekil 3.4b : Doğal monosakkaritler ve türevleri.....	21
Şekil 3.5 : Sukrozun üç boyutlu yapısı.....	24
Şekil 5.1 : Karışım I. 10 karbohidrat karışımının elektroferogramı	32
Şekil 5.2 : Karışım II. 9 karbohidrat karışımının elektroferogramı.....	32
Şekil 5.3 : Karışım III.10 karbohidrat karışımının elektroferogramı.....	33
Şekil 5.4 : Kalibrasyon eğrileri.....	35
Şekil 5.5 : Vişne suyu örneği elektroferogramı.....	36
Şekil 5.6 : Portakal suyu örneği elektroferogramı.....	36

SEMBOL LİSTESİ

E	: Elektrik alan büyüklüğü
f, f_s	: Elektrik alan kuvveti, sürtünme kuvveti
H	: Örnek hacmi
I_{inj}	: İnjekte edilen örnek zonun boyu
L, L_d	: Kapilerin toplam ve dedektöre olan uzunluğu
PH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun logaritmik ifadesi
P	: Basınç
ΔP	: Basınç farkı
r, r_a	: Kapilerin ve a partikülünün çapı
Rez	: Rezolüsyon
v_a, v₀	: a partikülünün, EOM'nin hızı
V	: Voltaj
z_i	: İyon yükü
η	: Çözelti viskozitesi
μ₀, μ_e, μ_g	: Elektroosmotik, etkin ve görünen mobiliteler
π	: Pi sabit sayısı
σ	: Standart sapma
σ²	: Varyans
w₁, w₂	: Birinci ve ikinci pikin pik genişlikleri
ζ	: Zeta potansiyeli

MONO VE DİSAKKARİDLERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

ÖZET

Karbohidratlar miktarları bakımından dünyadaki en yaygın organik bileşiklerdir, bitki hayvan ve mikroorganizmaların yaşam aktivitelerinin her birine dahil olmuşlardır. Ayrıca karbohidratlar en önemli besin bileşimi olup, insan giyimi, kağıt ve birçok biyoteknolojik ürünlerin (bira ve antibiyotik gibi) hammaddesidir. Karbohidratlar kimyasal yapıları itibarı ile üç ana bölüme ayrılırlar; monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler. Mono ve disakkaritler birçok yiyecek ve içecekte yaygın olarak bulunmakta ve gıda ilave maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Beslenme, biyoloji ve gıda bilimleri açısından gıda örneklerindeki şeker içeriklerinin izlenmesi önemlidir.

Son yıllarda kapiler elektroforezin (CE) şeker analizlerine uygulandığı görülmektedir. Kapiler elektroforetik yöntemlerin klasik kromatografik yöntemlere göre avantajı reaktif tüketiminde, örnek hazırlama ve analiz süresinde belirgin azalmadır. CE yüksek ayırma gücü nedeniyle özellikle kompleks yapıda gıda matrisleri için uygun bir yöntemdir. Ancak CE'nin karbohidrat analizlerine uygulanmasında iki konuda sınırlama vardır. Bunlardan biri, karbohidratların UV dedeksiyonu için gereken kromofor ya da florofor gruplarının olmayışı, diğeri ise karbohidratların büyük çoğunluğunun yüksüz olmasıdır.

Bu çalışmada karbohidratların vücut kimyası içinde amino asitlerle ve proteinlerle yakın ilişkisine dayanarak, amino asitler sakkaritler için ayırma ortamı olarak kullanılmıştır. Bu yolla sakkaridlere yük kazandırılmış ve aralarında mobilite farkı yaratılarak ayrılımları ve indirekt UV ile tayinleri sağlanmıştır. Geliştirilen analiz yöntemi meyve sularında glikoz, fruktoz ve sukroz tayinlerine uygulanmıştır.

DETERMINATION OF MONO AND DISACCHARIDES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

Carbohydrates are, in terms of their quantity, the largest group of organic compounds on the earth and are implicated in every form of living activity in plants, animals and microorganisms. They are one of the most important food constituents, the raw materials for human clothing, and the rawmaterial for paper and for many biotechnological processes, such as the production of beer and antibiotics. Carbohydrates are classified according to their chemical structure into three main groups of compounds namely monosaccharides, oligosaccharides and polysaccharides. Mono and disaccharides such as glucose, fructose and sucrose are widely distrubuted in various food and beverage, while these compounds are often used as food additives. Therefore monitoring of sugars in food samples is essential and important in the fiels of nutrition, biology and food science.

More recently, capillary elektrophoresis (CE) has been employed for the sugar analysis. The advantage of the capillary electrophoretic methods is the considerable diminuation in the sample preparation and analysis times, as well as in the reagent consumption. CE is particularly suitable in the analysis of complex natural matrices, owing to its higher resolving power. However, the application of CE to carbohydrate analysis is somewhat limited. The first problem is the lack of chromophores or fluorophores in carbohydrates for ultraviolet (UV) dedection. Another problem with carbohydrate analysis by CE is that the majority of carbohydrates have no charge.

Based on the biochemical studies on the interaction between carbohydrates and aminoacids or proteins in body, it was developed a new capillary electrophoretic method using amino acids as the seperation medium for carbohydrates. By this way, both the separation and indirect detection of carbohydrates are achieved. The metod was applied to the determination of sugar content, mainly glucose, fructose, and sucrose in fruit juices.

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez (CE), temeli klasik elektroforeze, cihaz dizaynı gelişmiş sıvı ve gaz kromatografi sistemlerine dayanan, ayırmanın çok yüksek voltaj altında ve kapiler silika kolonlarda gerçekleştirildiği yeni bir analitik ayırma tekniğidir.

Kapiler Elektroforez, üç ayırım yönteminin birleşiminden geliştirilmiş bir tekniktir. Bunlar; Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performans Likit Kromatografisi (HPLC), ve Jel Elektroforezidir. Dedeksiyonun analiz sırasında yapılabilmesi, birçok farklı dedeksiyon tekniklerinin kullanımına olanak sağlaması, yüksek ayırım verimi (10^5 - 10^6 teorik plaka sayısı) elde ediliyor olması, nicel ve nitel analize olanak sağlaması, kolay metod oluşturulabilir olması, çok az madde tüketimi ve ekonomik kapiler kolonlarla Li iyonundan DNA' ya kadar çok geniş bir spektruma uygulanabilir olması, CE tekniğinin avantajlarıdır. Teknik; teori, uygulama ve alet gelişimi konusunda senede yayınlanan ortalama 1500 bilimsel makale ile çok hızlı olarak gelişmekte olup ilaç, gıda, ve adli bilimler alanlarında yöntemle geliştirilen analizler standart metot olarak kabul edilmeye başlanmıştır.

Karbohidratların CE ile ayrılması çalışmaları son yıllarda yaygınlaşmıştır[1]. Karbohidratlar yüksüz olduklarından kapiler elektroforetik bir ayırmada yük kazandırılmaları gerekir. Bu amaçla borat kompleksleştirilmesi yapılarak şekerlerin CE ile ayrılması sağlanmıştır[2]. Karbohidratlar UV aktif olmadıklarından CE ayrılması sonucu tayinleri indirekt dedeksiyonla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, indirekt floresan[3], indirekt UV dedeksiyon[4], amperometrik dedeksiyon[5] gibi dedeksiyon yöntemleri kapiler elektroforetik ayırmalara uygulanmıştır. Bir diğer yol ise ön-türevlendirme yöntemidir[6]. Ancak bu yöntem analiz süresini uzatmaktadır.

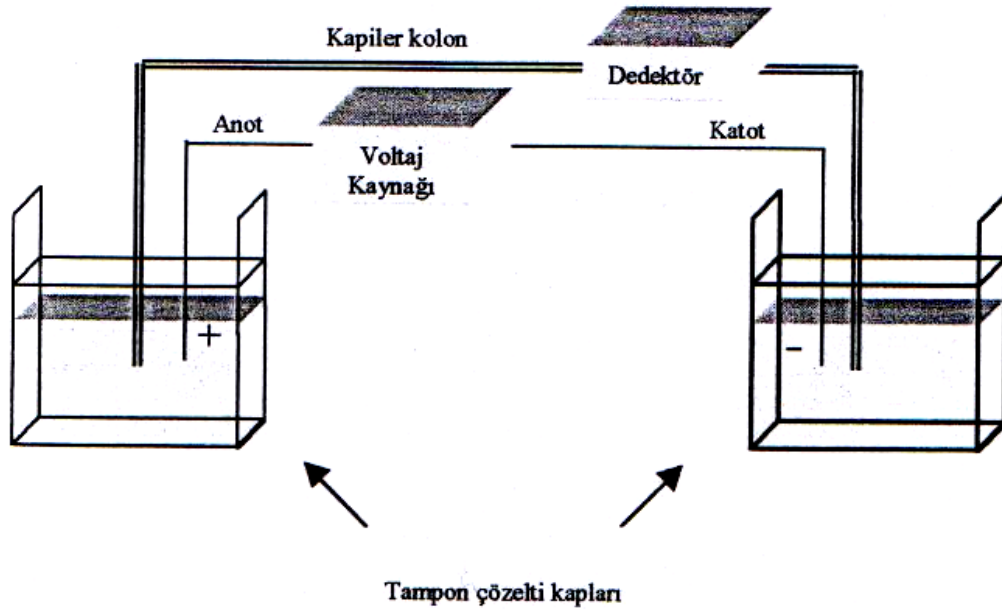
Bu çalışmada, mono ve disakkaridlerin kapiler elektroforez ile kalitatif ve kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Mono ve disakkaridler pekçok yiyecek ve içecekte yaygın

olarak bulunur veya ilave maddesi olarak kullanılmaktadır. Hemen bütün şekerli gıda ürünlerinde glikoz, fruktoz ve sakkaroz başta olmak üzere farklı sakkarid türleri kullanılmaktadır. Gıda içeriklerinde bu maddelerin analizi kalite kontrolü ile ilgilidir. Bu nedenle hızlı, güvenilir, ekonomik yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Son yıllarda karbohidrat analizlerinde yeni CE yöntemlerinin geliştirildiği görülmektedir. Ancak monosakkaritlerin UV aktif olmaması nedeniyle, ön türevlendirme yöntemi yada elektrokimyasal dedeksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Ayrıca yapıları birbirine yakın çok sayıda karbohidratı bir arada ayırmak oldukça güçtür. Vücutta karbohidratlarla proteinlerin yakın biokimyasal ilişkileri bazından yola çıkarak bu çalışmadaki ayırma ortamına ilave edilen aminoasitle monosakkaritlerin farklı kimyasal ilgiye girmeleri sonucu yapısı birbirine yakın karbohidratlara farklı mobiliteler kazandırılarak kapiler elektroforetik ayrımları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca UV aktif aminoasit kullanımı ile indirekt dedeksiyon imkanı sağlanmıştır. Geliştirilen analiz yöntemi, meyve sularında glikoz, fruktoz ve sukroz tayinlerine uygulanmıştır.

2. Kapiler Elektroforez

Kapiler elektroforez(CE), bir elektrik alan varlığında, yüklü türlerin göç etmesine dayalı bir analiz tekniği olan elektroforez ile kromatografinin bileşimi olan bir tekniktir. CE’de birçok farklı dedeksiyon tekniği kullanılır ve dedeksiyon analiz anında yapılır. Analizler 25-100 μm iç çapa sahip kapiler kullanılarak gerçekleştirilir. Örnek hacmi injeksiyonda örnek hacmi nanolitre mertebesinde kullanılır. Ayırım verimi yüksektir, nicel ve nitel analiz yapılabilir. Kolay metot oluşturulabilir. Tekrarlanabilirliği fazla, yüksek seçiciliğe sahip bir çok türü vardır[7]. Bu avantajları sayesinde CE, günümüzde yaygın olarak kullanılır ve teknolojisini hızla ve sürekli ileriye taşıyan bir analiz yöntemi halini almıştır. Çıral ayrımlar üzerindeki başarılı çalışmalar ile son zamanlarda ilaç sanayisinde ve genom araştırmalarda önde gelen bir analitik cihaz olarak kullanılmaktadır.

2.1. Cihaz Bölümleri



Şekil 2.1 : CE’in şematik gösterimi[7]

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi; CE cihazı ± 30 kV’luk voltaj uygulayabilen bir yüksek voltaj kaynağı, bu kaynağa bağlı iki platin elektrot, bu elektrotlarla temasta bulunan elektrolit çözelti kapları, bu çözeltilere batırılmış ve bir dedektör içerisinde geçen kapiler kolon ve analiz sonuçlarının toplandığı bir bilgisayardan oluşmaktadır[7,8].

2.1.1. Elektrotlar

CE’de kullanılan elektrotlar platin elektrotlardır. Elektrotlardaki reaksiyonlar genellikle suyun ayrışması ile olur. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile (2.2) ve (2.3) eşitliklerindeki gibidir[9].



2.1.2. Voltaj Kaynağı

CE için yüksek voltaj kaynağı çok önemlidir çünkü uygulanan voltaj ile CE’de elde edilen ayırım verimi doğrudan ilişkilidir.

CE’de bir iyonun mobilitesi, uygulanan voltaja ve bu voltaj sonucu oluşan elektrik alan kuvvetine bağlıdır. Kapiler kolonun etki kesiti ve içerisindeki çözelti karışımı L uzunluğu boyunca homojen olduğunda elektrik alan her yerde aynıdır ve uygulanan voltaja bağlı olarak (2.1) eşitliği ile hesaplanır[10,11].

$$E = \frac{V}{L} \quad (2.3)$$

Genellikle CE’de uygulanan elektrik alan 200-600 V/cm’dir.

2.1.3. Örnek İnjesiyonu

CE’de örnek injesiyonunu yapmak için iki farklı teknikten yararlanılır[12]. Bunlar, hidrodinamik injesiyon ve elektrokinetik injesiyondur.

Hidrodinamik injeksiyon tekniğinin temeli , kapiler kolonun iki ucu arasında kendiliğinden oluşturulan basınç farkına dayanır. Böylece örneğin kolona akışı sağlanmış olur. Basınç farkı da, örnek kabına basınç uygulayarak, tampon kabına vakum uygulayarak ya da örnek ve tampon kabı seviyeleri farklılaştırılarak yaratılır.

Kapiler kolona injekte edilen örnek zonun uzunluğu ve örnek hacmi sırası ile (2.4), (2.5) eşitlikleri ile hesaplanır.

$$I_{inj} = (3.5 \times 10^6) \cdot \frac{r^2}{L} \cdot P \cdot t_{inj} \quad (2.4)$$

$$H = \frac{\Delta P \cdot r^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad (2.5)$$

3.5×10^6 : 25 °C’de su için hesaplanmış sabit

H : Örnek hacmi

L : Kapilerin Tüm uzunluğu

t_{inj} : İnjesiyon süresi

P : Basınç

ΔP : Basınç farkı

r : Kapilerin iç çapı

η : Tampon çözelti viskozitesi

Elektrokinetik injeksiyonda, kapiler örnek kabının içerisindeyken kısa bir süre voltaj uygulanarak örnek kapiler içerisine çekilir. Uygulanan voltaj gerçek ayırm sırasında uygulanan voltajdan daha düşüktür. Örnek kapilere osmos ve elektroforezin etkisi ile girmektedir.

2.1.4. Örnek Dedeksiyonu

Tablo 2.1’de CE’de yaygın olarak kullanılan dedeksiyon teknikleri ve duyarlılıkları gösterilmiştir[11].

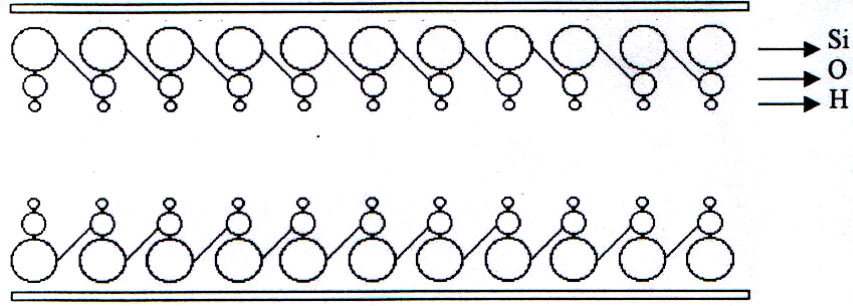
Tablo 2.1: CE’de kullanılan dedeksiyon çeşitleri

Teknik	Duyarlılık(M)
UV Absorbsiyon Dedeksiyonu	10^{-6} - 10^{-4}
Floresans Dedeksiyonu	10^{-12} - 10^{-5}
LIF Dedeksiyonu	10^{-9} - 10^{-7}
Elektrokimyasal Dedeksiyon	10^{-8} - 10^{-6}
Dolaylı Dedeksiyon	10^{-7} - 10^{-5}
Radyoizotop Dedeksiyonu	10^{-9} - 10^{-7}
Kütle Spektrometre Dedeksiyonu	10^{-9} - 10^{-5}

Dolaylı dedeksiyon, CE’de kullanılan dedeksiyon teknikleri ile doğrudan tespit edilemeyen türler için kullanılan bir yöntemdir. Bu dedeksiyon türü UV absorpsiyon ya da floresans dedektörü kullanılan herhangi bir CE cihazında uygulanabilir.. Çalışma elektrolitine bir kromofor madde ilave edilerek dolaylı olarak analitlerin, UV’de ya da floresans dedektörde gözlenmesi sağlanır. Bu sayede dedeksiyon sırasında, kromofor-analit yer değiştirir ve analitler, elektroferogramlarda negatif pikler şeklinde gözlenir. Dikkat edilmesi gereken kromofor ve analit konsantrasyonlarının birbirine oldukça yakın seçilmesidir böylece pik şekilleri simetrik çıkar[11].

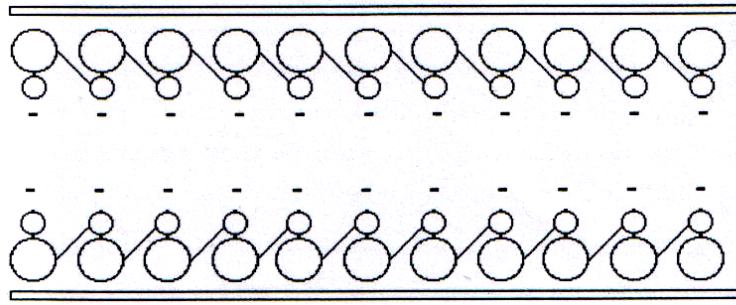
2.2. Çalışma Prensipleri

Çalışma sırasında kapiler kolon içerisinden önce elektrolit çözelti geçirilir. Sonra, tampon kabı ile örnek kabının yer değiştirir ve örnek injeksiyonu yapılır. Uygulanan voltaj varlığında oluşan elektrik alanda örnek içerisindeki her bir tür yük/büyükölük oranlarındaki farklılığa göre farklı zamanlarda dedektöre ulaşır. Böylece ayırım gerçekleşmiş olur. Ayırımın gerçekleştiği silika kapiler kolonun yapısı şekil 2.2’deki gibidir.



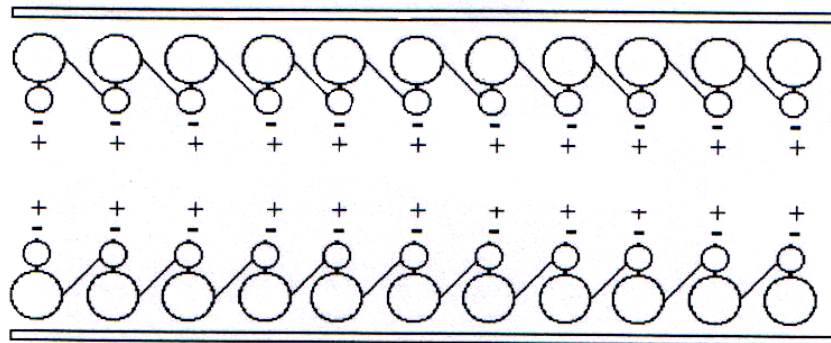
Şekil 2.2 : Silika kapiler kolonun genel yapısı[7]

Silika kapiler, çalışmaya başlamadan önce kuvvetli bir alkali çözelti ile aktive edilir. Bu işlemin sonucunda; SiOH yapısındaki H^+ grupları disosiyasyon olur ve kapiler kolonun iç yüzeyi elektriksel olarak (-) yüklenir. Şekil 2.3’de SiO^- gruplarının kapilerin iç yüzeyinde oluşturduğu (-) yüklenme görülmektedir.



Şekil 2.3 : Silika yapısındaki H^+ gruplarının disosiyasyonu[7]

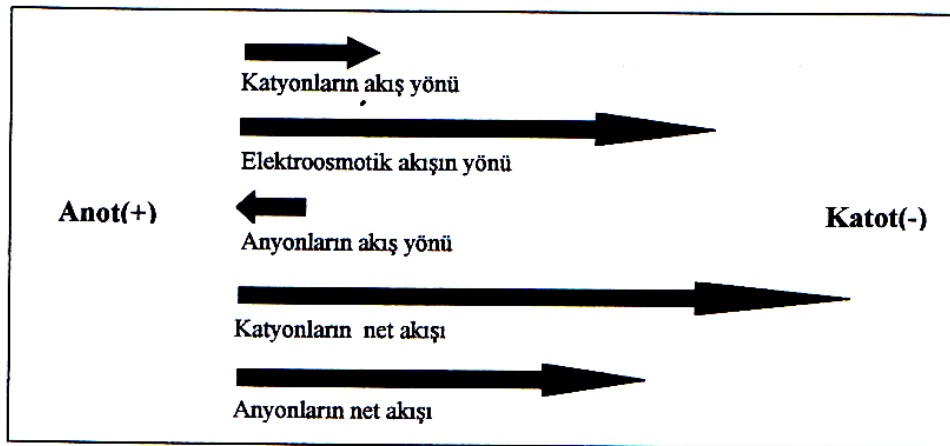
Elektrolit çözeltinin kapiler kolondan geçirilir. Elektrolit çözeltinin (+) yükleri ile SiO^- grupları arasındaki elektrostatik etkileşim olur. Bunun sonucunda kapilerin iç yüzeyinde (+) yük yoğunluğu oluşturulmuş olur(Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Kapiler kolon içerisinde oluşan + yük yoğunluğu[7]

Bu yüklenmeler sonucu kapiler duvarında bir potansiyel fark oluşur. Bu potansiyel farkına, zeta potansiyeli adı verilir ve ζ sembolü ile gösterilir[11].

Örnek injeksiyonu ve voltaj uygulaması sonucu oluşan (+) yük yoğunluğu, katoda doğru yönelir. Kapiler kolon içerisinde anottan katoda doğru kendiliğinden bir akış meydana gelir. Bu akışa elektroosmotik akış (EOA) adı verilir ve bu akış elektroosmotik mobilité (EOM) ile belirlenir. Her tür, yükü ne olursa olsun bu akışla katoda doğru hareketlenir. Türlerin hızı, yük /büyüklük oranına göre değişir. Küçük ve yükü fazla olan türler, büyük ve daha az yüklü türlere oranla yönlendikleri elektroda doğru büyük bir elektroforetik mobilité kazanırlar. Buna rağmen, elektroosmotik akış hızına karşı koymak mümkün değildir. Anyon, katyon ve nötral maddelerin hepsi katoda doğru fakat farklı mobilitelere sahip olarak hareket ederler(Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : Kapiler içerisinde gerçekleşen akışların vektörel gösterimi [7]

2.3.Mobilité ve Mobilitéye Etki Eden Faktörler

2.3.1. Mobilité

Yükü q olan bir a maddesinin üzerinde oluşan elektrostatik kuvvet, o maddenin yükü ve oluşan elektrik alanın gücü ile doğru orantılıdır(2.6), [9].

$$f = q_a \times E \quad (2.6)$$

f: Elektrik alan kuvveti

E: Elektrik alan büyüklüğü

q_a : a maddesinin yükü

Kapiler içerisinde bulunan elektrolit çözeltinin viskozitesinden kaynaklanan ters yönde bir kuvvet olan sürtünme kuvveti, a partikülünün hızı ile doğru orantılıdır(2.7).

$$f_s = -6\pi \times \eta \times r_a \times v_a \quad (2.7)$$

f_s : Sürtünme kuvveti

η : Çözelti viskozitesi

r_a : a partikülünün çapı

v_a : a partikülünün hızı

Bu iki kuvvet voltaj uygulandığında birbirine eşit hale gelir ve a partikülü sabit bir hızla hareket etmeye başlar(2.8).

$$v_a = \frac{q_a \times E}{6\pi \times \eta \times r_a} \quad (2.8)$$

Burada v_a / E oranı elektrofoetik mobilité olarak tanımlanır(2.9).

$$\mu_a = \frac{v_a}{E} \quad (2.9)$$

Bir a partikülünün mobilitesi 2.10 eşitliği kullanılarak hesaplanır.

$$\mu_a = \frac{q_a}{6\pi \times \eta \times r_a} \quad (2.10)$$

Mobilitenin birimi $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ dir. İyonik türlerin tümüyle iyonik halde ve sonsuz seyreltilikte sahip oldukları büyüklüğe elektroforetik mobilité denir. Gerçek koşullarda bu değer etkin elektroforetik mobilité, μ_e olarak isimlendirilir. μ_e ortam pH' sına ve tampon bileşimine bağlıdır. Görünen mobilité bir iyonun kapiler kolondaki geliş süresini belirler ve türlerin etkin elektroforetik mobiliteleri ile kapiler içindeki elektroosmatik mobilité hesaba katılarak (2.11) eşitliğince hesaplanır[7].

$$\mu_g = \mu_o \pm \mu_e \quad (2.11)$$

Geliş süresine bağlı olarak EOM ve EPM'ler (2.12) ve (2.13) eşitliklerindeki gibi hesaplanır.

$$\mu_o = \frac{L \times L_d}{V \times t_o} \quad (2.12)$$

$$\mu_e = \frac{L \times L_d}{V \times (t - t_o)} \quad (2.13)$$

μ_o : Elektroosmatik mobilite

L : Kapilerin toplam uzunluğu

L_d : Kapilerin dedektöre olan uzunluğu

V : Voltaj

t_o : Nötral maddenin geliş zamanı

t : Maddenin geliş zamanı

Taneciklerin hareket hızları 2.14, 2.15, 2.16 denklemleri ile gösterilebilir[8].

$$\text{Pozitif İyonlar İçin} : v_i = (\mu_o + \mu_i) \times E \quad (2.14)$$

$$\text{Negatif İyonlar İçin} : v_i = (\mu_o - \mu_i) \times E \quad (2.15)$$

$$\text{Nötral Partiküller için} : v_i = \mu_o \times E \quad (2.16)$$

2.3.2. İyonik Şiddet

Ayrımın gerçekleşeceği ortamın iyonik şiddeti ile hem elektroforetik hem de elektroosmotik mobilite arasında ters orantı vardır[9].

İyonun yükü ve konsantrasyonu ile bir çözeltinin iyonik şiddeti doğru orantılı olarak artar(2.17).

$$I_{iyon} = \sum z_i^2 C_i \quad (2.17)$$

I_{iyon} : İyonik şiddet

z_i : İyon yükü

C_i : İyon konsantrasyonu

Tamponun iyonik şiddetinin artırılması ile zeta potansiyeli düşer ve bu düşüş EOF'da düşürür. Tampon konsantrasyonunun artması ile akım artar ve joule ısı oluşur bu bir dezavantajdır. İyonik şiddetin çok azaltılması ise duvar adsorbsiyonunun artmasına neden olur. Ayrıca tampon iletkenliğinin örnek iletkenliğine yakın olması gerekir aksi takdirde pik şekillerinde bozulma görülür.

2.3.3. pH

Zayıf asit ve zayıf baz özelliği gösteren maddelerin elektroforetik mobiliteleri ortam pH'sına bağlıdır. Elektrik alan sadece yüklü türler üzerine kuvvet uygulandığından etkin mobiliteler şu şekilde ifade edilir:

$$\mu_e = \alpha \cdot \mu \quad (2.18)$$

μ_e : Etkin mobiliteler

α : Asidin disosiyasyon derecesi

μ : Anyonun mobilitesi

Elektroosmotik mobiliteleri en çok etkileyen faktör, ortam pH'sının değişmesidir. Ortam pH'sı arttıkça silanol grupları iyonize olur ve kapiler yüzeyinde yük artar ve EOF artar. Duvar iyonizasyonu artacağından EOM hızlanır. Ancak bu değişim ayrılacak maddelerin yük yapısını değiştirebilir. Tampon pH'ı, kapiler içindeki elektroosmotik akışın hızını etkileyen en önemli parametredir[8].

2.3.4. Tampon Katkı Maddeleri

Elektrolit çözeltiye ilave edilen katkı maddeleri ayrılacak türlere elektrostatik, hidrofobik, dipol-dipol vb. etkileşimlerde bulunarak türlerin etkin mobilitelerini değiştirebilir. Katkı maddesi ile ortamdaki maddelerin etkileşim derecesinin farklılığı, her türün farklı mobilitelere sahip olmasına neden olur[13-14].

2.3.5. Sıcaklık

Sıcaklığın artırılması, her 1 °C için % 2-3 oranında viskozitenin azalmasına sebep olur. Bu da EOF'u artırır.

2.3.6. Voltaj

Voltaj arttırıldığında oluşan elektrik alan da artacağından kapiler içerisindeki elektrosmotik akış hızlanacaktır.

2.4. Ayrımda Etkin Olan Faktörler

2.4.1. Geliş Süresi

(2.12) ve (2.13) eşitlikleri analitlerin geliş zamanlarının, EOM, kapiler boyu ve uygulanan voltaja bağlı olarak ne şekilde değiştiği görülmektedir. Ayrımda etkin olan ilk faktör, yüklü türlerin birbirinden farklı olarak kazandıkları elektroforetik mobiliteler sonucu gözlenen geliş zamanı farklılıklarıdır.

2.4.2. Teorik Plaka Sayısı ve Rezolüsyon

Tekniğin asıl amacı ayırmacılık olup, teorik plaka sayısı ve rezolüsyon sırasıyla şu şekilde hesaplanır[9,15].

$$N = \frac{L_d^2}{\sigma_z^2} = \frac{t^2}{\sigma^2 t} = \frac{\mu_0 \pm \mu_i}{2D} \times \frac{L_d}{L} \times V \quad (2.19)$$

$$Re z = \frac{t_2 - t_1}{1/2(w_1 + w_2)} \quad (2.20)$$

N : Teorik plaka sayısı

Rez : Rezolüsyon

t₁ : İlk maddenin geliş zamanı

t₂ : İkinci maddenin geliş zamanı

w₁ : İlk pikin genişliği

w₂ : İkinci pikin genişliği

2.4.3. Pik Genişlemesi

CE de en önemli pik genişleme nedeni difüzyon nedeniyle pik genişlemesidir ve maddenin difüzyon katsayısı ve analiz süresi ile doğru orantılıdır. Analiz süresi kısaldıkça ve düşük difüzyon katsayılı maddelerde pik genişlemesi düşüktür.

Kapiler kolon içerisindeki akım artışından kaynaklanan farklı sıcaklıktaki çözelti bölgeleri pik genişlemesine neden olur. Joule ısınması olarak bilinen bu ısınmadan dolayı çözeltinin iç kısımlarında viskozite daha az dolayısı ile iyon mobilitesi yüksek, kapiler duvarına yakın bölgelerde sıcaklık düşük, çözelti viskozitesi yüksek, iyon mobilitesi ise düşüktür. Bu sıcaklık farkı, pik genişlemesine neden olur[16].

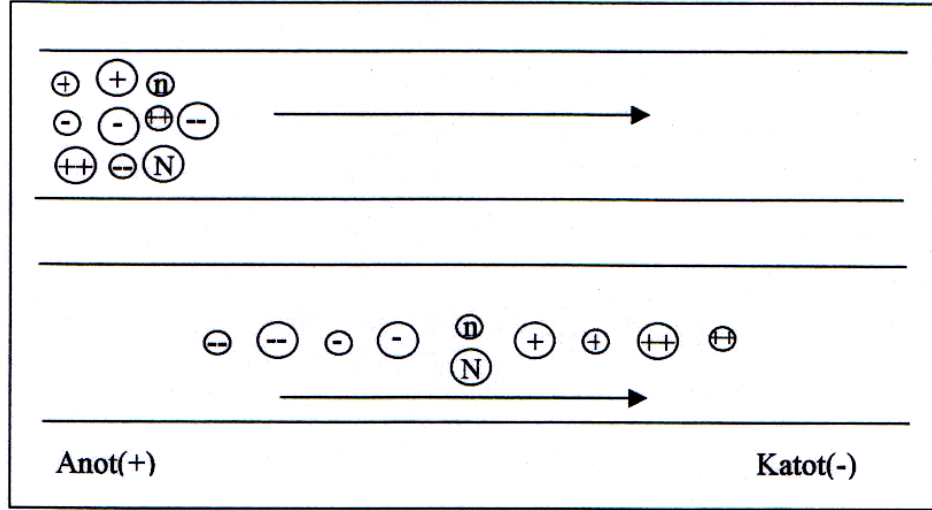
Çalışma elektrolitlerinden birinin çalışma sırasında, çözelti seviyesinin daha fazla olması sifon etkisine neden olur. Bu etki, kapiler kolon içerisindeki çözeltinin merkezinde daha hızlı bir akış oluşturur. Sifon etkisi iç çapı büyük olan kapilerde daha büyüktür.

Pik genişlemesine etki eden diğer bir faktör, özellikle protein çalışmalarında rastlanan duvar adsorpsiyonudur.

2.5. CE Teknikleri ve Kapiler Zone Elektroforez

CE’de çalışma amacına bağlı olarak kullanılan başlıca teknikler şunlardır; Kapiler Zon Elektroforez (CZE), Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC), Kapiler Jel Elektroforez (CGE), Kapiler İzotakoforez (CITP), Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF) , Kapiler Elektrokromatografi (CEC) ve Elektrokinetik Kromatografi (EKC)’dir.

En yaygın olarak kullanılan CE yöntemi CZE’dir. Bu yöntem, bir çok maddeyi kısa sürede ve kolayca ayrılabilir. Farklı yüke sahip anyonik ve katyonik türleri birarada içeren karışımlar, yük/büyükölük oranı farklılığına dayanarak ayrılırlar. Ayırımın esası analitlerin çözeltideki mobilite farklılıklarıdır. Çalışma alanında, EOM’nin büyüklüğünü elektroforetik mobilitelere oranla yeterli değerde kılacak pH değerini sağlayan bir elektrolit çözelti bulunur. Aynı örnek karışımında injekte edilen katyon ve anyonlar voltaj uygulaması ile şekil 2.6.’deki sıralama ile dedektöre ulaşırlar[10,11].



Şekil 2.6 : CZE'in şematik gösterimi[7]

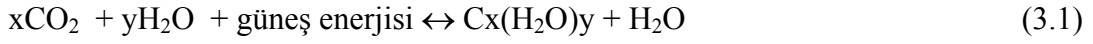
3. Karbohidratlar

Karbohidratlar, miktarları açısından konuşmak gerekirse, dünyadaki organik bileşiklerin en büyük grubu olup bitki, hayvan ve mikroorganizmalardaki her yaşam biçimiyle uzaktan veya yakından ilişki içindedir. Gıda bileşenleri içinde en önemlilerinden biri (nişasta gibi) olup, insan giysisi, kağıt ve pek çok biyoteknolojik işlem için (bira ve antibiyotik üretimi gibi) hammadde olarak kullanılmaktadır. Tekil türlerin tanımlanması ve bunların nicel olarak tek başına veya bir bileşenden fazla olan bir karışımda, diğer bileşenlerin varlığında tayini için güvenilir analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu açıktır.

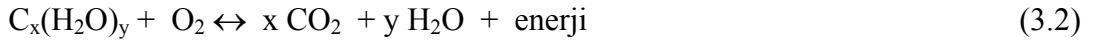
Karbohidratların ilk analiz yöntemleri gravimetrik, titrimetrik ve kolorimetrik prosedürler olmuş ve bunlar “klasik yöntemler” olarak isimlendirilmiş ve bunlar yalnızca farklı karbohidrat gruplarının nitel ve nicel analizlerine imkân tanımış ancak tekil bileşikler için aynı olay geçerli olmamıştır. Kromatografik, elektroforetik ve enzimatik yöntemlerin geliştirilmesiyle, elli yıl önce büyük bir değişim gözlenmiştir. Bu prosedürler karmaşık karbohidrat bileşiklerini karışımında tekil türlerin nitel ve nicel analizine imkân tanımaktadır.

$C_x(H_2O)_y$ genel formülü ile gösterildikleri için eskiden beri karbonun hidratları anlamındaki karbohidratlar ismiyle adlandırılırlar. Diğer adlandırmaları sakkaritler veya şekerlerdir. En çok bilinen sakkaritler sofr şeker olan sukroz, kan şeker olan glikoz, malt şeker olan maltozdur. Karbohidratlar polihidroksi aldehitler ve polihidroksi ketonlar veya hidrolize polihidroksi aldehit ve keton veren bileşiklerdir. Bu bileşikler yarı asetal veya asetal yapılarında bulunabildikleri için ($>C=O$ ve OH içeriyorlar) karbohidratlar ayrıca hemiasetaller (yarıasetaller) ve asetaller veya hemiketaller (yarı ketaller) ve ketaller olarak da isimlendirilirler. Hidroliz ile daha küçük karbohidratlara ayrılamayan sakkaritlere monosakkaritler denir. Hidroliz ile yalnız 2 mol monosakkarit verenlere disakkaritler, genel olarak 2-10 mol monosakkarit içerenlere oligosakkaritler, daha çok sayıda monosakkarit içerenlere polisakkaritler denilmektedir.

Karbohidratlar bitkilerin ve diğer canlıların yapılarındaki en önemli elementlerdir. Yalnız enerji kaynağı olmakla kalmaz ayrıca hücrelerin en önemli destek maddesi olarak önem kazanırlar. Yeşil bitkilerde hava CO₂' i güneş enerjisi ve bitkilerin yeşil pigmenti olan klorofil varlığında indirgenir, yani tutulur ve karbohidrat oluşur(3.1).



Klorofilin renginin yeşil olması ve bu nedenle görünür bölgede güneş ışığını absorblaması klorofilin yapısındaki geniş konjuge sistem nedeni ile gerçekleşmektedir. Klorofilin absorbladığı güneş enerjisi denklemde de görüldüğü gibi CO₂' i karbohidrata indirgemeye, H₂O' da O₂'ye yükseltgemeye yarar. Absorbladıkları enerji nedeni ile karbohidratlar enerji deposu görevi üstlenirler. Bitkiler ve diğer canlılardaki metabolizma (sindirim) sonucunda önceden alınmış enerji oksidasyon ile geri verilir. Bu sindirim enzimleri ile gerçekleşen reaksiyon denklem 3.2'de gösterilmiştir.



Canlıdaki karbohidratların yalnız bir kısmı doğrudan ısı enerjisine dönüşürken büyük bir kısımda yeni kimyasal bileşikler oluştururlar. Fosfat bileşikleri olan bu yeni bileşikler canlının tüm enerji ihtiyacında (kasların çalışması gibi) veya makromoleküllerin sentezinde kullanılır (Fosfat bileşikleri kaslarda yakılmazsa insan kilo alır.).

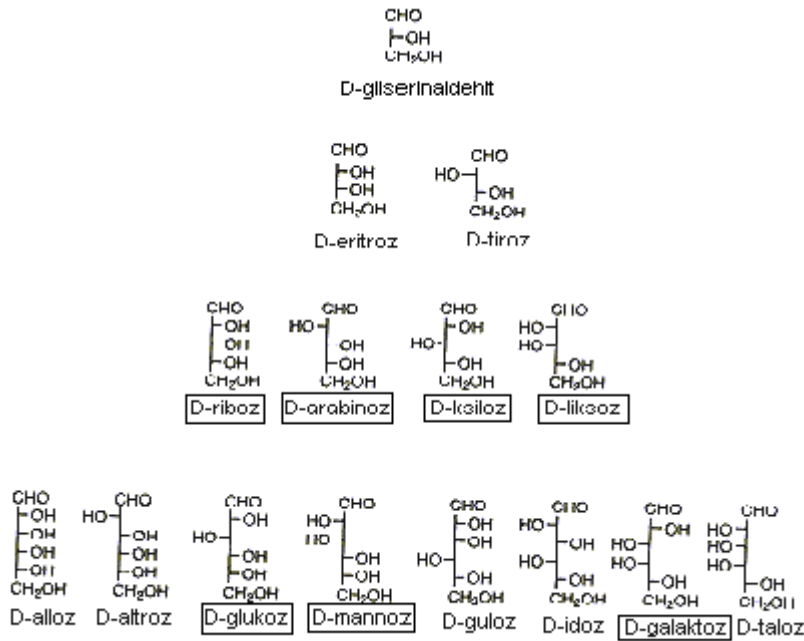
3.1.Karbohidratların Sınıflandırılmaları

Karbohidratlar kimyasal yapıları itibariyle üç ana gruba ayrılabilir, bunlar a)monosakkaritler, b)disakkaritler ve c)polisakkaritler şeklindedir.

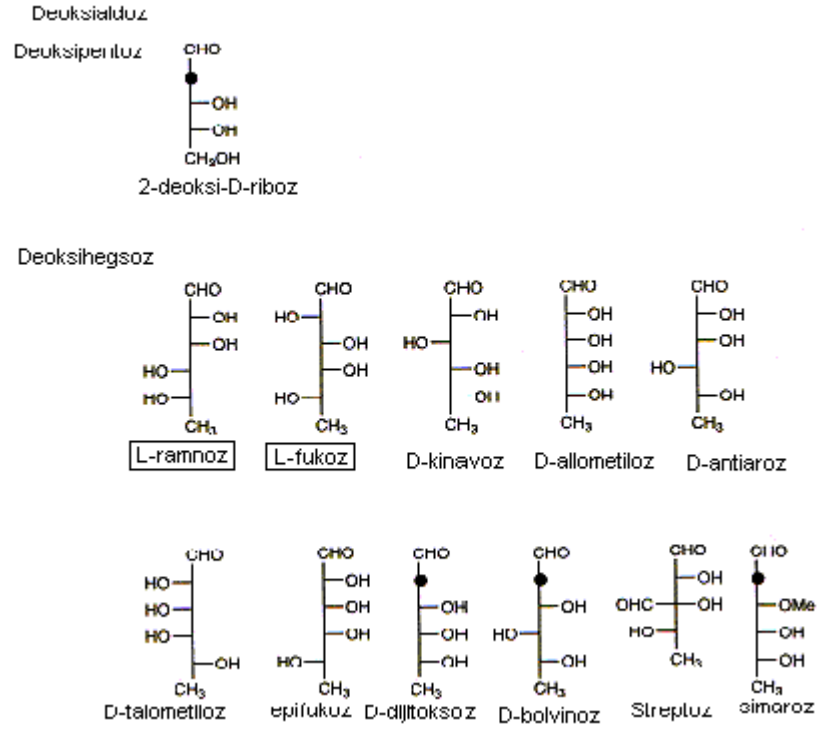
3.1.1. Monosakkaritler

Monosakkaritler, molekül formülleri C_n(H₂O)_n (karbohidrat kelimesi buradan gelir) olan organik bileşiklerdir. Monosakkaritler aldehit ve keton grubu içermelerine ve molekül iskeletindeki karbon atomu sayısına göre sınıflandırılırlar ve karbon atomu sayısının sonuna –os eki getirilerek adlandırılırlar.

Aldehit fonksiyonel grubu içeren monosakkaritler aldöz; keton fonksiyonel grubu içerenlere ketoz denir. En basit aldöz gliserinaldehittir. En basit ketoz dihidroksiasetondur. Karbon sayısına göre, tetroz, pentoz, heksoz, heptoz v.s. olarak adlandırılırlar; her biri aldöz veya ketoz olabilir. Monosakkaritlerin en çok bilinenleri 5 karbonlu pentoz ile 6 karbonlu heksozlardır. Pentozlar yani riboz ve deoksiribozlar ATP, RNA ve DNA'nın yapısında bulunurlar. Heksozlar ise glikoz (kan şekeri, üzüm şekeri), fruktoz (meyve şekeri), galaktoz (süt şekeri) olmak üzere üç çeşittir. Bunların kapalı formülleri aynıdır. Yani hepsi $C_6H_{12}O_6$ dır. Şekil 3.1 doğada bulunan monoaldozları göstermektedir.

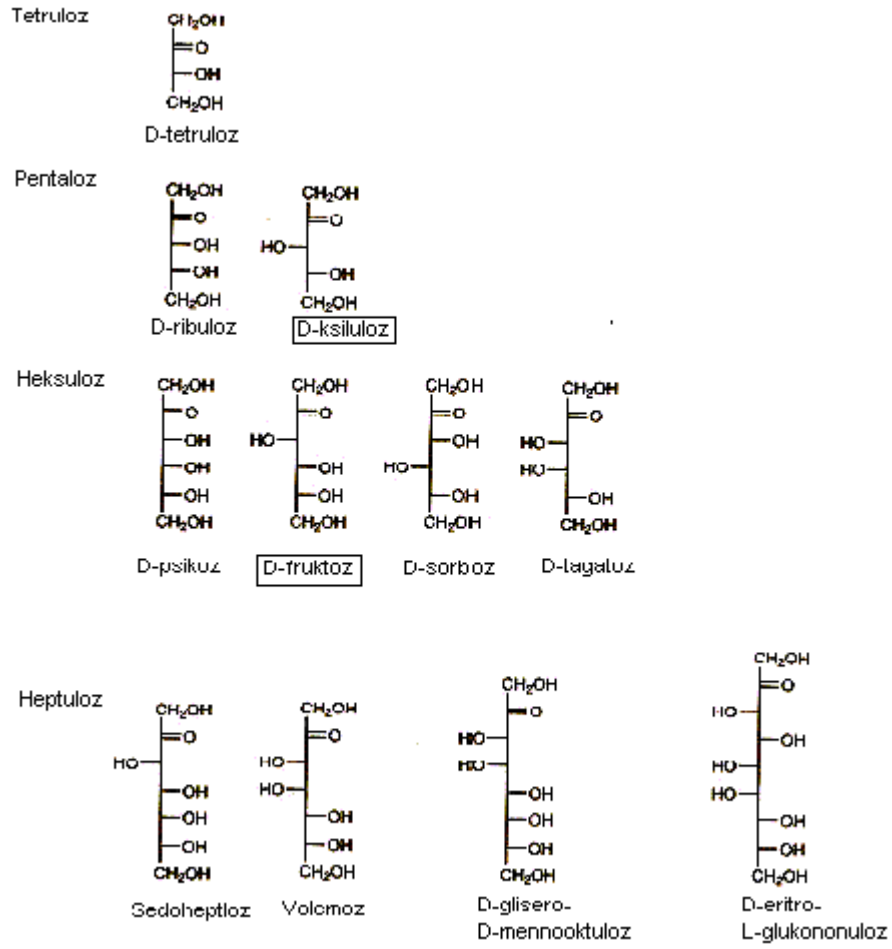


Şekil 3.1 : Monoaldozların yapıları[17] (Çerçevesi olan karbohidratlar çalışmada kullanılmıştır.)

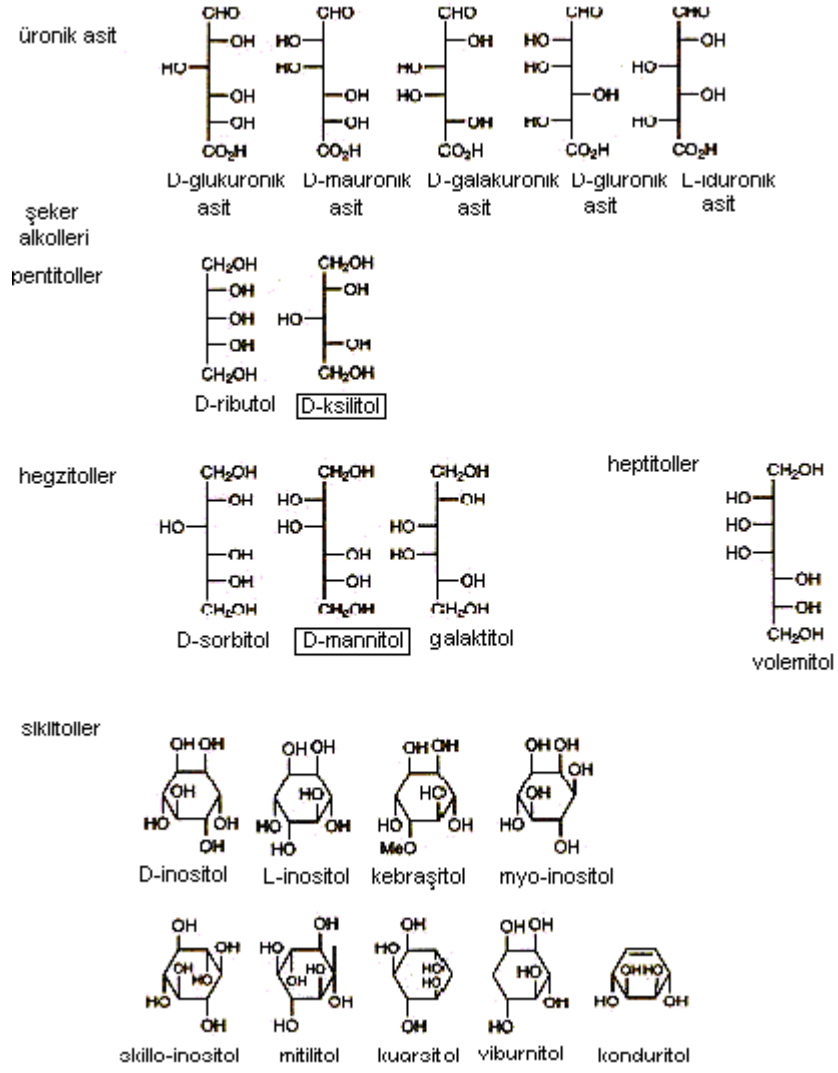


Şekil 3.2 : Doğada oluşan Deoksialdozlar [17] (Çerçevesi olan karbohidratlar çalışmada kullanılmıştır.)

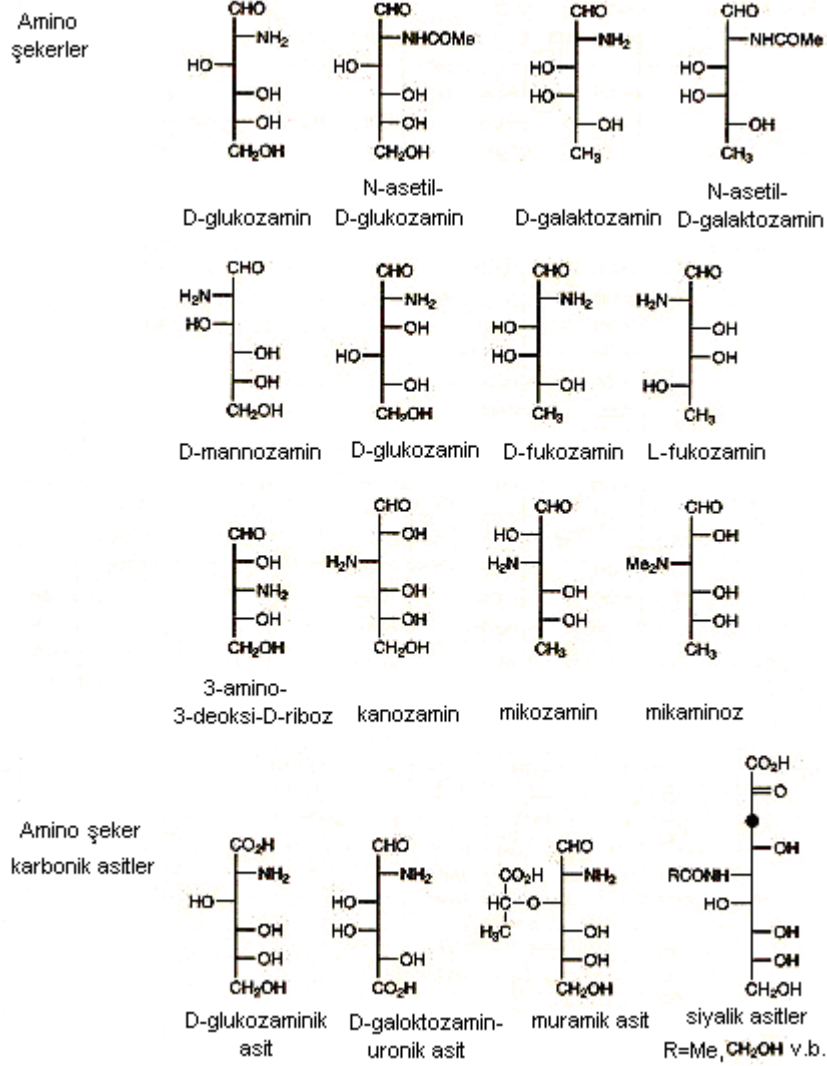
Şekil 3.2 Doğada oluşan deoksialdozları, şekil 3.3. monoketozların yapısını ve şekil 3.4. doğal monosakkaritler ve türevlerini göstermektedir. [17]



Şekil 3.3 : Monoketozların Yapısı[17] (Çerçevesi olan karbohidratlar çalışmada kullanılmıştır.)



Şekil 3.4a : Doğal monosakkaritler ve türevleri[17] (Çerçevesi olan karbohidratlar çalışmada kullanılmıştır.)



Şekil 3.4b : Doğal monosakkaritler ve türevleri. [17]

3.1.2. Monosakkaritlerin Doğada Bulunuşu

Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi yaşayan sistemlerde çok az miktarda monosakkarit bulunmaktadır (Tablo 3.1 ve 3.2). Tablo 3.3’de, doğal olarak oluşan en önemli monosakkarit türevlerinden ksilitol ve mannitol sıralanmıştır.

Tablo 3.1: Biyolojik sistemlerde bulunan ve çalışmada kullanılan monosakkaritler[17]

<i>Monoaldozun Adı</i>	<i>Doğada bulunuşu</i>
<i>Pentozlar</i>	
D-Arabinoz	Aloe glikozidleri ve bakteriyel polisakkarit bileşeni olarak
D-Ksiloz	Tahılların ksilanları gibi pek çok bitki polisakkaridinin ve pek çok sert tahta ve kozalaklı ağacın hemisellülozlarında yapı birimi olarak
D-Riboz	Nükleik asitlerin (RNA), nükleozidlerin, nükleotidlerin ve bazı önemli koenzimlerin (NAD gibi) yapıtaşı; kesilen hayvanların adelelerinde serbest şeker olarak az miktarda bulunur.
D-Liksoz	Küçük miktarlarda, maya nükleik asit birimi olarak; serbest şekilde insan kalp adelesinde bulunur.
<i>Heksozlar</i>	
D-Glukoz	Bütün bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bol miktarda bulunur; biyolojik sistemlerde en önemli organik bileşiklerden biridir; nişasta ve sellüloz gibi pek çok polisakkaridin bileşenidir.
D-Galaktoz	Serbest bileşik olarak çok az miktardadır; şarapta, peynir ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde mevcuttur; pek çok oligosakkarit, glikozid ve polisakkaridin bileşenidir.
D-Mannoz	Elma, şeftali gibi meyvelerde serbest bileşik olarak eser miktardadır; mannanlar veya galaktomannanlar gibi pek çok polisakkaridin bileşenidir.
Deoksimonoaldozlar	
<i>Deoksiheksozlar</i>	
L-Ramnoz	Serbest bileşik olarak çok az miktarda şarap ve zehirli sarmaşık (<i>Rhus toxicodendron</i> L.) yapraklarında mevcuttur; pek çok glikozid ve bitki polisakkaridinin bileşenidir.
L-Fukoz	Oligosakkarit bileşeni olarak özellikle insan sütünde mevcuttur; bazı bitkilerin glikozidlerinde, fukoidan gibi deniz yosunlarının polisakkaritlerinde ve bazı glikoproteinlerde bulunur.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan fruktozun biyolojik sistemlerde bulunuşu[17]

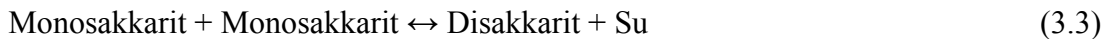
Monoketozun Adı	Bulunuşu
<i>Heksuloz</i>	
D-Fruktoz	Pek çok meyvede, bitkide ve balda serbest bileşik olarak; sakkaroz gibi oligosakkaritler ve inulin gibi polisakkaritlerde yapıtaşı

Tablo 3.3: Ksilitol ve mannitolün biyolojik sistemlerde bulunuşu[17]

Monosakkarit Türevinin Adı	Bulunuşu
Şeker Alkolleri	
<i>Pentitoller</i>	
D-ksilitol	Boletus bovinus gibi mantarlarda serbest halde ve bazı likenlerde.
<i>Heksitoller</i>	
D-Mannitol	Chanterelle gibi pek çok mantarda ve bütün kahverenkli algler gibi deniz alglerinde serbest halde

3.1.3. Disakkaritler

Disakkaritler, iki monosakkaritin birleşerek bir molekül su çıkması sonucu oluşurlar. 2 molekül monosakkaritin birer OH⁻larından 1 mol su çıkmasıyla monosakkaritler arasında bir oksijen köprüsü oluşur ve disakkarit meydana gelir. Hidroksil gruplarından birisinin mutlaka yarı asetal hidroksili olması gereklidir. Diğer ise yarı asetal hidroksili olabilir veya olmayabilir. Disakkaritler arasında oluşan bağa glikozit bağı adı da verilir. Glikozit bağı oluştuğu için bu olaya glikozitleşme denir. Küçük moleküllerin birleşerek su çıkarması olayına dehidrasyon sentezi denir. Büyük moleküllerin yapısına su katılarak daha küçük moleküllere parçalanması olayına hidroliz denir. Hidroliz olayı dehidrasyon sentezinin tersi bir olaydır. Disakkarit oluşumunu 3.3 eşitliğinde gösterilmiştir.



Canlılarda bulunan disakkaritler maltoz, laktoz ve sukrozdur. Bunların oluşum denklemleri 3.4, 3.5, 3.6 eşitliklerinde verilmiştir.



Maltoz; nişasta diastaz enzimi ile kısmi hidrolize uğrarsa bir disakkarit olan maltoz ele geçer. Maltoz asit hidrolizinde 2 mol D-(+)-glikoz verir.



Sukroz; α -D-glukopiranos ile β -D-fruktofuranosun yarı asetal hidroksillerinden (glukozun C-1 karbonu ile fruktozun C-2 karbonundaki OH'lar) bir mol su çıkmasıyla her iki monosakkaritin ortak asetalleri olan α -D-glukopiranosil- β -D-fruktofuranosid ele geçer. Bu disakkarite sukroz adı verilir.



Sellibioz; 4-O- β -D-glukopiranos ve β -D-glukopiranos'tan oluşur. Selülozun (polisakkarit) kısmi hidrolizi ile ele geçen bir disakkarittir. Sellibiozdaki glikosidik köprü β köprüsüdür.

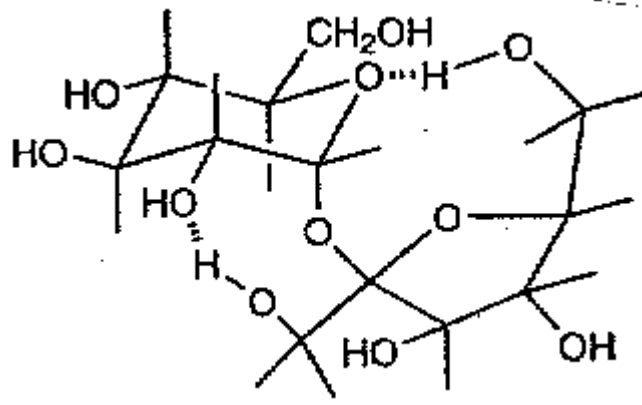


Laktoz; tüm memelilerin sütünde bulunan indirgen bir disakkarittir. Hidrolizde glikoz ve galaktoz verir, glikosidik köprü β köprüsüdür.

Disakkaritler, monosakkaritler gibi çok tatlı değildirler. Ancak hem monosakkaritler hem de disakkaritler genel olarak tatlı oldukları için kristal halde bulunurlar.

Disakkaritler canlı sistemlerde serbest bileşik olarak bulunur, bunun yanında pek çok bitki bileşenine bağlı şekilde de bulunabilir. Tablo 3.4'de, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan bu tür disakkaritlere örnekler verilmiştir[17].

Tercihen gıda maddelerinden kullanılan ve bu gruba dahil doğal bileşiklerden en önemlileri sakkaroz (sukroz) ve laktozdur. Sakkaroz pek çok köklü bitkide (şekerpancarı, havuç) ve meyvelerde (erik, kayısı) ve serbest halde kullanılmakta olup dünyada en yaygın şekilde kullanılan tatlandırıcıdır. Laktoz sütün ana karbohidrat bileşeni olup, bir gıda ürününün hazırlanmasında süt veya süt ürünlerinin kullanılmış olduğunu gösteren bir işaret olarakta kullanılır.



Şekil 3.5 : Sukrozun Uzaydaki Üç Boyutlu Yapısı[18]

Şekil 3.10’de, dünyada en çok üretilen saf kimyasallardan biri olan sukrozun tam stereokimyasal yapısı görülmektedir.

Tablo 3.4: Biyolojik Sistemlerde sellibioz, maltoz, sukroz ve laktozun bulunuş şekilleri[17]

Adı	Doğada bulunuşu
Sellobiyoz	Sellüloz birimi
Maltoz	Malt, bira ve az miktarlarda, bazı sebze ve meyvelerde ve balda serbest bileşik olarak; nişastanın temel birimi
Sukroz	Şeker kamışında, şeker pancarında ve bitkilerde, özellikle meyvelerde, serbest bileşik olarak
Laktoz	Süt ve süt ürünlerinde serbest bileşik olarak

3.1.4. Polisakkaritler

Disakkaritlerin birimlerinin sayısını 10’un üzerine kademeli olarak çıkardığımızda polisakkaritler olarak adlandırılan bileşiklere ulaşılmaktadır. Polisakkaritlerin oluşumunu 3.8 denkleminde gösterilmektedir.

$$n(\text{Monosakkarit}) + n(\text{Monosakkarit}) \leftrightarrow \text{Polisakkarit} + (n-1) \text{ Su} \quad (3.8)$$

Bunların fiziksel ve kimyasal özellikleri, eklenen monosakkarit birimleri nedeniyle öncekilerden farklıdır. Bu bileşiklerin molekül ağırlıkları 10 bin ile 1-10 milyon

dalton arasında değişmektedir. Bu gruptan bileşikler hemen hemen bütün canlı sistemlerde bulunur. Sellüloz, pektin ve nişasta gibi bitki hücrelerinin temel bileşenleridir, ancak böcek ve kabuklu hayvanlarda kitin tabakası olarak, memeli karaciğerlerinde ise glikojen olarak bulunmaktadır. Polisakkaritler sellüloz ve agar gibi uzun dallanmamış zincirler şeklinde, veya kitre ve arap sakızı gibi pek çok bitki sakızında olduğu gibi dallanmış zincirler şeklinde bulunabilir. Bunların yapıları itibarıyla sudaki çözünürlükleri ve viskoziteleri çok farklı olabilmektedir.

3.2. Karbohidratların CE ile Analizi

Karbohidratlar dedeksiyon metoduna bağlı olarak CZE’de çeşitli yollarla ayrılırlar.

- a) Karbohidratların türevlendirilmeden direk fotomerik dedeksiyon ile CZE’de tayini.
- b) Karbohidratların türevlendirilmeden indirek fotomerik veya elektrokimyasal dedeksiyon ile CZE’de tayini.
- c) Karbohidratların türevlendirilerek CZE’de tayini.

3.2.1. CZE’de Türevlendirilmemiş Karbohidratların Tayini

Ayırma ortamına borat ilavesi sonucu esas olarak yüksüz olan sakkaridler borat iyonu ile kompleksleşme sonucu yük kazanırlar. Ayrıca, mono ve disakkarid ve türevlerinin çoğunluğu, ortak UV alanda (195nm) zayıf absorpsiyona sahiptir. Bunun nedeni UV absorpsiyondan sorumlu açık zincir konfigürasyonu sulu çözeltilerde çok küçük miktarlarda bulunmaktadır. Düşük olan bu UV ölçümü çözeltilere borat iyonları eklenmesi ile belirgin şekilde artar. Borat anyonu olduğunda karbohidratların absorpsiyonundaki bu artış, şekerlerin türevlendirilmeden UV dedeksiyonu ile CZE’de ayrılmalarına olanak sağlar[19].

3.2.2. Karbohidratların Türevlendirilmeden İndirek Fotomerik veya Elektrokimyasal Dedeksiyon ile CZE’de Tayini

Mono ve oligosakkarit molekülündeki hidroksil grupları, özellikle glikosiklik OH grubu C-1, farklı pK değerlerinde asidik karakter göstermektedir. Güçlü alkali ortamda pH 11,9-12,5 aralığında, mono- ve oligosakkaritler elektrik alan altında farklı mobilitelerle hareket ederler. Ayırma ortamına ilave edilen bir kromofor madde ile

ayrılmış zonların dedeksiyonunu indirek UV veya amperometrik elektrod sistemle yapmak mümkündür.

3.2.2.1. İndirek UV Fotometri ile Karbohidratların CZE’de Tayini

Bu metod elektroforez süresince analitlerin kromotografik, fluoprotik veya elektroaktif olarak fiziksel yer değiştirmelerine bağlıdır. Analit, ayırma ortamına ilave edilen bir UV aktif kromofor madde ile yer değiştirdiğinde negatif pik gözlenir.

Sorbik asid bu amaçla kullanılan uygun bir kromofor maddedir. Ayrıca sorbik asit analitler ve kapiler yüzeyi ile etkileşmez ve tek yük taşıdığından dolayı iyi transfer özelliği sağlar. Böylece herbir kromofor molekülü bir analitle yer değiştirir. Ayırım pH 11.9-12,4 arasında gerçekleşir[20].

3.2.2.2. Elektrokimyasal Dedeksiyon ile CZE’de Karbohidratların Tayini

İndirek UV fotometriye alternatif olarak amperometrik dedeksiyon kullanılır. CZE kapilerinde ayrılmış zonların dedeksiyonu için mikroeletrod sistem geliştirilmiştir[21].

3.2.3. Türevlendirilmiş Karbohidratların CZE ile Tayini

Karbohidratların güçlü kromoforik veya floroforik fonksiyonlu kimyasallarla türevlendirilmesi, ayrılmış maddelerin UV dedeksiyonunun daha kolay gerçekleşmesini sağlar. Özellikle floroforik maddeler, dedeksiyon hassasiyetini oldukça yükseltebilirler. Bu yöntemin bir dezavantajı, türevlendirme reaktiflerinin sadece boş karbonil grubu içeren monosakkarid ve disakkaridlerde uygun olması ve ön türevlendirme işleminin analiz süresini uzatmasıdır. Sakkaridlerin ayrılmasında şimdiye kadar farklı türevlendiriciler kullanılmıştır. Örnek olarak 2-aminopridin[17,22], ANTS[23], aminobenzonitrile[17] verilebilir.

4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmalarımızda, diod-array dedektörle kombine Agilent marka Kapiler Elektroforez cihazı ve Metrohm marka pH-metre kullanılmıştır. Veri analizleri, Agilent Chemstation software ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerin gerçekleştiği silika kapiler kolonlar Polymicro teknolojidenden sağlanmıştır.

Deiyonize su, Elgacan C114 filtrasyon sistemi ile elde edilmiştir.

4.2. Kimyasal Maddeler

Di-Glisin, NaOH, D-glukoz, D-fruktoz, sukroz, L-fukoz, D-ksiloz, L-ramnoz, D-riboz, D-mannitol, D-ksilitol, laktoz, D-arabinoz, D-liksoz, sellibioz, maltoz, D-mannoz, D-galaktoz kullanılmıştır. D-glukoz, D-fruktoz, sukroz, D-ksiloz, L-ramnoz, D-riboz, D-arabinoz, sellibioz, D-galaktoz Sigma'dan; Di-Glisin, NaOH, L-fukoz, D-mannitol, D-ksilitol, laktoz, D-liksoz, maltoz, D-mannoz ise Fluka'dan alınmıştır.

4.3. Elektroforetik Koşullar

Ayırmada kullanılan silika kapiler çapı 50µm I.D.× 63 cm toplam (etkin boyu 54.5 cm) uzunluktadır. Çalışma tamponu 50 mM di-glisindir ve tamponun pH'ı 1 M NaOH ile 12'ye ayarlanmıştır. Çalışma tamponu her gün yeni hazırlanarak kullanılmıştır.

Her günün başında ve sonunda silika kapiler 10 dk 1 M NaOH ile ardından 5 dk deiyonize su ile son olarakta 10 dk çalışma tamponu olan 50 mM Di-glisin ile yıkanmıştır. Örnekler 50 mbar basınç ile 5 sn de injekte edilmiştir. Uygulanan voltaj

28 kV'dur ve kapilerin sıcaklığı 25°C'de sabitlenmiştir. Dedeksiyon diode-array dedektörü kullanılarak dolaylı (indirek) UV deteksiyonla gerçekleştirilmiştir. Çalışılan dalga boyu 207 nm olarak seçilmiştir

4.4. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması

Vişne suyu örneğinin hazırlanması: Kutu vişne suyundan 1 ml alındı ve içine toplam konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde 2.4 ml fukoz iç standart olarak (50mM'lık stoktan) ilave edildi ve üzerine 26.6 ml saf su eklendi. Böylece meyve suyu örneği 1/30 seyreltilti. Çözelti 0.45 µm' lik mikrofiltreden süzülerek, pH'ı 12 olan 50 mM'lık di-glisin çalışma elektrolitine injekte edildi.

Portakal suyu örneği de vişne suyu örneği gibi hazırlandı ve aynı şekilde injeksiyonu yapıldı.

Böylece gerçek örneklerde bulunan karbohidratlar saptandı ve miktarları tayin edildi.

5. SONUÇLAR

5.1. Mono ve Disakkaritlerin Ayrılmasına Ait Çalışmalar

Çalışmamızın amacı 16 karbohidrat karışımının seçilen bir amino asitle etkileşiminden yararlanarak CZE ile ayrılmasını sağlamaktır. Bu amaçla yapılan ön denemelerde ayırma ortamı olarak, tirozin, lizin, fenil alanin, arginin ve di-glisin amino asit çözeltileri ile çalışıldı. Çalışılan aminoasitlerin asitlik sabitleri tablo 5.1’de verilmiştir. Ayırma elektroliti, olarak kullanılan amino asit çözeltilerinin ön deneme olarak, üçlü örnek karbohidrat karışımının (glikoz-fruktoz-sukroz) ayırma etkisi araştırıldı. Seçilen amino asitler arasında sadece di-glisin ve histidinin karbohidrat pikleri arasında önemli bir ayırmacılık sağladığı tespit edildi. Histidin kullanıldığında önemli bir gürültü söz konusu olduğundan en uygun ayırma elektrolitinin di-glisin olduğu saptanarak optimum şartların saptanması için denemelere başlandı.

Tablo 5.1: Çalışılan aminoasitler ve pK değerleri

Aminoasitler	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Tirozin	2.17	9.04	10.14
Lizin	2.04	9.08	10.69
Fenilalanin	2.18	9.11	
Arginin	2.05	9.01	
Histidin	1.7	6.02	9.08
Di-glisin	3.13	8.07	

Karbohidratların ayrılmasına pH'ın etkisi üç farklı pH alanında incelendi. Bunun için pH'ı 3, 7 ve 12 olan üç ayrı 50mM'lık diglisin çözeltisi hazırlandı ve örnek karbohidrat karışımı (glukoz- fruktoz-sukroz) hazırlanan çalışma elektrolitlerine ayrı ayrı injekte edilerek karbohidratların elektroforetik davranışları incelendi. Çalışılan üç pH değerinden pH 12 de üç karbohidratın ayrılması gerçekleşti.

Çalışma elektrolitinin konsantrasyonun ayırıcılığa etkisinin incelenmesi amacıyla pH 12 de farklı konsantrasyonlarda di-glisin çözeltileri hazırlandı. Konsantrasyonları 10, 30, 50 ve 70 mM ve pH ları 12 olan dört adet çalışma elektrolitinin her birine eşit şartlarda yapılan injeksiyonlar sonucunda 50 mM lık di-glisin tamponunun glukoz- fruktoz- sukroz karışımı için en iyi ayırımı gerçekleştirdiğine karar verildi.

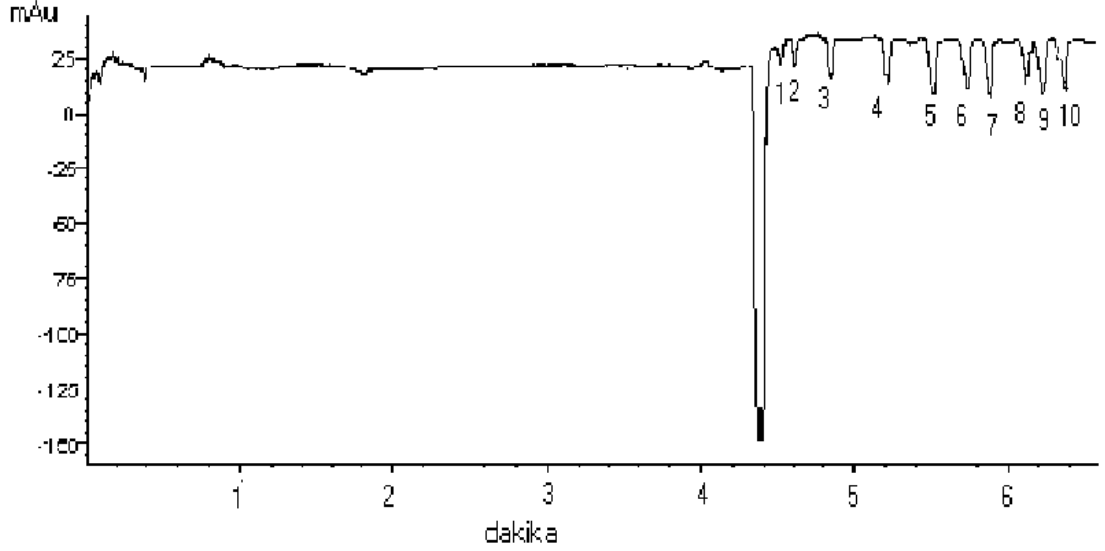
Örnek karbohidrat karışımı için optimal ayırma şartları; ayırma elektroliti konsantrasyonu 50mM diglisin, pH 12 ve ayırma voltajı 28 kV olarak saptandıktan sonra 16 karbohidratın bu şartlarda elektroforetik davranışları ve bir arada ayrılmaları için denemelere başlandı.

Çalışma ön denemelerin yapıldığı glukoz, fruktoz ve sukroz karışım çözeltisine her seferinde bir karbohidrat fazlasının ilavesi ile sürdürülerek 16 adet karbohidratın herbirinin ayırma şartlarında geliş süreleri ve elektroforetik mobiliteleri saptandı. Elektroosmatik akış piki olarak negatif su piki alındı. Bu pikin geliş süresi (t_0) ve karbohidratların geliş sürelerinden (t), 2.13 eşitliği ile ($\mu_e = (LxL_d)/(Vx(t-t_0))$) herbir karbohidratın elektroforetik mobilitesi hesaplandı. 16 karbohidrat için saptanan elektroforetik mobilite değerleri Tablo 5.2. de verilmektedir.

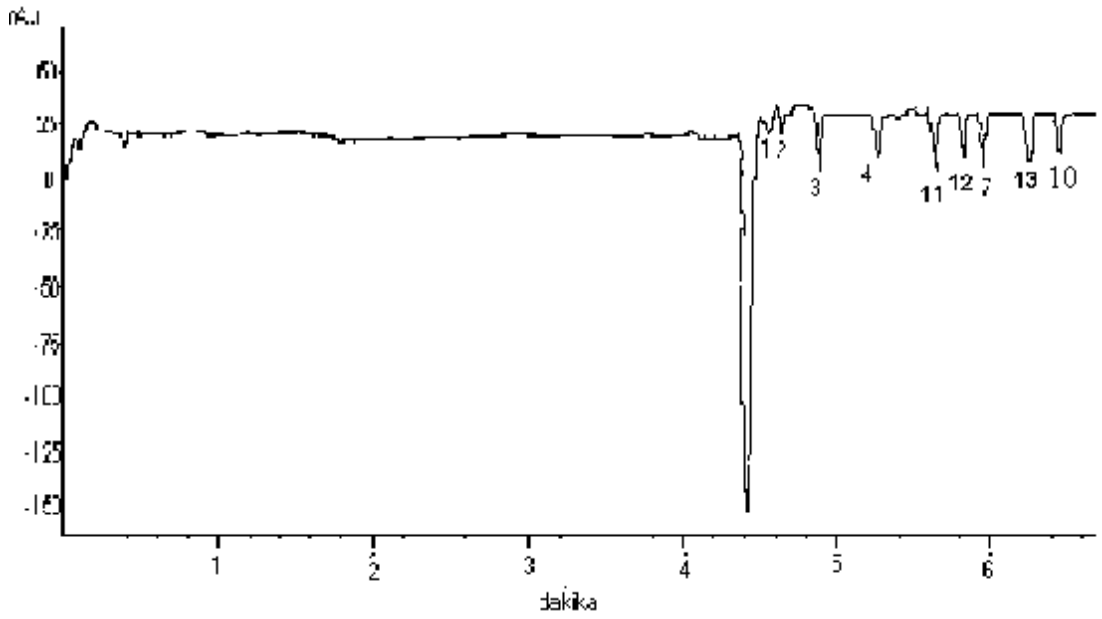
Tablo 5.2: Karbohidratların geliş süreleri ve elektroforetik mobiliteleri

Karbohidratlar	t(sn)	$\mu_e (m^2.V^{-1}.s^{-1})$
D-Ksilitol	270.48	1.34E-05
D-Mannitol	276.06	2.25E-05
Sukroz	291.66	4.63E-05
L-Fukoz	316.38	7.91E-05
Laktoz	334.98	1.01E-04
Sellibioz	339.3	1.05E-04
D-glukoz	349.38	1.16E-04
D-Arabinoz	349.98	1.16E-04
D-Galaktoz	352.32	1.19E-04
Maltoz	357.12	1.23E-04
L-Ramnoz	359.82	1.26E-04
D-Ksiloz	375.78	1.40E-04
D-Liksoz	375.96	1.41E-04
D-Fruktoz	381.24	1.45E-04
D-Mannoz	387.12	1.50E-04
D-Riboz	391.26	1.53E-04
E.O.Akış Piki	262.74	4.67E-04

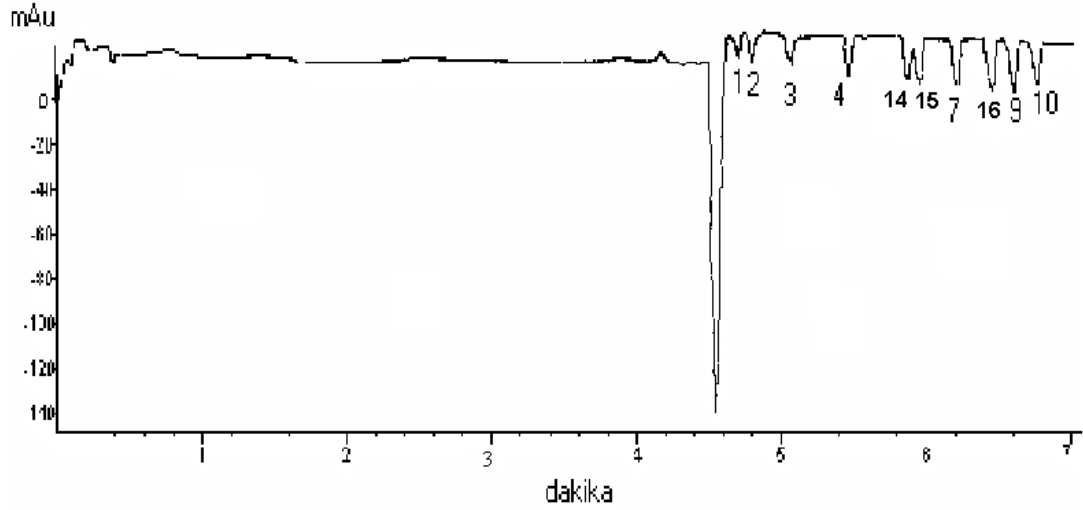
Tablo 5.2.' den görüldüğü gibi bazı şekerlerin elektroforetik mobiliteleri birbirine çok yakın olup 16 karbohidratın aynı anda ayrılması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle elektroforetik mobiliteleri birbirlerine çok yakın karbohidratlar birbirlerinin yerine konarak üç farklı grup oluşturulmuş böylece aynı anda 10 karbohidratın birarada ayrılması gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.1, 5.2 ve 5.3' de üç karbohidrat grubunun ayırma elektroferogramı görülmektedir. Tüm ayırmalarda çalışma koşulları: Silika kapiler çapı 50 μ m I.D., boyu 63 cm (etkin boyu 54.5 cm). Tampon 50 mM di-glisin pH12. İnjektasyon 5 sn 50 mbar basınç. Uygulanan voltaj 28 kV. Kapilerin sıcaklığı 25°.Çalışılan dalga boyu 207 nm. şeklindedir.



Şekil 5.1: Karışım I. 10 karbohidrat karışımının elektroferogramı: 1= D-ksilitol, 2= D-mannitol, 3=sukroz, 4=L-fukoz, 5=laktoz, 6=D-glukoz, 7=L-ramnoz, 8=D-ksiloz, 9=D-fruktoz ve 10= D-riboz. Herbirinin derişimi 4mM



Şekil 5.2 : Karışım II. 9 karbohidrat karışımının elektroferogramı: 1=D-ksilitol, 2=D-mannitol, 3=sukroz, 4=L-fukoz, 7=L-ramnoz, 10=D-riboz 11=sellibioz, 12=D-arabinoz 13=D-liksoz.



Şekil 5.3 : Karışım III.10 karbohidrat karışımının elektroferogramı: 1=D-ksilitol, 2=D-mannitol, 3=sukroz, 4=L-fukoz, 7=L-ramnoz, 9=D-fruktoz, 10=D-riboz 14=D-galaktoz, 15=maltoz, 16=D-mannoz

5.2. Tekrarlanırlık ve Dedeksiyon Limitleri

50 mM lık pH'ı 12 olan di-glisin tamponuna, optimal ayırma şartlarında I.Karışım (D-ksilitol,D-mannitol, sukroz, L-fukoz, laktoz, D-glukoz, L-ramnoz, D-ksiloz, D-fruktoz ve D-riboz) tekrarlanabilirlik ölçümü için 9 kez ardarda injekte edildi. Geliş sürelerinin ve pik alanlarının % bağıl tekrarlanırlıkları (%RSD) Tablo 5.3.'de görülmektedir.

Tablo 5.3: CZE ile karbohidrat analizine ait RSD değerleri

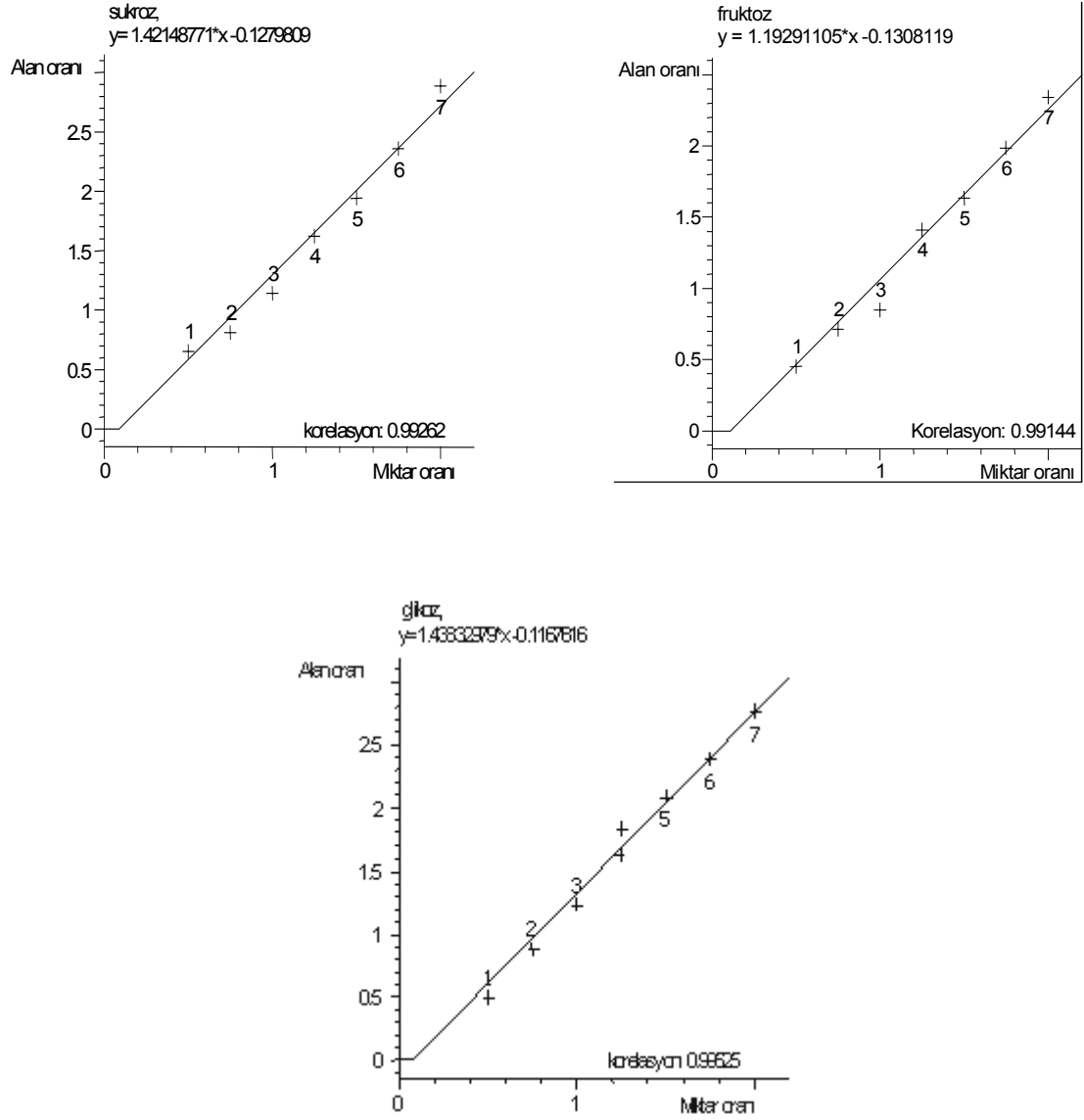
Karbohidratlar	% RSD (geliş zamanı için)	%RSD (pik alanı için)
D-ksilitol	0.53	2.02
D-mannitol	0.53	3,84
Sukroz	0.64	3.83
L-fukoz	0.82	3.09
Laktoz	0.90	3.35
D-glukoz	0.99	3.08
L-ramnoz	1.02	3.57
D-ksiloz	1.19	4.13
D-fruktoz	1.21	2.83
D-riboz	1.27	2.81

CZE ile karbohidrat ayırımında, geliştirilen analiz yönteminin dedeksiyon limitleri (LOD) gürültünün üç katı sinyal olarak kabul edilerek hesaplanmış ve Tablo 5.3' de verilmiştir.

Tablo 5.4: CZE ile karbohidrat analizine ait LOD değerleri

Karbohidratlar	LOD (µg/ml)
D-ksilitol	66,3
D-mannitol	56,6
Sukroz	49,8
L-fukoz	32,2
Laktoz	49,1
Sellibioz	48,3
D-glukoz	29,2
D-arabinoz	28,1
D-galaktoz	40,7
Maltoz	66,5
L-ramnoz	25,9
D-ksiloz	29,1
D-liksoz	24,9
D-fruktoz	29,8
D-mannoz	30,8
D-riboz	26,1

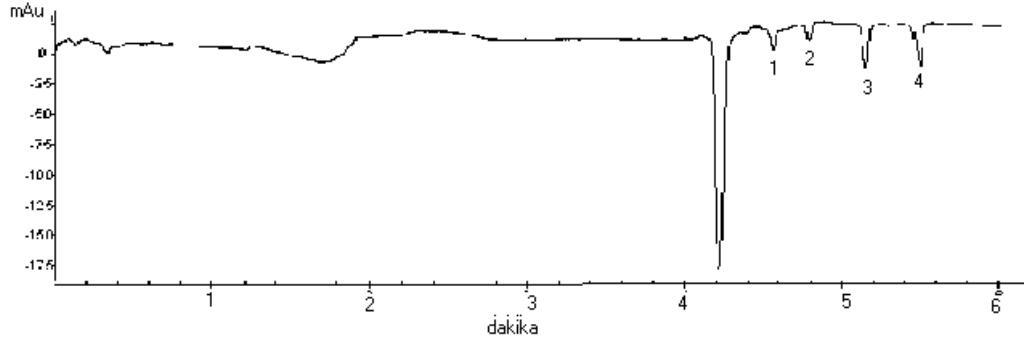
Kalibrasyon doğrusal konsantrasyon sınırının tespiti, doğrusal kalibrasyon konsantrasyon bölgesi genelde yiyecek ve içeceklerde çok bulundukları için glukoz, fruktoz ve sukroz için tespit edildi. 50 mM lık pH'ı 12 olan di-glisin tamponuna, glikoz, fruktoz, sukroz 2-8 mM arası değişen konsantrasyonlarda injekte edildi. Tüm çözeltilere konsantrasyonu 4mM olacak şekilde fukoz iç standart olarak eklendi. Tüm şeker çözeltileri her gün taze hazırlandı ve injeksiyon süresi içinde sukroz pikinde herhangi bir bozunma (glikoz ve fruktoza ayrılma) gözlenmedi. Kalibrasyon eğrileri Şekil 5.4'de verilmektedir. Kalibrasyon grafiklerinin regrasyon katsayıları (r^2) sukroz için 0.992, glukoz için 0.995 ve fruktoz için 0.991 olarak bulundu. Kalibrasyon denklemleri üç karbohidrat için sırasıyla, $y=1,42148771x-0,1279809$; $y=1,48832979x-0,1167616$; $y=1,19291105x-0,1308119$ olarak bulunmuştur.



Şekil 5.4 : Sukroz, fruktoz ve glukoz için kalibrasyon eğrileri

5.3. Yöntemin Meyve Suyu Örneklerinde Karbohidrat Analizine Uygulanması

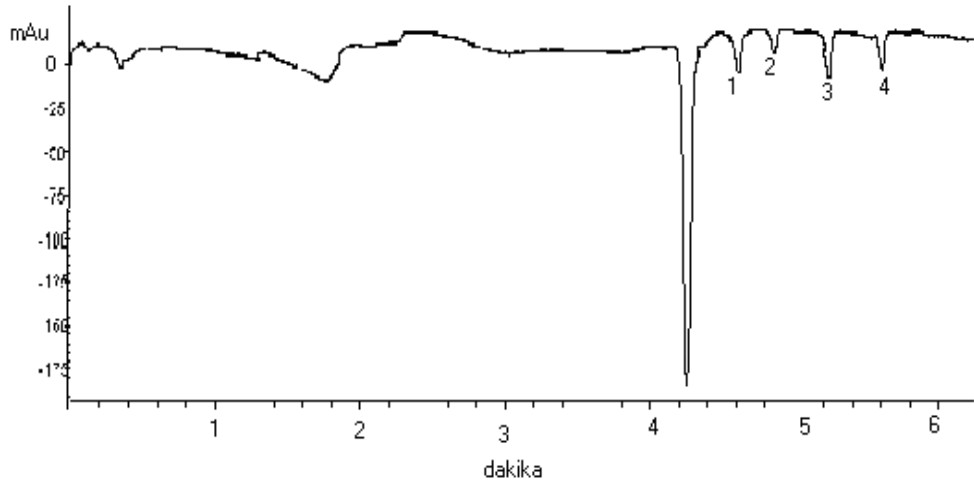
Metod gerçek örneklerdeki karbohidrat bileşimini tayin etmek için kullanıldı. Bir çok besin örneği genelde sadece glikoz, sukroz ve fruktoz içerir. Şekil 5.5. vişne suyunun elektroferogramını göstermektedir.



Şekil 5.5 : Vişne suyu örneği elektroferogramı. 1=sukroz, 2=fukoz, 3=glikoz, 4=fruktoz

Yapılan injeksiyon sonucu piklerin kendi göç zamanlarında geldiği görüldü. Karbohidratların teşhisi örnek çözeltisine standard ekleme yoluyla da doğrulandı. Vişne suyu örneğinde sukroz, glukoz ve fruktozun miktarları sırasıyla 35.66, 47.83 ve 54.47 g/l olarak saptandı.

Şekil 5.6. portakal suyu analizi sonuçlarını göstermektedir. Portakal suyu örneğinde ise sukroz, glikoz ve fruktozun miktarları 53.86, 30.68 ve 24.16 g/l olarak bulundu.



Şekil 5.6 : Portakal suyu örneği elektroferogramı. 1=sukroz, 2=fukoz, 3=glikoz, 4=fruktoz

5.4. Sonuç

Çalışmada kapiler elektroforez yöntemi ile mono ve oligosakkaridlerin birarada ayrılmaları ve tayinleri için bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin esası ayırma elektroliti olarak kullanılan amino asidin sakkaridler ile farklı etkileşime girerek, sakkaridlerin elektroforetik mobilitelerinde farklılık yaratmaktır. Amino asit olarak seçilen di-glisin bu hedefi gerçekleştirmiştir. Di-glisinle 16 adet sakkarid bileşiğinin elektroforetik mobilitesi tespit edilmiş ve 10 adedinin aynı anda ayrılması ve teşhisi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca di-glisinin UV aktivitesi ve sakkaridlerle uyumlu mobilitesi dolaylı analiz için ayrı bir kromofor kullanmaya ihtiyaç duymadan UV-inaktif sakkarid türlerinin dolaylı olarak deteksiyonunu da sağlamıştır.

Geliştirilen yöntem meyve suları içinde bulunan sakkaridlerin kantitatif tayinine uygulanmıştır. Meyve suyu örnekleri herhangi bir ön işlem uygulamadan doğrudan kapiler kolona injekte edilerek, 6 dakika gibi kısa bir süre içinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Mikroboyutta bir analiz yöntemi olarak sunulan yöntem, sakkarid analizlerinde hem zaman hem de kullanılan kimyasaların miktarı açısından ekonomik ve güvenilir bir analiz yöntemidir.

KAYNAKLAR

- [1] **Soga, T., and Imaizumi, M., 2001**, Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds *Electrophoresis*, **22**, 3418-3425.
- [2] **Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H., 1991**, Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **63**, 1541-1547.
- [3] **Garner, T., and Yeung, E., 1990**. İndirect fluoescance detection of sugars seperated by capillary zone electrophoresis with visible laser excitation, *J. Chromatogr. A*, **515**, 639-644.
- [4] **Rassi, Z., Mechref, Y., 1996**. Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates, *Electrophoresis*, **17**, 275-301.
- [5] **Lu, W., Cassidy, R., 1993**. Pulsed amperometric detection of carbohydrates separated by capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* , **65**, 2878-2881.
- [6] **Lu, B., Westerlund, D., 1996**. Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis by using tryptophan as a marker, *Electrophoresis*, **17**, 325-332.
- [7] **Belin, G.K., 2003**. Nötral aromatik ve izomerik aromatik bileşiklerin elektrokinetik kromatikrafı yöntemi ile ayrımı ve tayini, *Doktora Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [8] **Nutku, M.S., 1998**. İnorganik anyonların, organik asitlerin ve DNA parçalarının kapiler elektroforez ile ayrımında polielektrolit kullanımı, *Doktora Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [9] **Kok., W.Th., 1994**, Principles of CE, in *CE Amsterdam Summercourse*, pp.3-43, university of Amsterdam, Amsterdam.
- [10] **Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D., 1981**. Zone electrophoresis in open-

tubular glass capillaries, *Anal. Chem.*, **53**, 1298-1302.

- [11] **Li, S.F.Y.**, 1992, *Capillary Electrophoresis Principle, Practice and Applications*, Elsevier science Publisher, Amsterdam.
- [12] **Altria, K. D.**, 1996, *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation, and Applications*, Humana Pres Inc. New Jersey.
- [13] **Potocek, B., Machiel, B., Gas, B., Chiari, M. And Kenndler , E.**, 1998, Separation of nature compounds by capillary electrokinetic chromatography whit a replaceable charge linear polymer as pseudo stationary phases, *J. Chromatogr. A*, **789**, 269-273.
- [14] **Palmer, C. P.**, 1997, Micelle polymers, polymer surfactans and dendrimers as pseudo stationary phases in micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, **792**, 105-124.
- [15] **Littewood, A. B.**, 1970, *Gas Chromotography*, Academic Pres, New York.
- [16] **Grossman, P. D.**, 1992, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic, London.
- [17] **Scherz, H., Bonn, G.**, 1998, *Analytical Chemistry of Carbohydrates*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- [18] **Ziad El Rassi**, 1992, Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis, pp.579-672.
- [19] **Hoffstetter S., Kuhn, Paulus A., Gassmann E., Widmer H.M.**, 1991, Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis *Anal. Chem.*, **63**, 1541-1547.
- [20] **Tomoyoshi S., Serwe M.** 2000, Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection ,*Food Chemistry*, **69**, 339-344.

- [21] **Colon, L.A., Dadoo, R., Zare, R.N.** 1993, Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode, *Anal. Chem.*, **65**, pp.476.
- [22] **Nashabeh, W., Rassi, Z.** 1992, Capillary zone electrophoresis of linear and branched oligosaccharides, *J. Chromatogr.*, **600**, pp.279-286 .
- [23] **Chiesa, K., Horvarth, C. J.** 1993, Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, *Chromatogr.* **645**, pp.337-341.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kırklareli’de doğdu. İlköğretimini Tekirdağ’ın Hayrabolu ilçesinde Doğanbey ilköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Tekirdağ Tuğlacılar Süper lisesinde okudu. 1998 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde yüksek öğrenimine başladı. 2003 yılında öğrenimini tamamlayarak Kimyager ünvanını aldı. Aynı yıl İ.T.Ü Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda Kimyagerlik Yüksek Lisans Programına başladı.