

ALKOLLÜ İÇKİLERİN ANALİZLERİNDE YARARLANILAN KEMİLÜMINESANS YÖNTEMLER

CHEMILUMINESCENT METHODS IN ALCOHOLIC BEVERAGES

R. Ertan ANLI, Yüksel DENLİ

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

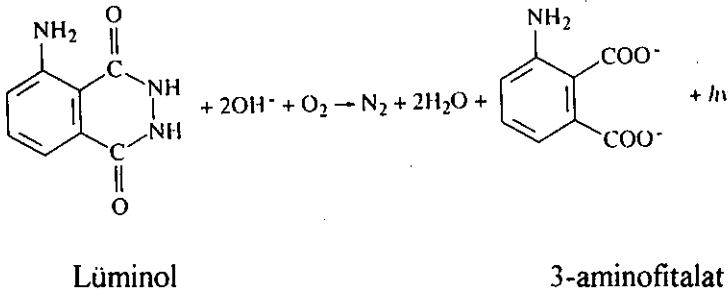
ÖZET: Bu makalede alkollü içkilerin analizlerinde yararlanılan kemilüminesans yöntemler özetlenmiştir.

ABSTRACT: Chemiluminescent techniques employed in alcoholic beverage analysis are summarized.

GİRİŞ

Bir kemilüminesans reaksiyonda elektronik olarak uyarılmış türün temel duruma dönerken yaydığı ışından yararlanır (SKOOG ve LEARY, 1992). Kemilüminesans emisyon, renk, şiddet, oluşma hızı ve şiddetin azalması olmak üzere dört parametre ile karakterize edilir. Reaksiyon koşulları kemilüminesansın oluşumunda önemli etki yapar. Kemilüminesans ışının şiddeti, kimyasal reaksiyonun hızına, uyarılmış durumun oluşuma etkinliğine ve uyarılmış halin kemilüminesans yayma etkinliğine bağlıdır. Kemilüminesans yöntemler son yıllarda üzerinde durulan yöntemlerdir. Bu yöntemin tercih edilmesinin sebepleri duyarlılığının yüksek olması, tespit sınırlarının son derece düşük düzeylere inebilmesi, cevabının hızlı olmasıdır. Bazı durumlarda reaksiyonun yavaşlığı ve uyarılığın düşük olması yöntemin dezavantajları olarak verilebilmektedir (NAVAS ve JIMENEZ, 1999). Kemilüminesans yöntemler için geçerli reaksiyon mekanizmaları verilmeye çalışılmaktadır. Ancak bir çok kemilüminesans tepkime, önerilen tepkimeden çok daha karışık bir tepkimedir.

Kemilüminesans yöntemlerde çoğunlukla luminolün (5-amino-2,3 dihidrofitalazin) O_2 , H_2O_2 veya diğer kuvvetli oksitleyicilerle verdiği kemilüminesans tepkime esas alınır.



Şekil 1. Lüminolün Kemilüminesans Reaksiyonu

KEMİLÜMINESANS YÖNTEMLERİN ALKOLLÜ İÇKİLERDE KULLANILMASI

Kemilüminesans yöntemler gıda analizlerinde yaygın kullanım alanı bulmuştur (NAVAS ve JIMENEZ, 1996). Son zamanlarda alkollü içeceklerde içeceğin bozulması ve bileşenlerinin tayini için kullanıldığı dikkat çekmektedir (NAVAS ve JIMENEZ, 1999).

Kükürt dioksit ve kükürt (IV) oksoanyonların tuzları, ucuzluğu ve etkinliği sebebiyle gıda katkıları olarak tercih edilir. Bu tuzlar, antimikrobiyal özellikte, enzim inhibitörü ve antioksidant özellikleri yanı sıra enzimatik ve enzi-

matik olmayan kararına tepkimelerini de kontrol ederler. Kükürt dioksit antiseptik etkisi ve antioksidan özelliği sebebiyle şarapta koruyucu olarak kullanılır. Ancak kullanımında kısıtlamalar vardır. Bu durum bu bileşiğin tayinini son derece önemli kılmaktadır. Şarapta kükürt dioksit tayini için klasik yöntemler rutin kullanıma uygun değildir. Özellikle titrasyonla kükürt dioksit tayininde dönüm noktasının gözle belirlenmesi, şarap renginden dolayı sonuçlarda kesinliğin azalmasına sebep olur. Bu bileşiklerin klasik yöntemlerle tayininde bir diğer problem de bileşiğin uçucu olmasıdır. Rutin yöntem olarak önerilen iyodometrik yöntem ise yeterince selektif değildir ve analiz süresi uzundur (ANONYMOUS,1989). Bu nedenle doğru ve kesinliği yeterli yöntemler gerekmektedir. Kemilüminometrik yöntemler bu amaçla geliştirilmektedir. Kükürt dioksit tayini için önerilen kemilüminesans metotları, $10^{-5}M-10^{-7} M$ aralığı için uygulanır.

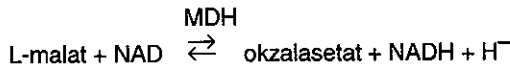
Şarapta kükürt dioksit tayininde kullanılan kemilüminesans tekniklerden BURGUERA ve BURGUERA (1998) tarafından geliştirilen yöntem, asidik ortamda riboflavin sülfat varlığında disülfitemerkürat kompleksinin Ce(IV) ile yükseltgenmesindeki kemilüminesans emisyonu temel almaktadır. Bu yöntemle 5-300 mg/L derişim aralığında SO₂'nin belirlenebileceği, yöntemle elde edilen sonuçların pararozanilin spektrofotometrik yöntemi ile elde edilenlerle uyum gösterdiği, bu yöntemle saatte 40 numunenin analiz edilebileceği, ancak yöntemin kesinliğinin kırmızı şaraplarda azaldığı belirtilmektedir.

Luminolün peroksidad ile katalizlenmiş kemilüminesans özellikteki tepkimesinden (Şekil1) yararlanılarak hidrojen peroksit tayini yapılır. Sülfite bu tepkimeyi baskılamaktadır. Tepkime bu özellik dikkate alınarak sülfite tayini için kullanılabilir (HUANG ve ark. 1992). Serbest sülfite tayininde numunenin sülfirik asit ile etkileşmesi ile oluşan ve gaz difüzyon hücresinden difüzlenen SO₂ derişimi kemilüminesanstaki azalma ile belirlenir. Şarapta sülfite, asetaldehit ve antosiyanin pigmentlerine bağlı olabilir. Toplam sülfite tayini için bu bağlı sülfitin serbest hale geçmesi salğandır. Toplam sülfite tayini, numunenin sodyum hidroksit ve sülfirik asit ile tepkimeye sokulması ve gaz difüzyon hücresinden difüzlenen SO₂ derişiminin kemilüminesanstaki azalma ile gerçekleştirilir. Yöntem bir ekstraksiyon işlemine gerek duyulmaması, uyarlı sonuçlar vermesi ve seçici olması sebebiyle uygun görünmektedir (HUANG ve ark. 1992). Yöntem 10-800 µM sülfite aralığı için uygundur. Serbest ve toplam sülfite tayini bir şarap için 10 dakika sürmektedir (HUANG ve ark. 1992).

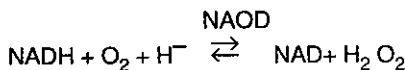
Sülfite tayininde kullanılan bir diğer kemilüminometrik yöntem ise sodyum karbonat ve bakır (II) iyonları arasındaki tepkimeyi esas almaktadır (LIN ve HUBO, 1996). Sülfite iyonları ile Cu(II) iyonları arasında SO₃⁻ radikalleri oluşur. Bu radikaller, HCO₃⁻ iyonları etkileşerek S₂O₆⁻² veya OH⁻ radikali oluşturur. Tepkime, 1,4-dioksietandion ve SO₂'nin uyarılmış hallerine ait 580 nm ve 480 nm'deki piklerden yararlanılarak akış enjeksiyon sisteminde gerçekleştirilir (Şekil 2). Yöntem $1.10^{-6} - 5.10^{-4} M$ sülfite derişimlerinin tayini için uygundur. Tayinde tespit sınırı, $5.10^{-7} M$ 'dir.

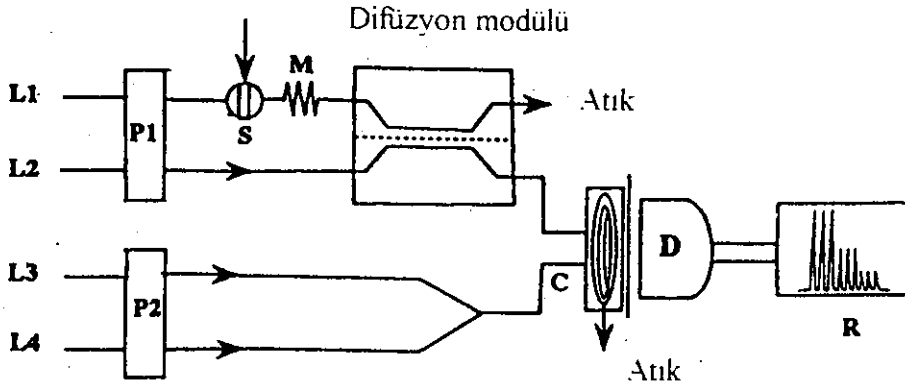
Şarap numenesinin 100-500 kat seyreltilmesi analiz için uygundur. Bu yöntemle geri kazanma verimleri, beyaz ve kırmızı şaraplar için %90-105 aralığındadır. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar iyodometrik titrasyonla elde edilenlerden daima yüksek değerlerdir (LIN ve HUBO 1996).

L-Malik asit, tartarik asitle beraber şarapta en fazla bulunan asittir ve şaraplarda ve özellikle malolaktik fermentasyona uğramış şaraplarda tayini, malolaktik fermentasyonun derecesinin belirlenmesi açısından önemlidir. Şarapta L-malat tayininde enzimatik yöntemler L-malat dehidrojenaz (MDH) enziminden yararlanır. Malat dehidrojenaz ile katalizlenen tepkime



olup bu tepkimenin denge sabiti 6.10^{-13} dir ve bu tepkimeyi ürünler lehine kaydırabilmek için ikinci bir reaktifte ihtiyaç vardır. L-Malatın kemilüminesans tayininde NADH oksidazdan (NAOD) yararlanır. NAOD elektron akseptörü olarak moleküler oksijenin varlığında indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotitin (NADH) oksidasyonunu katalizler.





- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| L 1 : Sülfürik asit | S : Numunenin enjekte edildiği kısım |
| L 2 : Sodyum karbonat | P ₁ ve P ₂ : Peristaltik pompa |
| L 3 : Sodyum hidrojen karbonat | C : Akış hücresi |
| L 4 : Cu (II) sülfat | D : Dedektör |
| M : Reaksiyonun gerçekleştiği kısım | R : Kaydedici |

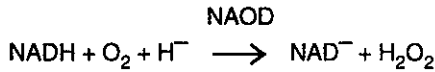
Şekil 2. Sülfid Tayininde Yararlanılan Akış Enjeksiyon Sistemi

Şarapta malik asit tayininde bu iki enzim birlikte polivinil alkol üzerinde immobilize edilir, hazırlanan enzim reaktörü akış enjeksiyon sisteminde kullanılır. Tepkimeler sonrası oluşan H_2O_2 lüminol-hekzasyanoferrat (III) reaksiyonu esas alınarak kemilüminometrik yöntemle tayin edilir. Bu yöntemle $3,0 \cdot 10^{-7}$ M- $2,5 \cdot 10^{-4}$ M aralığında malik asit tayin edilebilir ve saatte 30 örnek analizlenebilir. Yöntemin tespit sınırı, $8 \cdot 10^{-8}$ M dir. Sodyum askorbat ve sodyum sülfid tayinde bozucudur. Tartarat, sitrat, laktat, süksinat ve asetat, 1 mM derişime kadar; etanol 30 mM derişime kadar bozucu etki yapmamaktadır. Enzim reaktörünün D-malata cevabı L-malata verdiği cevabın %2'si kadardır (KIBA ve ark. 1995).

Gliserin, alkol fermentasyonunda yan üründür ve şarabın dolgunluğunu etkiler. Şarapta enzimatik yöntemle gliserin tayini, gliserin dehidrojenaz enziminden yararlanılarak gerçekleştirilir.



tepkimesinin denge sabiti, $5 \cdot 10^{-12}$ dir ve bu tepkimeyi ürünler lehine kaydırabilmek için NAD'nın fazlası kullanılmaktadır. Gliserin dehidrojenazın NADH oksidaz ile birlikte kullanılması durumunda ikinci enzimin katalizlediği tepkime gereği 1. tepkime ürünler lehine kayar. İkinci tepkime;



dir ve tepkimede açığa çıkan H_2O_2 kemilüminometrik yöntemle tayin edilir. İki enzim, polivinil alkol üzerine immobilize edilerek kullanılır. Akış enjeksiyon sisteminde gerçekleştirilen tepkimede $15 \mu\text{M}$ 'dan düşük derişimde sülfidin bozucu etkisi yoktur. Tartarat, sitrat, laktat, süksinat ve asetat, 1 mM derişime kadar bozucu etki yapmaz. $3 \cdot 10^{-7}$ M - $3 \cdot 10^{-4}$ M arasında doğrusal ilişki söz konusudur ve yöntemin tespit sınırı, $7 \cdot 10^{-8}$ M'dir. 1 saatte 30 şarap örneği bu şekilde analiz edebilmektedir. Şarap 1000 kez seyreltilerek kullanılmaktadır. Tayinde şaraptaki etil alkolün bozucu etkisini elimine etmek için standart çözeltiler 5mM etil alkol içerecek şekilde hazırlanırlar. Özellik-

le kırmızı şaraplarla çalışma durumunda enzim reaktöründe polifenol birikimi nedeniyle reaktör 10 günde bir yenilenir (KİBA ve ark. 1996). Kemilüminetrik yöntemin duyarlılığının enzimatik-spektrofotometrik yöntemden 250 kez daha yüksek olduğu ve bir reaktörle 900 numunenin analiz edilebileceği bildirilmektedir.

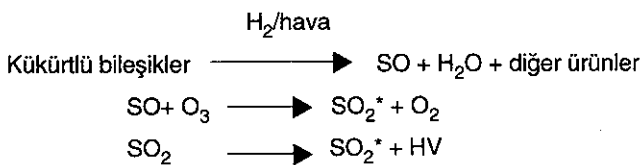
Kemilüminesans yöntemler, biranın bozunmasının belirlenmesinde ve bazı bileşenlerinin tayinlerinde de kullanılmaktadır.

Biranın raf ömrü her zaman en önemli problemi oluşturur. Depolama sırasında bira kalitesi giderek azalırken, bozulma aroması oluşur, bulanıklık ve esmerleşme artış gösterir. Bu değişimler bira komponentlerinin oksidasyonunun sonucunda gerçekleşmektedir. Biranın tadının bozulması genellikle duyu analizi ile değerlendirilmektedir. Ancak bu metotla objektif bir değerlendirme yapmak son derece zordur. Birada çeşitli organik bileşiklerin karbonil bileşiklerine yükseltgenmesi esnasında aktif oksijen ve hidroksit radikalleri oluşmaktadır (KANEDA ve ark 1990 a). Biranın oksidasyonu esnasındaki serbest radikal reaksiyonları kemilüminesans özelliğinin oluşmasına sebep olurlar (KANEDA ve ark 1988) ve bu tepkimeler değerlendirilerek kemilüminesans yöntemle biranın bozulması incelenebilir (KANEDA ve ark 1990 b). Bu araştırmalara göre biranın oksidatif bozulmasını belli bir zaman aralığında kemilüminesans oluşturma modelini inceleyerek değerlendirmek mümkündür (KANEDA ve ark. 1988, 1990a, b, 1991). Ayrıca sıcaklık ve pH'ında biranın aromasında etkili olduğu üzerinde durulmaktadır (KANEDA ve ark 1997). Birada serbest radikallerin depolama sırasında olduğu ve bu maddelerin isohumulon ve doymamış yağ asitleri gibi bazı bileşiklere aldehit ve ketonlara okside ettiği bildirilmektedir. Oluşan bu bileşikler biranın aromasının bozulmasından sorumludurlar (BARKER ve ark. 1983). Kemilüminesans oluşma reaksiyonu, muhtemelen bu radikal reaksiyonların ilk aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır.

Fenolik bileşikler, biranın rengi, tadı ve aromasını etkilerler. Bulanma ve esmerleşmenin temel etkenleridir. Bu bileşikler biranın stabilitesini ve duyu özelliklerini etkilerler. Fenolik bileşikler lüminol-hidrojen peroksit-peroksidaz sisteminin kemilüminesans özelliğini artırır veya azaltırlar. Fenolik asitler içinde bu reaksiyonun kemilüminesans özelliğini en fazla arttıran p-kumarik asittir ve birada bu asitin tayini için kemilüminesans yöntem geliştirilmiştir (GARCIA SANCHEZ ve ark 1995). Çalışmada doğrusal aralık 0-12,5 nM ve tesbit sınırı 0,7 nM'dir. Diğer fenolik asitlerin etkisi ihmal edilecek düzeydedir. Yöntem başlangıç hızı ölçümüne dayanmaktadır.

Mayşe ve birada bulunan yağ asitleri, biranın kalitesi ve maya metabolizmasındaki etkileri nedeniyle önemlidirler. Özellikle linoleik ve linolenik asitlerin oksidatif bozulmaları biranın olgunlaşma sırasındaki aromasını etkiler. Yağların bozunması kemilüminometrik olarak belirlenebilir (USUKI ve ark. 1979). Bu doymuş yağ asitlerinin enzimatik veya ootoksidasyonlarında hidroperoksitler birincil ürün olarak oluşurlar ve oluşan bu ürünlerin malt, mayşe ve biradaki tayinleri kemilüminesans HPLC ile tayin edilebilir (KOBAYASHI ve ark 1993). Bu metotta HPLC kolonunda ayrılan hidroperoksitler, lüminesans reaktifle karıştırılır ve oluşan kemilüminesans belirlenir. Hidroperoksitler, sitokrom C veya mikroperoksidad ile etkileştirilir ve aktif oksijen üreten peroksiradikalleri oluşturulur ($2RCOO \rightarrow ^1O_2 + ROH + RC = O$) (KELLOG. 1969). Aktif oksijen, bazik ortamda lüminol veya izolüminolle etkileşerek kemilüminesansın oluşumuna sebep olur. Arpa, malt ve mayşede trilinolein hidroksiperoksitler de aynı yöntemle tayin edilebilir.

Hidrojen sülfür (H_2S), karbonil sülfür (COS), kükürt dioksit (SO_2), tiyoller (RSH), sülfürler (RSR), polisülfürler (RS_nR , $n=2,3...$) ve tiyoeterler ($RCOSR$), biranın uçucu kükürt bileşikleridir. Bunların çoğu birada koku problemlerine ve organoleptik özelliğinin bozulmasına sebep olurlar. ppb düzeyinde H_2S 'in analizi son derece zordur. Birada H_2S 'in tayini için membran ekstraksiyon sistemi kükürt kemilüminesans dedektör (SCD) ile birlikte kullanılmaktadır. SCD dedektörünün prensibi aşağıdaki tepkimelere dayanmaktadır.



SCD dedektörü kullanılarak statik üst fazı tekniği ile kükürt bileşiklerinin tayini yapılabilmektedir. (NEDJMA ve MAUJEAN, 1995). Bu yöntem Cu(II) iyonlarının varlığında alkollü içeceklerde H₂S'nin tiyoller (metantiyol ve etantiyol) ile etkileşimiyle simetrik ve simetrik olmayan dialkil trisülfürlerin oluşumunu izlemek için de kullanılmaktadır (NEDJMA ve HOFFMANN, 1996).

SONUÇ

Kemilüminesans tepkimelerle şarapta sülfid, malat, gliserin tayinleri yapılabilir. Biranın bozunmasının belirlenmesi ve doymuş yağ asitleri ve p-kumarik asit gibi bazı bira bileşenlerinin analizlerinde de bu yöntemlerden yararlanılabilir. Kükürt kemilüminesans dedektörden (SCD) yararlanılarak alkollü içkilerde kükürt bileşiklerinin tayini de mümkündür.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS. 1989. Şaraplarda Kimyasal Analitik Yöntemler ve Şarap İşletmeleri Denetimi. Tekel Enstitüleri. Yayın No. 33.
- BARKER, R.L. GRACEY, D.E.F., IRWIN, A.J., PIPATS, P. and LEISKA, E. 1983. Liberation of staling aldehides during storage of beer. *J. Inst. Brew.* 89, 411-413.
- BURGUERA, J.L., BURGUERA, M. 1998. Determination of sulfur dioxide in young white wines by flow injection with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 214, 429-432.
- GARCIA SANCHEZ, F., NAVAS DIAZ, A., GONZALES GARCIA, J.A. 1995. Study of the enhanced chemiluminescence from the luminol-horseradish peroxidase-hydrogen peroxide-p-coumaric acid system at very short times stopped flow selective determination of p-coumaric acid in beers. *Anal. Chim. Acta.* 310, 399-406.
- HUANG, Y.L., KIM, J.M., SCHMID, R.D. 1992. Determination of sulfite in wine through flow-injection analysis based on the suppression of luminol chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta.* 266, 317-323.
- KANEDA, H., KANO, Y., OSAWA, T., RAMARATHNAM, N., KAWAKISHI, S. and KAMADA, K. 1988. Detection of free radicals in beer oxidation. *J. Food Sci.* 52, 885-882.
- KANEDA, H., KANO, Y., KAMIMURA, M., OSAWA, T. and KAWAKISHI, S. 1990a. Detection of chemiluminescence Produced during beer oxidation. *J. Food Sci.* 55, 881-882.
- KANEDA, H., KANO, Y., KAMIMURA, M., OSAWA, T. and KAWAKISHI, S. 1990b. Evaluation of beer deterioration by chemiluminescence. *J. Food Sci.* 55, 1361-1364.
- KANEDA, H., KANO, Y., KAMIMURA, M. 1991. A study of beer staling using chemiluminescence analysis. *J. Ins. Brew.* 97, 105-109.
- KANEDA, H., TAKASHIO, M., TAMAKI, T. 1997. Influence of pH on flavor staling during beer storage. *J. Ins. Brew.* 103, 21-23.
- KELLOGG, R.E., 1969. Mechanism of chemiluminescence from peroxy radical. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 5433-5437.
- KIBA, N., INAGAKI, J., FURUSAWA, M. 1995. Chemiluminometric flow injection method for determination of free L-malate in wine with co-immobilized malate dehydrogenase/NADH oxidase. *Talanta.* 42, 1751-1755.
- KIBA, N., AZUMA, N., FURUSAWA, M. 1996. Chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow injection analysis with co-immobilized glycerol dhydrogenase/NADH oxidase. *Talanta.* 43, 1761-1766.
- KOBAYASHI, N., KANEDA, H., KANO, Y., KOSHINO, S. 1993. Determination of fatty acid hydroperoxides produced during the production of the wort. *J. Inst. Brew.* 99, 143-146.
- LIN, J.M., HUBO, T. 1996. Flow injection anlysis with chemiluminescent detection of sulfite using Na₂CO₃ - NAHCO₄ - Cu²⁺ system. *Anal. Chim. Acta.* 323, 69-74.
- NAVAS, M.J. and JIMENEZ, A.M. 1996. Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chem.* 55, 7-15.
- NAVAS, M.J. and JIMENEZ, A.M. 1999. Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47, 183-189.
- NEDJMA, M., MAUJEAN, A. 1995. Improved chromatographic analysis of volatile sulfur compounds by the static headspace technique on water-alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A.* 704, 495-502.
- NEDJMA, M., HOFFMANN, N. 1996. Hydrogen sulfide reactivity with thiols in the presence of copper (II) in hydroalcoholic solutions or cognac brandies: Formation of symmetrical and unsymmetrical dialkly trisulfides. *J. Agric. Food Chem.* 44 (12), 3935-3938.
- SKOOG, D. A and LEARY, J.J. 1992. Principles of Instrumental Analysis 4th Edition. Saunders Collage Publishing. New York.
- USUKI, R., KANEDA, TY, YAMAGASHI, A., TAKYU, C., and INABA, H. 1979. Est. mation of oxidative deterioration of oils and foods by measurement of ultraweak chemiluminescence *J. Food Sci.* 44, 1573-1577.