

# Biyojen Amin Analiz Yöntemleri

Özgül Özdehan, Ali Üren

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 35100 Bornova, İzmir

## ÖZET

Potansiyel toksisitelerinden dolayı çeşitli gıdalarda bulunan biyojen aminlerin analiz edilerek belirlenmesi oldukça önemlidir. Gıdaların matrisi kompleks olduğundan biyojen aminlerin analizi oldukça zordur. Bu nedenle kromatografik analizden önce gıdalardaki biyojen aminlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması gerekir. Saflaştırma aşamasından sonra biyojen aminler uygun türevlerine dönüştürülüp çoğunlukla yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilirler. Benzoil klorür, o-fitaldialdehit (OPA) ve dansil klorür en çok kullanılan türevlendirme reaktifleridir. Türevlendirme genel olarak kolon öncesi uygulanır. Bu derlemede farklı gıdalardaki biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analiz yöntemleri anlatılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Biyojen aminler, histamin, HPLC

## ABSTRACT

It is of considerable importance to analyse food materials for biogenic amines because of their potential toxicity. It is difficult to determine biogenic amines in foods as the matrix is very complex. Therefore, extraction and purification steps must be undertaken prior to chromatographic analysis. After the purification step biogenic amines are converted to their derivatives and analyzed generally by high performance liquid chromatography (HPLC). Benzoyl chloride, o-phthalaldehyde (OPA) and dansyl chloride are the most common derivatization agents. In general, precolumn derivatization is applied. This paper explains analytical methods to determine biogenic amines in different kind of foods.

**Key words:** Biogenic amines, histamine, HPLC

## GİRİŞ

Biyojen aminler doğal olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan organik bazlı, düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir ve canlı hücrelerde önemli metabolik işlevleri vardır. Poliaminler canlılığın büyüme ve gelişmesi için zorunludur. Histamin ve tiramin gibi diğer aminler sinir sisteminin çalışmasında ve kan basıncının kontrolünde gereklidir. Bazı fermente gıdalarda ve bazı bozulmuş veya bayatlamış gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucu, amino asitlerin dekarboksilasyonu ile yüksek konsantrasyonlarda biyojen aminler oluşur [1-3]. Balık ve ürünleri, et ve ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, meyve ve sebzeler, çikolata, fermente sebze ürünleri gibi gıdalarda biyojen aminler meydana gelebilmektedir [4]. Gıdalarda oluşan başlıca biyojen aminler putresin, kadaverin, histamin, tiramin, triptamin, -feniletilamin, spermin, spermidin, metilamin, etilamin ve etanolamindir [5]. Biyojen aminler kimyasal özelliklerine göre üç gruba ayrılmaktadırlar.

- 1- Aromatik aminler
- 2- Alifatik di-, tri- ve poli-aminler
- 3- Alifatik uçucu aminler

İçerdikleri azot sayısına göre ise biyojen aminler; monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak üç gruba ayrılırlar (Tablo 1) [6].

**Tablo 1. Biyojen aminlerin sınıflandırılması**

Kimyasal yapılarına göre	Aromatik aminler	Alifatik di-, tri- ve poliaminler	Alifatik uçucu aminler
	Histamin Tiramin $\beta$ -feniletilamin Triptamin Serotonin	Putresin Kadaverin Ağmatin Spermin Spermidin	Metilamin Etilamin İzopentilamin Etanolamin
İçerdikleri azot sayısına göre	Monoaminler	Diaminler	Poliaminler
	Metilamin Etilamin İzopentilamin Etanolamin $\beta$ -feniletilamin Tiramin	Histamin Triptamin Putresin Kadaverin Serotonin	Ağmatin Spermin Spermidin

Mikroorganizmalar tarafından biyojen amin oluşumu için gerekli koşullar şu şekilde özetlenebilir:

- Serbest aminoasitlerin varlığı,
- Dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların varlığı,
- Bakteriyal gelişim, dekarboksilaz sentezi ve aktivitesine izin veren koşulların olmasıdır [4].

Biyojen aminlerin gıda açısından önemi bu ürünlerin potansiyel toksisitesinden kaynaklanmaktadır. Başağrısı, solunum güçlüğü, kalp çarpıntısı, yüksek veya düşük tansiyon ve daha başka allerjik reaksiyonlara neden olurlar [6].

Normal koşullarda gıdalarla insan vücuduna alınan biyojen aminler vücudun sindirim sisteminde bulunan monoamino oksidaz (MAO), diamino oksidaz (DAO) ve histamin-N-metil transferaz enzimleriyle detoksifiye edilmektedirler. Böylece çok yüksek miktarda tüketilmedikleri takdirde insan sağlığı üzerine olumsuz bir etki göstermemektedirler [7-9]. Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri, sindirim sisteminde bulunan monoamino oksidaz ve diamino oksidaz enzimlerinin genetik olarak eksikliğinde, bu enzimleri inhibe edici ilaçlar kullanıldığında (ağrı kesiciler, stres ve depresyon ilaçları, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar) veya yüksek miktarlarda alkol tüketildiğinde artmaktadır [10,11].

Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin belirlenmesi yalnızca bu bileşiklerin toksisiteleri açısından değil, aynı zamanda gıdalarda tazelik ve mikrobiyal bozulmanın, yani kalitenin indikatörleri olması açısından da önem taşımaktadır [11,12].

## BİYOJEN AMİN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Histamin ve diğer biyojen aminlerin nitel ve nicel tayinleri için florimetri, kromatografi, kapiler elektroforez v. b. gibi teknikler kullanılmaktadır. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler en uygun yöntemlerdir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) biyojen amin analizlerinde yoğun bir

şekilde kullanılan kromatografik yöntemlerdir [13]. Bunlar içinde HPLC en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemle biyojen amin analizi için, kolon öncesi ya da kolon sonrasında, dansil klorür, ortofitaldialdehit (OPA), benzoil klorür, dabsil klorür, dinitrobenzoil klorür v.b. gibi türevlendirme reaktiflerinden biriyle biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekmektedir [14]. Bu türevlendirme reaktiflerinden biri olan OPA biyojen aminlerle oldukça hızlı reaksiyon vermektedir, fakat sadece birincil aminlerin türevlendirilmesinde kullanılabilir [14]. Benzoil klorür türevleri oldukça stabil olup, bu türevlendirme reaktifinin kullanımı da bazı açılardan avantajlıdır [15]. Dansil klorür pek çok çalışmada kullanılmıştır [16-18]. Dabsil klorür iyi bir türevlendirme reaktifi olup, birincil ve ikincil aminlerin dabsil türevleri oda sıcaklığında oldukça karardır [19]. Biyojen amin analizlerinde C<sub>18</sub> kolon kullanılmakta, derceci elüsyon uygulanmaktadır. OPA türevleriyle çalışıldığında fluoresans dedektör, diğerlerinde UV dedektör kullanmak gerekmektedir.

#### Ekstraksiyon ve saflaştırma

Genelde gıdaların matriksi kompleks olduğundan kromatografik analizden önce ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin uygulanması gerekir. Bu basamaklar oldukça kritiktir ve geri kazanımları etkilemektedir. Ekstraksiyon ve saflaştırmanın amacı yabancı maddeleri uzaklaştırmaktır, fakat bu sırada biyojen amin kayıpları olmamalı veya olabildiğince az olmalıdır. Biyojen aminlerin polarlıkları birbirinden oldukça farklıdır. Tiramin, triptamin ve -feniletilaminin polarlığı diğerlerinden daha azdır (örneğin pH 11,5 te). pH 9 un altında ise biyojen aminler tuzları şeklindedir. Bu pH nin altında tiramin, triptamin ve -feniletilaminin polarlığı değişmezken diğerlerinin polarlığı artar. Biyojen aminlerin polarlıklarının birbirinden farklı olması ve ayrıca biyojen amin tuzlarının polarlıklarının birbirinden farklı olması, dikkat edilmediği takdirde, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sırasında biyojen amin kayıplarına neden olur. Katı matriksten biyojen aminlerin ekstraksiyonu su ile oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Ancak bu yöntemle sadece serbest biyojen aminler ekstrakte edilebilir. Bağlı aminlerin ekstraksiyonu ancak asitlerle gerçekleştirilebilir. Biyojen aminlerin ekstraksiyonu için perklorik asit, trikloroasetik asit (TCA) veya hidroklorik asit kullanılabilir. Bazı araştırmacılar tarafından katı matriksten biyojen aminlerin ekstrakte edilmesinde metanol, aseton, asetonitril-HClO<sub>4</sub> ve diklorometan-HClO<sub>4</sub> gibi organik solventler kullanılmıştır, oysa biyojen amin kayıplarının olmaması için organik solventlerle bazik pH de (pH 11,5 civarında) ekstraksiyon yapılması gerekirdi. Şarap, bira ve turşu salamurası gibi kompleks olmayan örneklerle çalışırken ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerine gerek yoktur. Süzme, santrifüjleme v.b. gibi basit işlemlerden sonra, veya girişim yapan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra hemen türevlendirmeye geçilebilir. Busto ve ark. [16] dansil klorür türevlendirmesi ile şaraplardaki biyojen aminleri çalışmadan önce, girişim yapan fenolik maddeleri uzaklaştırmak için şarapları polivinilprolidon (PVPP) ile muamele etmişlerdir.

Kompleks gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonu sonucu elde edilen çözeltinin saflaştırılarak girişim yapan maddelerden arındırılması gerekir. Bu amaçla sıvı sıvı ekstraksiyonu (LLE), C<sub>18</sub> kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) veya alumina veya iyon değiştirici içeren kolon kromatografisi kullanılabilir [16]. Sıvı sıvı ekstraksiyonunda, genellikle HCl veya TCA içeren ekstraktın saflaştırılması için, bu sulu ekstrakt uygun bir tuz (örneğin NaCl) ile doyurulur, pH si bazik yapılır ve organik bir solventle muamele edilerek biyojen aminlerin organik faza geçmesi

sağlanır. Tüm biyojen aminlerin kantitatif bir şekilde sulu fazdan organik faza geçmesi için çeşitli organik çözücüler denenmiştir. Ayrıca, uygun bir organik faz seçilmediği zaman jel oluşumu veya buna benzer olumsuzluklar ortaya çıkabilmektedir. Hegzan, dietileter, n-bütanol, kloroform gibi organik çözücülerin veya bunların karışımlarının kullanıldığı yöntemler ileri sürülmüştür [20-22]. Ekstraksiyonda kullanılan asidin tipi, saflaştırmada kullanılan organik solventin bileşimi, kullanılan tuzun tipi, çalışılan pH ve karıştırma süresi gibi faktörler gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonunu ve saflaştırma işlemini etkileyen faktörlerdir. pH biyojen aminlerin sulu fazdan organik faza aktarılmasında çok önemli bir faktördür. Farklı biyojen aminler farklı kimyasal yapılara sahip olduklarından farklı optimum pH ler söz konusudur. pH 11,5 değeri genelde uygundur. pH 11,5 den yüksek olduğunda tiramin geri kazanımı düşmektedir, pH 10 değeri ise tiramin için optimum pH dir, ancak putresin, kadaverin, spermin, spermidin ve histamin için uygun değildir [17]. Biyojen aminler organik faza aktarıldıktan sonra, bir kez daha saflaştırmak için organik faz 0,1 M HCl ile çalkalanarak aminlerin sulu faza geçmesi sağlanabilir. Bu işlem safsızlıkların uzaklaştırılmasında faydalı olacaktır, fakat biyojen amin kayıplarına neden olabilir. Elde edilen HCl li faz türevlendirme işleminde kullanılır. HCl ile yapılan son ekstraksiyon uygulanmayıp, biyojen aminleri içeren organik faz doğrudan türevlendirmede kullanılabilir. Bu amaçla organik faz uçurular, elde edilen kalıntı türevlendirmede kullanılır.

Bazı gıdalarla çalışırken ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sadece ekstraksiyon kullanılabilir. Gıdadaki biyojen aminler uygun bir solventle, örneğin 0,1 M HCl veya % 5 lik TCA, ekstrakte edilir ve bu ekstrakt türevlendirmede kullanılabilir. Bu şekilde amin kayıpları azaltılabilir ve zamandan tasarruf edilebilir. Bu teknikle çalışıldığında amino asitler ortamdan uzaklaştırılmadığından girişim yapan piklerin oluşumuna neden olabilirler ve ayrıca daha fazla reaktif, örneğin benzoil klorür, kullanımına gerek duyulabilir. Fazla reaktif kullanımı kromatogramı olumsuz etkileyebilir. Fazla reaktif kullanımından kaçınmak için daha seyrek örneklerle çalışmak olasıdır, fakat bu durumda da yöntemin duyarlılığı azalır.

Lange ve ark. [23] tarafından farklı gıda örneklerinde biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada amin ekstraksiyonu için 0,1 M HCl, TCA (% 5 veya 10 luk), metanol ve metanol-su çözeltisi (% 50 veya 75 lik) kullanılmıştır. Tüm gıda örnekleri ekstraksiyon öncesi blender veya öğütücü kullanılarak homojenize edilmiştir. 10 g gıda örneği (peynir hariç) 2 kez 25 er ml solventle ekstrakte edilmiş ve 8000 rpm de 3 dk süreyle blendırda muamele edilmiştir. On dk 4000 rpm de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvılar filtre kağıdından süzülüş ve 50 ml ye tamamlanmıştır. Peynir örneklerinin analizinde ise 10 g peynir örneği 20 ml 0,1 M HCl ile muamele edilmiş ve vorteks karıştırıcıda 5 dk süreyle karıştırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı toplanmıştır. Ekstraksiyon 20 ml 0,1 M HCl ile 3 kez tekrar edilmiştir. Üstteki sıvılar bir araya getirilmiş ve yağın çoğunu kristalize etmek için 4 °C da tutulmuştur. Topaklanmış olan yağ tabakası uzaklaştırılmış ve sıvı kısım süzülümüştür. Kapiler elektroferez yöntemiyle analiz için ekstraktlar membran filtrasyon işlemine tabi tutulmuş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Peynir örneği dışındaki diğer örneklerde % 5 TCA kullanılması uygun bulunmuştur (Tablo 2).

Analizler HPLC yöntemiyle gerçekleştirildiğinde, bir nötralizasyon basamağı (pH 6-7 ye getirilmiştir) ve ardından n-bütanol kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon basamağı veya katı faz ekstraksiyonu yöntemlerinden biri kullanılarak bir

saflaştırma basamağına gerek duyulmuştur. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda 1 ml örnek ekstraktı, 0,25 ml 5 M NaOH, 0,75 g NaCl ve 5 ml n-bütanol ile karıştırılmış ve 3 dk süreyle çalkalanmıştır. 4000 rpm de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş, n-bütanol tabakası ayrılmıştır. Sulu faz (1,25 ml) 5 ml n-bütanol ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Her ekstraksiyon basamağı sonunda n-bütanollu fazlar, NaCl ile doyurulmuş 5 ml 0,1 M NaOH içeren tüpte toplanmıştır. Bu 2. santrifüj tübü de aynı yolla çalkalanmış ve santrifüj edilmiştir. 8 ml lik bütanol ekstraktı 2,5 ml 0,1 M HCl ve 7 ml n-heptan içeren 3. bir tübe aktarılmış, 1 dk süreyle çalkalanmış ve santrifüj edilmiştir. Organik kısım uzaklaştırıldıktan sonra, biyojen aminleri içeren asidik sulu faz (2,5 ml) kolon öncesi OPA türevlerine dönüştürülerek analiz edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucunda biyojen aminler için elde edilen geri kazanım değerleri histamin için neredeyse % 100, tiramin için % 76, putresin için % 94 ve kadaverin için % 100'dür.

Tablo 2. Gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonunda kullanılan solventler

Gıda	Ekstraksiyon solventi
Balık	
Som balığı	TCA, HCl, metanol
Ringa	TCA
Peynir	
Rokfort	HCl, TCA, metanol
Gorgonzola	HCl
Edamer	HCl
Et ürünleri	
Salam	TCA, HCl, metanol
Domuz eti	TCA
Vejetaryan ürünleri	
Yağlı zeytin	Su, metanol, TCA, HCl
Yağlı domates	TCA
Konserve sauerkraut	TCA

Katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırmada ise RP-18 BakerBond kartuş (3 ml hacminde) kullanılmıştır. Üç ml metanol ve ardından kolon hacminin 3 katı hacimde destile su ve 3 ml 1 M HCl ile kolon şartlandırıldıktan sonra 3 ml örnek ekstraktı kolono uygulanmıştır. 0,1 M potasyum sitrat tamponu (hacmi gıda matrisine bağlı olarak değişir) ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Sonra kolondaki hava uzaklaştırılmış ve elüsyon 3 ml 0,1 M potasyum sitrat-izopropanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma basamağında SPE kullanımında aktivasyon, dengeleme, yıkama ve elüsyon olmak üzere çok sayıda basamak vardır ve oldukça zaman kaybı olmaktadır [23].

Üren ve ark. [24] tarafından lahanada turşularında gerçekleştirilen çalışmada örnek, salamurası ile havanda

ezildikten sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzülmüş, filtrat saf suyla belli bir hacme tamamlandıktan sonra belli miktarı herhangi bir ekstraksiyona veya saflaştırmaya tabi tutulmadan benzoil klorür ile türevlendirilip HPLC cihazında incelenmiştir.

Kalac ve Krizek [25] mantar örneklerinden biyojen aminleri ekstrakte etmek için perklorik asitten yararlanmışlardır. Örnekler seyreltik perklorik asit ile 60 dk süreyle çalkalanmıştır. Daha sonra benzoil klorür ile türevlendirilen örnekler HPLC de analizlenmişlerdir. Putresin ve kadaverin için elde edilen geri kazanım değerleri % 95,4 ve % 89,5 dir.

Kalac ve ark. [26] 25 g dondurulmuş ispanak püresi, ketçap, konsantre salça veya dondurulmuş yeşil bezelye örneğini 75 ml 0,6 M perklorik asit ile 1 saat süreyle çalkalamıştır. Örnekler 4000 rpm de 10 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Süzme işleminden sonra örnekler elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi ile analiz edilmiştir.

Hwang ve ark. [15] nın balık örneklerinde yaptıkları çalışmada, blendırda parçalanmış 5 g örnek 20 ml % 6 lık TCA çözeltisi veya 1 M HClO<sub>4</sub> ile 3 dk süreyle homojenize edilmiştir. Örnekler 1 er mg biyojen amin standardı katılmıştır. Daha sonra 8000 g de ve 4°C da 10 dk santrifüj edilen örnekler süzülmüş, 50 ml ye seyreltilmiş ve benzoil klorür ile türevlendirilen örnekler HPLC cihazında analiz edilmiştir. Balık etinde % 6 lık TCA çözeltisi ve 1 M HClO<sub>4</sub> ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri sırasıyla şöyledir; -feniletilamin % 101,2 ve 99, histamin % 100,5 ve 100,2, triptamin % 98,2 ve 98, putresin % 76,5 ve 64,2, kadaverin % 70 ve 55,8, spermidin % 63,6 ve 50,9, spermin % 63,0 ve 33,0, tiramin % 35 ve 101,2, agmatin % 4,5 ve 3,0 dür. Bu sonuçlara göre biyojen aminlerin çoğu için (agmatin ve tiramin hariç) % 6 lık TCA ile yapılan ekstraksiyonun daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Shakila ve ark. [13] tarafından balık örneklerinde yapılan çalışmada örnekler % 5 lik sıcak TCA çözeltisi (80-90 °C) ile 2 dk süreyle homojenize edilmiş ve 3000 rpm hızda 10 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Üsteki sıvı Whatman (41) filtre kağıdından süzülerek, dansil klorür ile türevlendirilmiş ve HPLC de analizler gerçekleştirilmiştir

Türk sucuklarında, starter kültür kullanımının biyojen amin oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 2 g örnek 10 ml 0,4 M perklorik asitle vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, 40 ml daha perklorik asit ilave edilmiştir. On ml karışım 1250 g de 20 dakika santrifüj edilmiş, üstteki sıvı kısımdan 1 ml alınmış, dansil klorür ile türevlendirilmiş ve analizler HPLC de gerçekleştirilmiştir [27].

Vinci ve Antonelli [28] tarafından gerçekleştirilen çalışmada kırmızı (siğir eti) ve beyaz etteki (tavuk eti) biyojen amin miktarları belirlenmiştir. Analiz için örnek hazırlama basamağı her iki tip örnekte de aynıdır. Beş g doğranmış ete 20 ml 0,4 M HClO<sub>4</sub> ilave edilmiş, örnekler homojenize edilmiş ve daha sonra 5 dk süreyle 2500 rpm de santrifüj edilmiştir. Dipte toplanan katı kısım aynı prosedür ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı fazlar toplanmış ve 0,4 M HClO<sub>4</sub> ile 50 ml ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltiden 1 ml alınıp dansil klorür ile türevlendirme yapılmış ve HPLC de biyojen amin analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda tüm biyojen aminlerin geri kazanım değerleri  $\geq$  % 93 olarak bulunmuştur. Bulunan aminler triptamin, putresin, kadaverin, serotonin, tiramin, spermin ve spermidindir Ordenez ve ark. [9] peynirdeki biyojen aminleri asetonitril ve

Peynir örneklerinde biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, 50 g peynir örneği 3 kez 75 ml % 5 lik TCA ile blendırda karıştırılmıştır. Her bir karışım santrifüjlenmiş, TCA ekstraktları birleştirilmiş ve hacim 250 ml ye tamamlanmıştır. Bu ekstraktan 10 ml alınarak, NaOH ile alkali yapıldıktan sonra n-bütanol-kloroform karışımı ile (3x5 ml) aminler ekstrakte edilmiştir. Bir araya getirilen organik fazlara 15 ml n-heptan ilave edildikten sonra, birkaç kez 1 ml 0,02 M HCl kullanılarak, aminler HCl li faza aktarılmıştır. HCl li fazın suyu uzaklaştırıldıktan sonra dansil klorür ile biyojen aminlerin türevleri elde edilmiş ve aminler TLC ile belirlenmiştir. Peynir örneklerinde biyojen aminlerin geri kazanım yüzdeleri, putresin % 94, kadaverin % 100, tiramin % 84, triptamin % 84, spermin % 98, histamin % 96, spermidin % 102 ve -feniletilaminin % 86 olarak bulunmuştur [21].

Moret ve Conte [17] ye göre 0,1 M HCl peynirdeki biyojen aminlerin ekstraksiyonu için çok uygun bir çözücü olmakla birlikte balık ve et ürünleri için uygun değildir, bulanıklığa ve girişim yapan piklerin oluşumuna neden olur. Balık ve et ürünleri ile çalışılırken proteinleri çöktürme özelliği olan % 5 lik triklorasetik asit (TCA) kullanılmalıdır. Moret ve Conte [17] gerçekleştirdikleri çalışmada biyojen aminlerin ekstraksiyonu için 10 g peynir örneğini 2 kez 20 ml 0,1 M HCl ile homojenize etmişlerdir. Balık ve et ürünlerinde ise 3 kez 15 ml % 5 lik TCA ile ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra asidik ekstrakt NaCl ile doyurulmuş ve pH 11,5 e ayarlanmıştır. Saflaştırma işlemi için bir organik solventten yararlanılmıştır. Peynir örneklerinde n-bütanol, balık ve et ürünlerinde n-bütanol-kloroform karışımı kullanılmıştır. Türevlendirme aşamasında organik ekstraktan 1 ml alınmış, vakum altında çözgen uzaklaştırılmış, dansil klorür ile türevlendirilmiş ve analizler HPLC de gerçekleştirilmiştir. Gorgonzola peynirindeki geri kazanımlar, triptamin için % 74, -feniletilamin % 92, putresin % 2, kadaverin % 65, histamin % 63, tiramin % 63, spermidin % 49 ve spermin % 46 şeklindedir. Bu değerler Lange ve ark. [23] nin bulunduğu değerlerden daha düşüktür. Türevlendirme işlemlerinin farklı olması nedeniyle geri kazanım değerleri farklı çıkmış olabilir.

Van-Boekel ve Arentsen-Stasse [20] tarafından gerçekleştirilen çalışmada peynir örneklerindeki aromatik biyojen aminler belirlenmiştir. Bu çalışmada 10 g peynir örneği 25 ml % 5 lik TCA ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 3°C a soğutulduktan sonra 3°C da santrifüj edilmiş ve yağ tabakası uzaklaştırılmıştır. Süzme işleminin ardından 5 ml filtrat saf suyla 50 ml ye tamamlanmış ve herhangi bir türevine dönüştürülmeden aromatik biyojen aminler HPLC de analiz edilmiştir.

Vale ve Gloria [22] peynir örneklerindeki 10 farklı biyojen aminin (histamin, tiramin, triptamin, -feniletilamin, serotonin, agmatin, spermin, spermidin, putresin ve kadaverin) HPLC de analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Kolon sonrası türevlendirme reaktifi olarak OPA kullanılmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak metanol, HCl ve TCA denenmiştir. Ekstraksiyon amacı ile HCl kullanıldığında 10 g rendelenmiş peynir 50 ml lik santrifüj tüpüne tartılıp, 20 ml 0,1 M HCl ile vorteks karıştırıcıda 5 dk süreyle karıştırılmıştır. Karışım 6000 g de, 30 dk süreyle oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı kısım toplanmıştır. Katı kısım 20 ml HCl ile 3 kez daha ekstrakte edilmiştir. Üstteki sıvı kısımlar bir araya getirilmiş ve 4°C da yağların çoğu kristalize edilmiştir. Toplanan yağ tabakası uzaklaştırılmış ve çözelti süzümüştür. TCA kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde yukarıdaki prosedürün aynısı HCl yerine % 5 lik TCA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metanol kullanılarak gerçekleştirilen

ekstraksiyon işleminde ise 10 g peynir örneği 50 ml metanol ile homojenize edilmiş ve 100 ml lik balona aktarılmıştır. Balon içeriği 60°C da 15 dk ısıtılmış, oda sıcaklığına soğutulmuş, metanol ile 100 ml ye tamamlanmış ve 15 dk süreyle 6000 g de santrifüj edilmiştir. Ekstrakt 4°C da depolanmış, yağ tabakası uzaklaştırılmış ve süzümüştür.

Vale ve Gloria [22] saflaştırma amacıyla dietileter veya n-bütanol kullanmıştır. Dietileter kullanıldığında, ekstraksiyonda ele geçen her sıvı kısım 3 kez 50 ml dietileter ile ekstrakte edilmiştir. Eterli faz dönerli buharlaştırıcıda 40°C da vakum altında 2-3 ml kalıncaya dek buharlaştırılmış, 0,1 M HCl ile hacim 10 ml ye tamamlanmış ve santrifüj edilmiştir. HCl li faz 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip membrandan süzümüştür. n-Bütanol kullanıldığında ise ekstraksiyon sırasında elde edilen sıvı kısımların 5 ml si, 1 ml 5 M NaOH içeren test tübüne aktarılmıştır. Granül halindeki Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fazla miktarda eklenmiş, karışım hızla çalkalanmıştır. Altı ml n-bütanol ilave edilmiş, karışım hızla çalkalanmış ve organik faz toplanmıştır. Sulu faz 2 kez daha aynı şekilde n-bütanolle ekstrakte edilmiştir. Bütanolü ekstraktlar bir araya getirilmiş ve 5 ml 0,1 M HCl eklenmiştir. Hızla çalkalandıktan sonra HCl li faz toplanmış ve bu işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. HCl li fazlar bir araya getirilmiş ve 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip membrandan süzümüştür. Sonuçta HCl ile ekstraksiyon ve dietileter kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırmanın aminler için en iyi geri kazanım değerlerini verdiği ileri sürümüştür. HCl ile ekstraksiyon ve dietileter ile saflaştırma yöntemini daha etkin kılmak için, dietileter ile ekstraksiyona geçmeden önce HCl li fazın NaCl ile doyurulması ve pH sinin 11,5 e getirilmesi gerekirdi. Diğer taraftan HCl ile ekstraksiyon, n-bütanol ile saflaştırma yöntemiyle elde edilen geri kazanım değerleri, Moret ve Conte [17] nin Gorgonzola peyniri için bulunduğu değerlerden daha küçüktür (histamin ve putresin hariç). Çünkü Vale ve Gloria [22] n-bütanol ile ekstraksiyondan önce ortamın pH sini tam 11,5 e getirmemiştir. Buna ek olarak n-bütanolde tekrar HCl li faza alırken de biyojen amin kayıpları olabilir. Moret ve Conte [17] biyojen aminleri içeren n-bütanolü fazın 1 ml sini alıp n-bütanolü uzaklaştırmışlar ve kalıntıda biyojen aminleri aramışlardır. Bu şekilde amin kayıpları azaltılmıştır. Türevlendirme reaktiflerinin farklı olması da sonuçları etkilemiş olabilir. Vale ve Gloria [22] kolon sonrası OPA türevlendirmesi uygularken, diğer çalışmada dansil klorür kullanılmıştır. Vale ve Gloria [22] nin bulunduğu değerler, örneğin HCl n-bütanol seçeneği, Lange ve ark. [23] nin değerlerinden oldukça düşüktür. OPA nin kolon sonrası kullanılması, NaCl yerine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in tercih edilmesi ve biyojen aminlerin n-bütanolü fazdan HCl li faza aktarılması sırasında n-heptan kullanılmaması buna neden olabilir.

Azim [6] tarafından gerçekleştirilen çalışmada etilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β-feniletilamin, spermidin, spermin ve tiraminden oluşan bir standart karışım hazırlanmış, biyojen aminlerin saflaştırılması için optimum koşulları belirlemek amacıyla denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri karşılaştırıldığında en uygun saflaştırma koşulları şöyle belirlenmiştir. Standart biyojen amin karışımı 5 M NaOH ile bazik yapıldıktan sonra 3 kez n-bütanol-kloroform karışımı (1:1) ile muamele edilmiş ve organik fazlar bir kaptan toplanmıştır. Sulu faz 3 kez de n-bütanol ile çalkalanmış ve organik fazlar toplanmıştır. Her iki organik faz 0,1 M HCl ile çalkalanarak biyojen aminler HCl li faza aktarılmıştır. HCl li fazlar toplanmış ve benzoil klorür ile türevlendirilmiştir. Analizler HPLC de gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım değerleri tiramin için % 59, diğerleri için % 100 dolaylarındadır.

Tablo 3. Farklı ekstraksiyon ve saflaştırma koşullarında peynir örneklerindeki biyojen aminlerin geri kazanım değerleri (100 örneğe 10 mg biyojen amin eklenmiştir)

Biyogen amin	Geri kazanım (%)					
	diyetiler			n-bütanol		
	TCA	HCl	metanol	TCA	HCl	metanol
Histamin	102,7	99,9	ND	130,5	98,5	131,9
Tiramin	48,0	72,0	0,2	ND	18,7	4,1
Feniletilamin	76,7	71,5	13,9	16,7	11,0	24,1
Triptamin	33,2	63,5	10,9	2,3	19,3	7,3
Serotonin	48,1	91,5	13,0	25,7	39,2	44,8
Agmatin	7,9	56,7	ND	2,1	23,2	17,0
Putresin	60,4	70,2	9,1	21,1	40,1	64,9
Kadaverin	42,0	53,8	ND	44,0	43,9	80,2
Spermidin	36,2	84,1	ND	20,6	32,5	58,2
Spermin	30,3	62,7	4,9	18,2	34,0	25,9
Ortalama	48,6	72,6	5,2	28,1	36,0	45,8

## Türevlendirme

Karababa [29] tarafından gerçekleştirilen çalışmada OPA ile türevlendirme yöntemi kullanılarak HPLC de analizler gerçekleştirilmiştir. OPA reaktifini hazırlamak için 0,2 g OPA 9 ml metanol içinde çözülmüştür. Bu çözelti üzerine 1 ml 0,4 M (pH 9) borat tamponu ve 160 l 2-merkaptotetanol ilave etmek suretiyle türevlendirme reaktifi hazırlanmıştır. Türevlendirme basamağında biyojen aminleri içeren standart karışımdan 25 l alınmış, üzerine 0,4 ml metanol, 0,475 ml saf su ve 0,1 ml türevlendirme reaktifi eklendikten sonra 0,5 m lik filtreden süzümüştür. Analizler C<sub>18</sub> kolonda ve floresans dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir (uyarma = 340 nm, emisyon = 420 nm). Metanol ve sudan oluşan dereceli elüsyon programı kullanılmıştır.

Benzoil türevleri kullanılarak biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, biyojen aminleri içeren standart karışım saf suyla 5 ml ye tamamlanmış, 3 ml 5 M NaOH eklenerek ortam bazik yapılmış, 60 l benzoil klorür ilave edilerek 30 sn kuvvetlice çalkalanmış ve 45 dk türevlendirmeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda 5 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edilmiş, biyojen amin türevleri 3 kez 4 ml diyetiler ile ayırma hunisinde 2 dk süreyle ekstrakte edilmiş ve diyetiler fazları toplanmıştır. Bu faz üzerine 2 g susuz sodyum sülfat ilave edilmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı başka bir test tübüne aktarılmış ve eter fazı azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Tüpteki kalıntı 1 ml metanolde çözüldükten sonra 0,5 m filtreden geçirilmiş ve HPLC cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Analizlerde C<sub>18</sub> kolon ve UV dedektör (= 254 nm) kullanılmıştır. Metanol ve sudan oluşan dereceli elüsyon programı uygulanmıştır [6].

Balık ve balık ürünlerindeki biyojen aminlerin tayini için gerçekleştirilen bir çalışmada dansil türevleri kullanılarak biyojen aminlerin HPLC ve TLC yöntemleriyle analizi gerçekleştirilmiştir. Standart biyojen amin karışımının türevlendirilmesi için, 1 ml standart karışım üzerine 1 ml fosfat tamponu (pH = 9), 1 damla 4 M NaOH çözeltisi ve 2 ml türevlendirme reaktifi (10 ml asetonda 50 mg dansil klorür çözülerek hazırlanmıştır) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışımın ağız alüminyum folyo ile kapatılarak 55°C da 1 saat süreyle türevlendirilmeye bırakılmıştır. Dansillendirilmiş biyojen aminler metanol ve sudan oluşan dereceli elüsyon programı kullanılarak HPLC cihazında analiz edilmiştir. Analizler C<sub>18</sub> kolon kullanılarak, 254 nm de UV dedektörde gerçekleştirilmiştir [13].

Romero ve ark. [19] tarafından şaraplardaki biyojen aminlerin analizi için dabsil türevleri kullanılmış ve analizler HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Kırk mg dabsil klorür 10 ml asetonda çözümlenerek 12,4 M dabsil klorür çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon çözelti 1,06 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 ml suda çözümlenerek hazırlanmıştır. Dereceli elüsyon programı için hazırlanan A solventi sodyum asetat, dimetilformamid ve trietilamin içeren sulu bir çözelti olup, seyreltik asetik asitle pH si 5 e

ayarlanmıştır. B solventi asetoniitril, tert.-bütilmetil eter ve sudan oluşmaktadır. Türevlendirme için 1,5 ml seyreltilmiş şarap örneği veya 2 ml standart karışımın pH si tampon çözelti

ile 8,2 ye ayarlanmış ve suyla hacim 3,8 ml ye tamamlanmıştır. 1,6 ml dabsil klorür çözeltisi eklendikten sonra karıştırılıp, su banyosunda 70C da 21 dk (1 ve 15 inci dakikalarda çalkalayarak) ısıtılmıştır. 4,6 ml seyreltme çözeltisi (asetoniitril, etanol ve A solventinden oluşmaktadır) ilave edilerek su banyosunda yaklaşık 20 dk bekletilmiştir. Analizler C<sub>18</sub> kolon kullanılarak, 446 nm de UV-görünür dedektörde gerçekleştirilmiştir.

## SONUÇ

Gıdalarda biyojen amin analizlerinde çoğunlukla HPLC yöntemi kullanılmaktadır. Peynir, et ve et ürünleri gibi gıdalar çok kompleks gıdalar olduklarından, önce bu gıdalardaki biyojen aminlerin ekstrakte edilmesi ve ardından ekstraktta safsızlıkların uzaklaştırılması gerekir. Gıdalardan biyojen aminleri çekmek için en çok 0,1 M HCl veya % 5 lik TCA kullanılmaktadır. Elde edilen asidik ekstraktın saflaştırılması için, ekstrakt organik bir solvent veya solvent karışımı ile çalkalanır. Böylece biyojen aminler organik faza alındıktan sonra, organik faz tekrar 0,1 M HCl ile çalkalanarak biyojen aminlerin HCl li faza geçmesi sağlanır. Gıdalar kompleks olmadığında, örneğin şarap ve bira, yukarıda anlatılan basamaklardan bir veya birkaçı uygulanmayabilir.

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekir. En çok kullanılan türevlendirme reaktifleri OPA, benzoil klorür ve dansil klorürdür. Türevler çoğunlukla metanol-su veya asetoniitril-su karışımından oluşan dereceli elüsyon programı kullanılarak C<sub>18</sub> kolonda ayrılır. OPA türevleri kullanıldığında floresans dedektör, diğerlerinde UV-görünür dedektör kullanılır.

## KAYNAKLAR

- [1] Askar, A., Treptow, H., 1986. Biogene amine in Lebensmitteln. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung, Eugen Ulmer GmbH and Co, Stuttgart, Germany.
- [2] Majjala, R., Eerola, S., 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. Meat Science, 35(3), 387-395.
- [3] Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis In't Veld, J.H.J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11, 73-84.
- [4] Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 29, 213-231.
- [5] Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, 29(7), 675-690.
- [6] Azim, Ö., 2002. Gıdalarda yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile biyojen amin analizleri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s.
- [7] Kalac, P., Hlavatá, V., Krizek, M., 1997. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. Food Chemistry, 58(3), 209-214.
- [8] Hornero-Mendez, D., Garrido-Fernandez, A., 1997. Rapid high performance liquid chromatography analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. Journal of Food Protection, 60(4), 414-419.
- [9] Ordonez, A.I., Ibanez, F.C., Torre, P., Barcina, Y., 1997. Formation of biogenic amines in Idiazabal ewe's-milk-cheese: Effect of ripening, pasteurization and starter. Journal of Food Protection, 60(11), 1371-1375.
- [10] Lonvaud-Funel, A., 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 199, 9-13.
- [11] Künsch, U., Scharer, H., Pulver, D., Temperli, A., 1989. Study on the

- in food poisoning. Journal of Chromatography B, 693, 23-30.
- [16] Busto, O., Valero, Y., Guasch, J., Borrull, F., 1994. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. Chromatographia, 38(9-10), 571-578.
- [17] Moret, S., Conte, L.S., 1996. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods, an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. Journal of Chromatography A, 729, 363-369.
- [18] Anlı, R.E., Vural, N., Yılmaz, S., Vural, Y.H., 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 53-62.
- [19] Romero, R., Gázquez, D., Bagur, M.G., Sánchez-Vinas, M., 2000. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 871, 75-83.
- [20] Van Boekel, M.A.J.S., Arentsen-Stasse, A.P., 1987. Determination of aromatic biogenic amines and their precursors in cheese by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 389, 267-272.
- [21] El-Sayed, M.M., 1996. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. International Dairy Journal, 6, 1079-1086.
- [22] Vale, S.R., Gloria, M.B.A., 1997. Determination of biogenic amines in

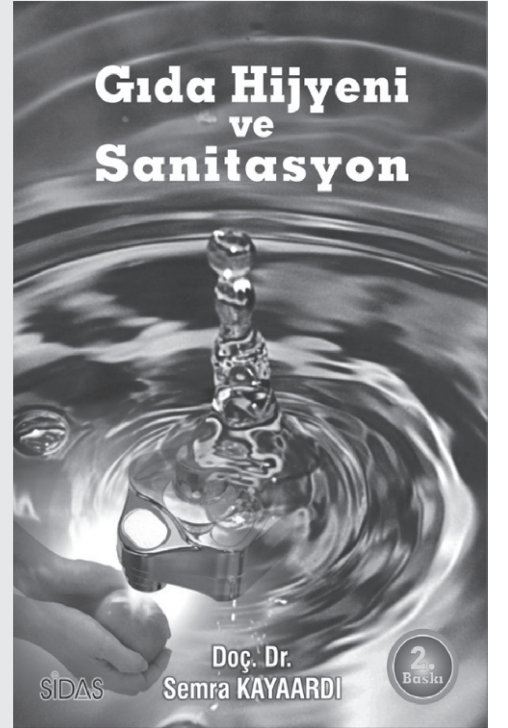
- cheese. Journal of AOAC International, 80(5), 1006-1012.
- [23] Lange, J., Thomas, K., Wittmann, C., 2002. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. Journal of Chromatography B, 779, 229-239.
- [24] Üren, A., Yücel, U., Hocalar, B., Turantaş, F., 2001. Fermente ürünlerden peynir, şarap ve lahana turşularında biyojen amin miktarları. 70 s.
- [25] Kalac, P., Krizek, M., 1996. Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. Food Chemistry, 58(3), 233-236.
- [26] Kalac, P., Svecová, S., Pelikánová, T., 2002. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. Food Chemistry, 77, 349-351.
- [27] Ayhan, K., Kolsarıcı, N., Özkan, G., 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish sou djoucks. Meat Science, 53, 183-188.
- [28] Vinci, G., Antonelli, M.L., 2002. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. Food Control, 13, 519-524.
- [29] Karababa, Z., 2003. Orto-fitalaldehit türevleri kullanılarak biyojen aminlerin yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 123 s.

## “Gıda Hijyeni ve Sanitasyon”

### II. Baskı Çıktı

#### KİTAP İSTEME ADRESİ

Fevzipaşa Blv. Çelik İş Merkezi  
No:162 Kat: 3 D: 302 Çankaya / İZMİR  
TEL: +90 232 441 60 01  
FAX: +90 232 441 61 06  
akademikgida@mynet.com



## GIDA ANALİZLERİ

YENİ  
KİTAPLAR

## GIDALARDA DUYUSAL DEĞERLENDİRME

*Genişletilmiş 2.Baskı*

Yrd.Doc.Dr.Canan DOKUZLU

Prof.Dr.Tomris ALTUĞ  
Yrd.Doç.Dr.Yeşim ELMACI

İzmir - 2005

#### KİTAP İSTEME ADRESİ

Fevzipaşa Blv. Çelik İş Merkezi Kat: 3 D: 302 Çankaya - İZMİR  
Tel: 0 232 441 60 01 - Fax: 0 232 441 61 06 - akademikgida@mynet.com