

149676

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BENZOİL TÜREVLERİ
KULLANILARAK BİYOJEN AMİNLERİN
YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(HPLC) YÖNTEMİYLE ANALİZİ**

Özgül ÖZDESTAN

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 614.01.00
Sunuş Tarihi : 16.09.2004**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali ÜREN

Bornova – İZMİR

III

KABUL VE ONAY

Sayın **Özgül ÖZDESTAN** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Benzoil Türevleri Kullanılarak Biyojen Aminlerin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemiyle Analizi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 16-09-2004 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ali ÜREN

Raportör Üye : Prof. Dr. M. Kemal ÜNAL

Üye : Doç. Dr. Neriman BAĞDATLIOĞLU

.....
A.K. ÜNAL
.....

V

ÖZET

BENZOİL TÜREVLERİ KULLANILARAK BİYOJEN AMİNLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİYLE ANALİZİ

ÖZDESTAN, Özgül

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ali ÜREN

Eylül 2004, 114 sayfa

Bu çalışmada gıdalarda oluşan etilamin, tiramin, propilamin, agmatin, kadaverin, spermin, histamin, putresin, metilamin, β -feniletilamin, triptamin gibi biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, biyojen aminlerin benzoil türevleri oluşturulmuş, 254 nm dalga boyunda absorbands dedektör ile yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında analizler gerçekleştirilmiştir. Metanol ve asetat tamponundan oluşan bir dereceli elüsyon programı uygulanmıştır. HPLC cihazındaki belirleme sırasında, biyojen aminlerin ayrımını etkileyen hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, farklı kolon kullanımı gibi değişkenlerin etkileri irdelenmiştir. En iyi ayrımın sağlandığı hareketli faz pH'sı ve kolon çalışma sıcaklığı belirlenmiştir. Türevlendirme reaktifi (benzoil klorür) için optimum türevlendirme sıcaklığı tespit edilmiştir. Ayrıca hem 5 μ hem de 10 μ luk farklı C₁₈ kolonlarda denemeler yapılmış, hem partikül büyüklüğünün hem de eski ve yeni kolon kullanımının etkileri irdelenmiştir.

Denemeler sonucunda; biyojen aminlerin en iyi ayrıldığı hareketli faz pH değerinin 6,0 olduğu, optimum kolon çalışma sıcaklığının 22°C, optimum türevlendirme sıcaklığının 25°C ve türevlendirme sırasındaki optimum çalkalama süresinin 1 dakika olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyojen amin, HPLC, histamin

VII

ABSTRACT

ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES WITH HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD BY USING BENZOYL CHLORIDE DERIVATIVES

ÖZDESTAN, Özgül

Master Thesis in Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜREN

September 2004, 114 pages

In this thesis, a new HPLC method was developed for the determination of some biogenic amines such as ethylamine, tyramine, propylamine, agmatine, cadaverine, spermine, histamine, putrescine, methylamine, β -phenylethylamine, tryptamine which are formed in foods. In this method, biogenic amines were derivatized with benzoyl chloride and determined by using the absorbance detection at 254 nm at HPLC. Chromatographic separation of biogenic amines was performed by using a gradient elution program composed of methanol and acetate buffer. The effect of variables such as mobile phase pH, column temperature and using of different columns which effect the separation of amines were investigated. The optimum pH of mobile phase and column temperature were determined to obtain the best separation of amines. In addition, optimum derivatization temperature and shaking time during derivatization were established. Several experiments were realised by different C₁₈ columns which had 5 and 10 μ particle size to investigate the effect of particle size and the effect of new and old columns.

At the end of trials, the best separation of biogenic amines was obtained at pH 6.0 for mobile phase, at 22°C for column temperature. Optimum derivatization temperature was found as 25°C and optimum shaking time during derivatization was found as 1 minute.

Key Words: Biogenic amine, HPLC, histamine

IX

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÜREN'e,

Her zaman yanımda olan, hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme çok teşekkür ederim.

Özgül ÖZDESTAN



XI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumu.....	7
2.2. Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumunda Etkili Mikroorganizmalar.....	9
2.3.Çeşitli Gıdalarda Bulunan Biyojen Aminler.....	11
2.3.1. Balık.....	11
2.3.2. Et ve Ürünleri.....	13
2.3.3. Meyve ve Sebzeler.....	14
2.3.4. Lahana Turşusu.....	15
2.3.5. Peynir.....	17
2.3.6. Bira.....	18
2.3.7. Şarap.....	20
2.4. Biyojen Aminlerin Toksikolojik Etkileri.....	25
2.5. Yasal Düzenlemeler.....	29

XII

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.6. Literatürdeki Biyojen Amin Analiz Yöntemleri	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Standartların Hazırlanması.....	41
3.2.2. Türevlendirme.....	43
3.2.3. Kromotografik Koşullar.....	44
4. BULGULAR.....	47
4.1. pH Denemeleri.....	47
4.2. Farklı Kolon Sıcaklığında Yapılan Denemeler.....	52
4.3. Türevlendirme Koşulları Denemeleri.....	63
4.3.1. Türevlendirme Sıcaklığı Denemeleri.....	63
4.3.2. Türevlerin Bekletilmesi Denemeleri.....	68
4.4. Agmatin Denemeleri.....	68
4.5. Histamin Denemeleri.....	81
4.6. Farklı Kolon Denemeleri.....	94
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	99
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	114

XIII

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

1.1. Biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu.....	3
1.2. Biyojen aminlerin detoksifikasyon mekanizmaları.....	5
2.1. Biyojen aminlerin oluşumu.....	7
4.1. Hareketli faz pH'sı 6,05 iken elde edilen kromatogram.....	49
4.2. Hareketli faz pH'sı 7,00 iken elde edilen kromatogram.....	50
4.3. Hareketli faz pH'sı 8,05 iken elde edilen kromatogram.....	51
4.4. pH 6,05'te 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	54
4.5. pH 6,05'te 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	55
4.6. pH 6,05'te 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	56
4.7. pH 7,00'de 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	57
4.8. pH 7,00'de 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	58
4.9. pH 7,00'de 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	59
4.10. pH 8,05'te 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	60
4.11. pH 8,05'te 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	61
4.12. pH 8,05'te 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	62
4.13. 20°C'de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	64
4.14. 25°C'de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	65

XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

4.15. 30°C’de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	67
4.16. Yeni türevlendirilmiş standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	69
4.17. 1 ay bekletilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	70
4.18. pH 6,05’te agmatin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	72
4.19. pH 6,05’te agmatin enjeksiyonu sonucu 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	73
4.20. pH 8,05’te agmatin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	74
4.21. pH 8,05’te agmatin enjeksiyonu sonucu 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	75
4.22. pH 6,05’te agmatin enjeksiyonu sonucu 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	76
4.23. pH 7,00’de agmatinin enjeksiyonu sonucu 27°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	77
4.24. pH 6,05’te 20°C’de türevlendirilen agmatinin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	79

XV

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

4.25. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen agmatinin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	80
4.26. pH 6,05'te 20 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	82
4.27. pH 6,05'te 25 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	83
4.28. pH 6,05'te 25 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	84
4.29. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	85
4.30. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	88
4.31. pH 8,05'te 25°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	89
4.32. pH 6,05'te seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	90
4.33. pH 6,05'te 25°C'de seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram	91

XVI
ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

4.34. pH 7,00'de seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram.....	92
4.35. 1 dk çalkalanarak türevlendirilen agmatin ve histamin karışımının enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	93
4.36. 5 µ'luk kolonda elde edilen kromatogram.....	96
4.37. 10 µ'luk yeni kolonda elde edilen kromatogram.....	97
4.38. 10 µ'luk eski kolonda elde edilen kromatogram.....	98

XVII

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyojen aminlerin sınıflandırılması.....	2
2.1. Bazı gıdalarda bulunan biyojen aminler ve izole edilen bakteriler...	10
2.2. Lahana turşularında saptanan biyojen aminler ve miktarları.....	16
2.3. Biyojen aminler ve farmakolojik etkileri.....	26
2.4. Biyojen amin kaynaklı gıda zehirlenmesine neden olan gıdalar.....	28
3.1. Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan biyojen amin miktarları.....	41
3.2. Standart biyojen amin karışımında kullanılan stok biyojen amin hacimleri.....	42

XVIII

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DAL	Gıdanın Dekompoze Olduğunu Gösteren Düzey
DAO	Diaminooksidaz
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi (ABD)
GLC	Gaz-Sıvı Kromatografisi
HAL	İnsan Sağlığına Zarar Verebilecek Düzey
HDC	Histidin Dekarboksilaz
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
LLE	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu
MAO	Monoaminooksidaz
OPA	Orta-fitalaldehit
LAB	Laktik asit bakterileri
PVP	Polivinilprolidon
RTU	Tüketime hazır gıda
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
TCA	Trikloraasetikasit
TLC	İnce tabaka kromatografisi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
p	Olasılık

1. GİRİŞ

Biyojen aminler gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucu amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ile oluşan organik bazlı düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir (Askar ve Treptow, 1986; Maijala ve ark., 1993; Ten Brink ve ark., 1990). Amino asit dekarboksilasyonu α -karboksil grubunun ilgili amini verecek şekilde amino asitten ayrılması ile oluşmaktadır (Shalaby, 1996). Gıdalardaki biyojen aminler, hammaddede bulunan endogen enzimlerin faaliyeti sonucu veya amino asitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır (Silla-Santos, 1996).

Gıdalarda oluşan başlıca biyojen aminler putresin, histamin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, spermin ve spermidindir (Shalaby, 1996). Biyojen aminler kimyasal özelliklerine göre 3 gruba ayrılmaktadırlar.

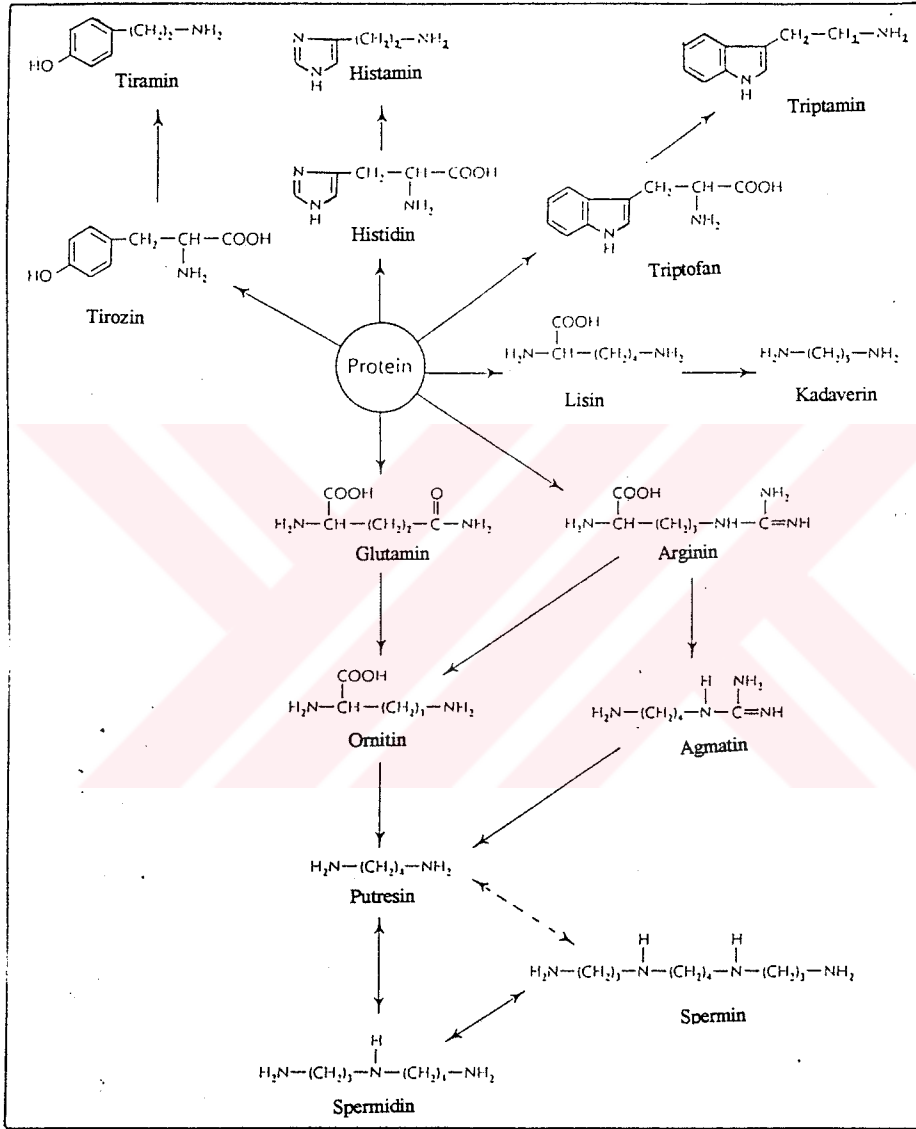
- 1- Aromatik ve heterosiklik aminler (histamin, tiramin, β -feniletilamin, triptamin)
- 2- Alifatik di-, tri- ve poli-aminler (putresin, kadaverin, agmatin, spermin, spermidin)
- 3- Alifatik uçucu aminler (etilamin, metilamin, izoamilamin, etanolamin) (Mafra ve ark., 1999).

İçerdikleri azot sayısına göre ise biyojen aminler; monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak gruplandırılırlar (Çizelge 1.1) (Azim, 2002).

Çizelge 1. 1. Biyojen Aminlerin Sınıflandırılması

Kimyasal Yapılarına Göre	Aromatik ve Heterosiklik Aminler	Alifatik di-, tri- ve poliaminler	Alifatik Uçucu Aminler
	Histamin Tiramin β - feniletilamin Triptamin	Putresin Kadaverin Agmatin Spermin Spermidin	Etilamin Metilamin İzoamilamin Etanolamin
İçerdikleri Azot Sayısına Göre	Monoaminler	Diaminler	Poliaminler
	β - feniletilamin Serotonin Tiramin	Histamin Triptamin Putresin Kadaverin	Agmatin Spermin Spermidin

Kadaverin, putresin, histamin, tiramin, triptamin gibi biyojen aminler sırasıyla lizin, ornitin, histidin, tirozin, triptofan amino asitlerinin mikrobiyal dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadır (Moret ve Conte, 1996; Kalac ve ark., 1997; Ten Brink ve ark.,1990). Şekil 1.1.' de biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu görülmektedir (Halasz ve ark., 1994).



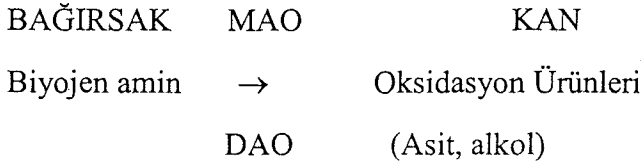
Şekil 1.1. Biyojen amin oluşumunun metabolik iz yolu

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

- Serbest aminoasitlerin varlığı,
- Dekarboksilaz pozitif mikroorganizmaların varlığı,
- Bakteriyal gelişim, dekarboksilaz sentezi ve aktivitesine izin veren koşulların olmasıdır (Silla-Santos, 1996).

Peynir, balık, et ve ürünleri, fermente sebzeler gibi gıdalar ile şarap, bira gibi içeceklerde biyojen aminlerin varlığı uzun süredir bilinmektedir (Busto ve ark., 1994). Biyojen aminlerin gıda açısından önemi bu ürünlerin potansiyel toksisitesinden kaynaklanmaktadır. Tiramin, β -feniletılamin gibi biyojen aminler yüksek tansiyon krizi ve migren gibi hastalıklara yol açarken, histamin ve diğer biyojen aminler de gıda zehirlenmesine neden olmaktadır (Azim, 2002). Dünyanın pek çok ülkesinde toksik dozda bulunan biyojen aminlerin yarattığı zehirlenmelere ilişkin raporlar bulunmaktadır. Örneğin Kanada'da balık, cheddar peyniri, Danimarka'da balık, Fransa'da balık, İsviçre'de peynir, jambon, Almanya'da balık, Gouda peyniri, Yeni Zelanda'da balık, ABD'de balıktan zehirlenme vakaları tespit edilmiştir (Shalaby, 1996).

Normal koşullarda gıdalarla insan vücuduna alınan biyojen aminler vücudun sindirim sisteminde bulunan mono ve di-amino oksidaz (MAO, DAO) ve histamin-N-metil transferaz enzimleriyle detoksifiye edilmektedirler. Böylece yüksek miktarda tüketilmedikleri takdirde insan sağlığı üzerine olumsuz bir etki göstermemektedirler (Kalac ve ark., 1997; Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez, 1997; Ordonez ve ark., 1997). Kişilerin duyarlılığı insan vücudunun detoksifikasyon aktivitesine bağlıdır (Lonvaud-Funel, 2001). Şekil 1.2.'de biyojen aminlerin mono ve di-amino oksidaz enzimleri vasıtasıyla detoksifiye olarak oksidasyon ürünlerine dönüşümü görülmektedir.



Şekil 1.2. Biyojen aminlerin detoksifikasyon mekanizmaları

Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri, yüksek miktarlarda yani; Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve kodekste belirtilen maksimum alım miktarlarından fazla vücuda alındıklarında, genetik olarak sindirim sisteminde bulunan mono ve diaminooksidaz enzimlerinin eksikliğinde veya bu enzimleri inhibe edici ilaçlar (ağrı kesici, stres ve depresyon ilaçları, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar) kullanıldığında ve yüksek miktarlarda alkol tüketimiyle artmaktadır (Lonvaud-Funel, 2001; Künsch ve ark., 1989).

Histamin balık, şarap, peynir ve et ürünleri gibi gıdalarda oluşabilen en fazla toksik etkiye sahip biyojen amindir. Histaminin toksikolojik etkisi, alınan histaminin miktarına, diğer aminlerin varlığına, amino oksidaz aktivitesine ve kişilerin sağlık durumuna bağlı olarak değişebilmektedir (Silla-Santos, 1996).

Gıdalarda histamin, tiramin, agmatin, putresin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin belirlenmesi yalnızca bu bileşiklerin toksisiteleri açısından değil; aynı zamanda gıdalarda tazelik ve mikrobiyal bozulmanın yani kalitenin indikatörleri olması açısından da önem taşımaktadır (Alberto ve ark., 2002; Künsch ve ark., 1989).

Bu çalışmada; benzoil türevleri kullanılarak biyojen aminlerin HPLC yöntemiyle analizi için optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla agmatin, histamin, metilamin, etilamin, propilamin, spermin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, putresin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin HPLC cihazında analizi

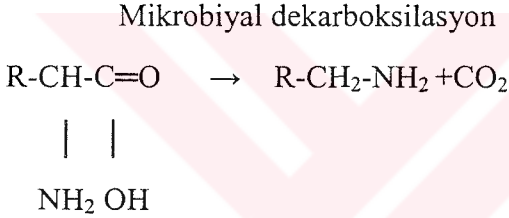
gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda; C_{18} kolon ve absorban dedektör kullanılmış ve dereceli elüsyon programı uygulanmıştır. Biyojen aminlerin benzoil türevleri oluşturulmuş, hem 5 hem de 10 μ luk eski ve yeni kolonlarda ayrımlar incelenmiş ve 10 μ luk yeni kolonda ayrımlar üzerine hareketli faz pH'sının, kolon sıcaklığının etkileri araştırılmıştır. Biyojen amin türevlerinin 1 ay süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmesinin etkisi irdelenmiştir. Ayrıca optimum türevlendirme koşullarının belirlenmesi amacıyla, farklı sıcaklıklarda türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucunda optimum hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme sırasındaki çalkalama süresi belirlenmiştir. Agmatin ve histamin için bu denemeler ayrıca gerçekleştirilmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıdalarda Biyojen Aminlerin Oluşumu

Biyojen aminler düşük molekül ağırlıklı organik bazlı biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir (Alberto ve ark., 2002). Biyojen aminler transaminaz ve dekarboksilaz enzimleri vasıtasıyla amino asitlerin dekarboksilasyonu, aldehit veya ketonların aminasyonu ile meydana gelmektedir. Şekil 2.1.'de mikrobiyal dekarboksilasyon ile biyojen aminlerin oluşum mekanizması görülmektedir.



Şekil 2.1. Biyojen aminlerin oluşumu

En yaygın olarak bulunan biyojen aminler kadaverin ve putresin, histamin, tiramin ve triptamin olup, sırasıyla lizin, ornitin, histidin, tirozin ve triptofanın mikrobiyal dekarboksilasyonu ile meydana gelmektedir (Kalac ve ark., 1996).

Biyojen aminler endogen olarak memeli hücrelerinde öncül amino asitlerden sentezlenebildikleri gibi, ekzogen olarak proteinlerin hidrolizi ile açığa çıkan amino asitlerin bağırsakta bakterilerin neden olduğu amino asit dekarboksilasyonu ile de meydana gelebilmektedirler (Soleas ve ark., 1999).

Biyojen aminler tüm yaşayan hücrelerde ve çok çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Putresin, spermin ve spermidin gibi aminler yaşayan hücrelerde özellikle ökaryotik hücrelerin çoğalmasında, gelişme proseslerinde rol oynamaktadır (Hwang ve ark., 1997).

Protein ve serbest amino asit içeren, mikrobiyal veya biyokimyasal aktiviteye uygun koşullara sahip gıdalarda biyojen aminler meydana gelebilmektedir. Balık ve ürünleri, et ve ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, meyve ve sebzeler, çikolata, fermente sebze ürünleri gibi gıdalarda biyojen aminler meydana gelebilmektedir (Silla-Santos, 1996).

Amino asit dekarboksilasyonu sonucunda biyojen amin oluşumu için iki mekanizma vardır. Bunlardan biri pridoksal fosfata bağlı reaksiyon, diğeri ise pridoksal fosfata bağımlı olmayan reaksiyondur. Pridoksal fosfat tek başına amino asit reaksiyonlarını katalizleyebilen bir bileşiktir. Pridoksal fosfat, transaminaz ve dekarboksilaz enzimlerinin aktif kısmını oluşturmakta, önce pridoksal fosfatın karbonil grubu ile amino asidin amino grubu arasında Schiff bazı oluşmakta daha sonra bu Schiff bazı dekarboksilasyona uğramakta ve bir molekül su alarak hidroliz olmaktadır. Sonuç olarak amino asit biyojen amine dönüşmekte ve pridoksal fosfat da eski haline dönüşmektedir. Pridoksal fosfata bağımlı olmayan reaksiyon da ise; pirüvik asidin karbonil grubu aynen pridoksal fosfat grubunda olduğu gibi çalışmakta ve amino asidi dekarboksilasyona uğratmaktadır (Shalaby, 1996).

2.2. Gıdalarda Biyojen Amin Oluşumunda Etkili Mikro organizmalar

Gıdalarda biyojen amin oluşumu genellikle aminoasit dekarboksilaz aktivitesine sahip bakterilerin varlığı sonucu meydana gelmektedir. *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* ve *Lactobacillus* türleri dekarboksilaz aktivitesine sahiptir. Çizelge 2.1.'de bazı gıdalarda bulunan biyojen aminler ve bu gıdalardan izole edilen bakteriler verilmektedir (Shalaby, 1996).

Aminlerin tipi ve miktarı gıdanın yapısına ve mikroorganizmaların varlığına bağlıdır. Histamin tüm biyojen aminler içinde en fazla biyolojik aktiviteye sahip olanıdır. *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* ve *Lactobacillus* türleri histidin dekarboksilaz (HDC) aktivitesine sahiptir (Halasz ve ark., 1994).

Bakterilerin biyojen amin oluşturma kapasitesi, sıcaklığa, ortamın oksijen içeriğine, pH ve ortamdaki fermente edilebilir substrat içeriğine bağlı olarak değişebilmektedir (Halasz ve ark., 1994).

Çizelge 2.1. Bazı gıdalarda bulunan biyojen aminler ve bu gıdalardan izole edilen bakteriler

GIDA	İZOLE EDİLEN BAKTERİ	BİYOJEN AMİNLER
BALIK	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibrio alginolytiens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosus</i>	Histamin, tiramin, kadaverin, putresin, agmatin, spermin, spermidin
PEYNİR	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus</i> 30a, <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinos</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>propionibacteria</i>	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin, β - feniletilamin, triptamin
ET VE ÜRÜNLERİ	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin, β - feniletilamin, triptamin
FERMENTE SEBZELER	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin, triptamin
FERMENTE SOYA ÜRÜNLERİ	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Histamin, kadaverin, putresin, tiramin, triptamin

2.3. Çeşitli Gıdalarda Bulunan Biyojen Aminler

Biyojen aminlerin varlığı hijyenik koşullar bakımından oldukça önemli olup, biyojen aminler çok sayıda gıda zehirlenmesi vakasında rol oynamaktadır ve çok çeşitli farmakolojik reaksiyonu başlatabilmektedirler (Shalaby, 1996).

Histamin, putresin, kadaverin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, spermin ve spermidin gıdalarda meydana gelen en önemli biyojen aminlerdir (Shalaby, 1996).

Fermente olmayan gıdalarda biyojen amin varlığı istenilmeyen mikrobiyal aktivitenin bir göstergesidir. Bu nedenle bu gıdalardaki amin düzeyi mikrobiyal bozulmanın bir indikatörüdür. Fermente gıdalarda ürünün istenilen fermentasyon ve olgunlaşma derecesine ulaşabilmesi için aylarca bekletilmesi gerekmektedir. Özellikle fermentasyonun ilk basamağında çok sayıda mikroorganizma gelişmektedir, bu nedenle biyojen aminlerin şarap, bira, peynir, sauerkraut gibi fermente gıdalarda varlığı beklenen bir durumdur (Ten Brink ve ark., 1990).

Potansiyal toksisitelerinden dolayı çeşitli gıdalarda bulunan biyojen aminler üzerinde çalışmalar mevcuttur (Stratton ve ark., 1991).

2.3.1. Balık

Balık ve balık ürünleri gibi proteince zengin gıdalarda belirli biyojen aminler mikrobiyal gıda zehirlenmesine sebep olduğu gibi gıdaların depolanması sırasında kalite ve hijyen indikatörü olarak da değerlendirilebilmektedir (Simon-Sarkadi ve Halzapfel, 1995).

Scombriade familyasında yer alan balıklar en fazla histamin intoksikasyonunda yer alan gıdalardır. Balıklarda histamin oluşumu endogen histidin dekarboksilaz aktivitesinden ziyade, mikrobiyal

aktiviteyle ilişkilidir. Histidin balıkta iki yolla katabolize edilebilmektedir. Bunlar üronik asit elde etmek üzere amino asit deaminasyonu veya histidin dekarboksilasyonu ile histamin eldesi şeklindedir. Gerçekleştirilen çalışmalarda, orkinos, uskumru, sardalye gibi balıklarda histamin, putresin, kadaverin, tiramin, spermin ve spermidin gibi farklı biyojen aminler tespit edilmiştir (Silla-Santos, 1996).

Balık ürünlerinde depolama sırasında serbest amino asit içeriği endogen ve ekzogen proteaz aktivitesi ile artış göstermektedir. Bozulmuş balıklarda HDC aktivitesine sahip 14 bakteri türü tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda uskumru (*Scombridae*) balığının 10 °C'de 2 °C'ye göre 2-20 kat daha fazla amin içerdiği tespit edilmiştir. *K. pneumonia*, *Morgenalla morgani* ve *H. alvei* gibi mikroorganizmaların balıklarda yüksek histamin içeriğine neden oldukları tespit edilmiştir. Buna ilaveten, Ababouch ve ark. (1991) düşük depolama sıcaklığının toksik histamini inhibe etmek için yetersiz olduğunu ifade etmektedirler (Halasz ve ark., 1994).

Shakila ve ark. (2001) tarafından balıklarda gerçekleştirilen çalışmada putresin, kadaverin, histamin ve tiramin tespit edilmiştir. Taze ve konserve balıklarda biyojen amin içerikleri oldukça düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Histamin konsantrasyonu 10 mg/100 g'ın altında tespit edilmiştir. Tuzla kürlenmiş balıklarda özellikle uskumru ve sardalyede biyojen amin yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Histamin düzeyi ise 10 mg/100 g'ın üzerinde bulunmuştur. Bu çalışmada balıklarda biyojen amin analizinde TLC-densitometre ve HPLC yöntemleri karşılaştırılmış ve her iki yöntemin de kullanılabileceği ifade edilmiştir (Shakila ve ark., 2001).

Fermente edilmiş balık ürünlerinde fermentasyon işlemi balığın doğal mikroflorasında bulunan halofilik mikroorganizmalarca gerçekleşmektedir (Kirschbaum ve ark., 2000).

Balıklarda yüksek düzeylerde histamin bulunması toksik etkiye neden olmaktadır. Ancak zehirlenmelerden sadece histaminin sorumlu olmadığı, diğer aminlerle histaminin sinerjistik etkisinin sorumlu olduğu ifade edilmektedir. İyice dondurulmuş balıklarda biyojen amin riski söz konusu olmazken, konserve balıklarda histamin varlığı uygun olmayan depolama koşullarının ve ısıtıl işlemin yetersizliğinin bir göstergesidir (Fernandez-Salguero ve Mackie, 1987).

2.3.2. Et ve Ürünleri

Taze ve işlenmiş domuz etlerinde gerçekleştirilen çalışmada, bu ürünlerin yüksek düzeyde adrenalin, spermidin ve spermin (581 mg/kg, 280 mg/kg ve 685 mg/kg), düşük miktarlarda noradrenalin, putresin, histamin ve kadaverin içerdiği bulunmuştur (Silla-Santos, 1996).

Sayem-El-Daher ve ark. (1985) tarafından gerçekleştirilen çalışmada pişirilmiş ve pişirilmemiş 4-10 °C'de depolanmış sığır etlerinde, histamin dışındaki biyojen aminlerin sıcaklık ve zamanla artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Spermidin ve spermin dışındaki aminlerin ise pişirmeden etkilenmediği, bu iki biyojen aminin pişirme ile azaldığı ifade edilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalarda donmuş etlerdeki baskın mikroorganizma olarak bilinen *Pseudomonas* türlerinin putresin, *Enterobacteriaceae* türlerinin ise kadaverin oluşturma özelliğine sahip oldukları vurgulanmaktadır (Halasz ve ark., 1994).

Et ve ürünlerinde biyojen amin varlığı etin tazeliğinin veya etin depolama koşullarının bir indikatörü olarak değerlendirilebilmektedir. Yapılan çalışmada kırmızı ve beyaz etler 36 gün süreyle 4 ± 1 °C 'de depolanmış ve 36 gün sonunda kadaverin ve tiramin seviyelerinin 120 mg/kg'ın üzerine çıktığı ve beyaz ette ise sadece kadaverin miktarının

artış gösterdiği ifade edilmiştir. Örnekler perklorik asit ile ekstrakte edilip, HPLC cihazında analiz edilmiştir (Vinci ve Antonelli, 2002).

Türk sucuklarında starter kültür uygulamasının biyojen amin oluşumu üzerine etkisi konusunda gerçekleştirilen bir çalışmada 4 °C'de depolanan tüm kontrol örneklerinde putresin ve tiramin bulunmuştur. Starter kültür eklenmesi putresin oluşumunu inhibe ederken tiramin oluşumunu etkilememiştir (Ayhan ve ark., 1999).

2.3.3. Meyve ve Sebzeler

Kalac ve ark. (2002) tarafından dondurulmuş ıspanak püresi, ketçap, konsantre salça ve dondurulmuş yeşil bezelyede elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle gerçekleştirilen bir çalışmada örneklerde putresin ve spermidin tespit edilebilir düzeylerde bulunurken, histamin, spermin ve kadaverin tespit limitlerinin altındaki konsantrasyonlarda bulunmuştur (Kalac ve ark., 2002).

Meyvelerin pH değeri sebzelere göre daha düşük olduğundan, düşük pH çok sayıda mikroorganizmanın gelişimine sınır getirmektedir. Potasyum ve magnezyum eksikliğinde ve yüksek amonyum konsantrasyonlarında bitkilerde çok miktarda agmatin ve putresin birirmektedir. Meyvenin olgunlaşma derecesine göre amin miktarları değişebilmektedir (Halasz ve ark., 1994).

Portakal suyunda; noradrenalin, triptamin, domates suyunda; tiramin, triptamin, histamin, muz suyunda; tiramin, noradrenalin, serotonin, erik suyunda; tiramin, noradrenalin ve ıspanak yapraklarında histamin yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Çikolatada fenilalaninin dekarboksilasyonu sonucu feniletılamin meydana gelmektedir. Mikrobiyal kontaminasyon biyojen amin miktarını artırmaktadır (Halasz ve ark., 1994).

Mantar örneklerinde gerçekleştirilen çalışmalarda 6 veya 20 °C’de en az 2 gün depolanan örneklerde putresin ve kadaverin kuru maddede 1600 mg/kg ve 165 mg/kg değerlerinde bulunmuş ve bu değerlerin insan tüketimi için uygun olduğu ifade edilmiştir (Kalac ve Krizek, 1996).

RTU sebzelerde gerçekleştirilen çalışmalarda örneğin cinsine bağlı olarak putresin, histamin, kadaverin, spermidin, agmatin, spermin ve tiramin farklı konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Halasz ve ark., 1994).

2.3.4. Lahana Turşusu

Lahana turşusu ile ilgili olarak yapılan yurt dışı çalışmaları sauerkraute yöneliktir. Mayer (1976) sauerkrautte oluşan histaminin *P. cerevisiae* tarafından üretildiğini belirtmiştir. pH 4’ün altında sauerkrautte *P. cerevisiae*’nın yoğun bir şekilde bulunduğu ve yüksek oranda histamin üretildiği ifade edilmiştir.

Lahana turşusunun Avrupa ülkelerinde üretilen şekli sauerkraut adı verilen Alman tipi susuz lahana turşusudur. Sauerkraut turşusu hazırlanmasında salamuralı fermentasyon uygulanmamakta, kuru tuz kullanılarak hücre öz suyu dışarı çıkarılmaktadır. Bazen lahanalar 2-3 dk süreyle haşlanmaktadır. Sauerkraut üretiminde lahanalar ince şeritler halinde kesilmektedir. 1-2 mm’lik şeritler halinde kıyılan lahanalar asma yaprağı salamurasının hazırlanmasında olduğu gibi bir sıra ince yemeklik tuz ile katlanmaktadır. Ortamın sıcaklığı ve lahananın su oranı fazla ise tuz oranı yükseltilmektedir. Ortalama olarak % 2 tuz oranı uygundur (Nehring ve Krause, 1969).

Sauerkraut üretiminde doğal fermentasyon meydana gelmektedir. Fermentasyon esnasında aeroblar daha sonra fakültatif anaeroblar aktivite kazanır. Bunları laktik asit bakterilerinin aktivitesi izlemektedir.

Mikrofloradaki bu geniş varyasyonlar nedeniyle biyojen amin miktarında değişmeler olmaktadır (Mayer ve Pause, 1972; Taylor ve ark., 1978).

Sauerkrautta gözlenen önemli biyojen aminler histamin, tiramin, putresin ve kadaverindir. β -feniletilamin düşük miktarlarda bulunmaktadır (Taylor ve ark., 1978; Ten Brink ve ark., 1990).

Lahana turşusu üretiminde genellikle starter kültür ilavesi olmamaktadır. Laktik asit bakterilerinin pek çoğu fermentasyonun farklı aşamalarında gelişmektedir. Araştırmacılar tarafından lahana turşularında dominant florayı *Leuconas mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum*'un oluşturduğu ve bunlar arasında *L. brevis*'in yüksek miktarlarda biyojen amin üretme yeteneğine sahip olduğu söylenmektedir (Straub ve ark., 1995).

Pechanek ve ark. (1980) tarafından yapılan bir çalışmada sauerkraut ve salamuraşında saptanan bazı biyojen aminler çizelgede verilmiştir.

Çizelge 2.2. Lahana turşusunda saptanan biyojen aminler ve miktarları

Biyojen Amin	Sauerkrautte (mg/kg)	Salamurada (mg/l)
Putresin	100-200	442-678
Histamin	45-52	143-174
Kadaverin	53-71	178-237
Spermidin	3-8	10-76
Spermin	1-2	3-5

Mayer ve ark. (1972) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 10 haftalık fermentasyon süresi sonunda üretilen susuz lahana turşusunun histamin içeriğinin 160 ppm'e kadar çıkabileceği belirlenmiştir (Halasz ve ark., 1994).

2.3.5. Peynir

Peynir histamin zehirlenmesi ve tiramin toksisitesine en fazla neden olan gıdalardandır. Hollanda, ABD ve Fransa'da peynir tüketiminden kaynaklanan çok sayıda zehirlenme vakasına rastlanmıştır (El-Sayed, 1996).

Peynirde biyogen amin analizinde en sık kullanılan yöntem HPLC yöntemi olup, ELISA tekniğinin de bu amaçla kullanıldığı ifade edilmektedir (Aygün ve ark., 1999).

Peynirde *Lactobacillus buchneri*'nin bazı suşları histamin üretme özelliğine sahiptir. *Lactobacillus 30a*, *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *propionibacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus arabinose* HDC aktivitesine sahiptir. İsveç peynirlerinde, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus faecium* ve *Streptococcus lactis*'in 2 suşu histamin üreten izolatlar olarak tanımlanmıştır (Stratton ve ark., 1991).

Peynir amin üretimi için ideal bir ortamdır. Biyogen aminler peynirde oluştuktan sonra pastörizasyon veya pişirme ile yıkıma uğratılamaz. Bu nedenle hammadde ve üretim koşullarının hijyenik tutulması ile biyogen amin oluşumu kontrol edilebilir (Valsamaki ve ark., 2000).

Sıcaklık özellikle peynirde histamin oluşumunda önemli bir role sahiptir. Örneğin; 9, 14, 18 ve 21 °C'lerde depolanan Gouda peynirinde

sıcaklık artışıyla beraber histamin oluşumunun da arttığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra peynir üretiminde kullanılan sütlerin kalitesi de büyük önem taşımaktadır. Peynirlerde histamin, işleme prosesi sırasındaki kontaminasyondan değil; genellikle sütte bulunan belli laktik asit bakterilerinin varlığında olgunlaşma periyodu boyunca oluşmaktadır. Peynir üretiminde kalite standartı yüksek sütlerin kullanılması, kullanılacak olan sütlerin çok iyi ısıl işlem görmesi ve üretim esnasında gerekli tüm hijyenik şartların sağlanması ile peynirde biyojen amin oluşumu kontrol altına alınabilmektedir (Stratton ve ark., 1991).

2.3.6. Bira

Biralarda biyojen aminlerin varlığının bira üretimi sırasında maya aktivitesi ve/veya mikrobiyal bulaşmayla ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar yanında, biyojen aminlerin oluşmasında, malt, ilave edilen tahıllar ve şerbetçi otunun da potansiyel birer kaynak olduğunu iddia eden araştırmalar da mevcuttur (Izquierdo-Pulido ve ark., 1994).

HPLC yardımıyla 16 bira örneğinde 8 biyojen aminin (histamin, tiramin, triptamin, 2-feniletilamin, putresin, kadaverin, spermin ve spermidin) incelendiği bir çalışmada 6 amin tayin edilebilecek düzeylerde bulunurken histamin ve spermin saptanamamıştır. Belirlenen biyojen amin miktarları 0,1-17,2 ppm arasında değişiklik gösterirken bütün örneklerde tiramin ve putresin en yüksek düzeylerde bulunmuştur. Alkol içermeyen biralar ile alkollü bira örnekleri arasında biyojen amin miktarı yönünden önemli bir fark bulunmamıştır (Buiatti ve ark., 1995).

Izquierdo-Pulido ve ark. (1994) bira üretimi sırasında hammadde, mayşe ve bira örneklerinde HPLC yardımı ile biyojen aminlerin (histamin, tiramin, β -feniletilamin, serotonin, triptamin, putresin, kadaverin, agmatin, spermin ve spermidin) oluşumunu inceledikleri çalışmalarında biralarda mevcut bulunan biyojen aminleri orijinlerine göre 3 grup altında toplamışlardır. Buna göre, birinci grup aminler

(putresin, spermin ve spermidin) genellikle hammaddeden gelenler, ikinci grup aminler hem hammaddeden gelen hem de mayşeleme sırasında oluşan aminler (histamin, β -feniletilamin, kadaverin ve agmatin) olarak değerlendirilmiştir. Üçüncü grup aminler (triptamin ve tiramin) ise hammadde de mevcut olmaları ve mayşeleme sırasında oluşmaları yanında fermentasyon sırasında da oluşabilmektedirler.

Bira üretimi sırasında laktik asit bakterilerinin biyojen amin oluşumu üzerine etkisi de söz konusu olabilmektedir. Yapılan bir araştırmada 10 farklı biyojen amin ve mikrobiyal kontaminasyonun (yabani maya ve laktik asit bakterileri) etkileşimi bira fermentasyonu sırasında birlikte irdelenmiştir. Yedi gün süren fermentasyon sırasında amin içeriğinde önemli bir değişme gözlenmezken sadece tiramin konsantrasyonu belirgin bir şekilde (8 mg/l'den 30 mg/l'ye) artış göstermiştir. Yabani maya sayısı ile tiramin içeriği arasında herhangi bir ilişki bulunmazken tiramin ve laktik asit bakterileri arasında önemli bir pozitif ilişki belirlenmiştir (Izquierdo-Pulido ve ark., 1996).

Izquierdo-Pulido ve ark. (1997) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Pediococcus* türlerinin bira fermentasyonu sırasında tiramin ürettiği ve tiramin konsantrasyonunun kontaminasyon düzeyine bağlı olduğu belirlenmiştir.

Kalac ve ark. (2002)'ye göre amin üretiminde *Lactobacilli* *pediococci*ye göre daha etkilidir. Tiramin ve histamin şişelenmiş birada yetersiz pastörizasyondan dolayı LAB tarafından meydana gelebilmektedir.

Kalac (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bira çeşidinin biyojen amin miktarı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığı ve biyojen aminlerin esas olarak fermentasyon sırasında meydana geldiği belirlenmiştir.

2.3.7. Şarap

Diğer gıda ürünleriyle karşılaştırıldığında şaraplarda biyojen aminler daha düşük miktarlarda bulunmaktadır. Ancak alkollü içeceklerde; etanolle biyojen aminler arasında oluşan sinerjik etkiden dolayı bu bileşikler daha da önem taşımaktadır (Busto ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalarda şaraplarda 20 biyojen aminden fazlası çok çeşitli faktörlere bağlı olarak birkaç mg/l'den 50 mg/lt'ye kadar değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Busto ve ark., 1994).

Şaraplarda bulunan başlıca biyojen aminler histamin, putresin ve tiramindir. Metilamin, etilamin, feniletilamin, izoamilamin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin ise üzüm sırasında tespit edildikleri ancak şarap üretimi sırasında yıkıma uğradıkları tespit edilmiştir (Lonvoud-Funel, 2001).

Yüksek miktarda biyojen amin bulunduran gıda ürünleri serbest aminoasit miktarını artıran mikrobiyal proteolitik aktiviteye sahip proteince zengin gıdalardır. Şaraplar protein bakımından zengin olmamasına rağmen serbest aminoasitler içerirler (Üren ve ark., 2001).

Aminoasit kompozisyonu şarap üretiminde önemlidir. Aminoasitler mayalar tarafından fermentasyon sırasında azot kaynağı olarak kullanılırken, bir kısmı da ölü mayaların otolizi sırasında protealiz ile ortaya çıkmaktadır. Bir kısmı üzüm proteinlerinin enzimatik yıkımı ile elde edilmektedirler. Üzüm çeşitliliğine ve üretim alanına göre aminoasit asit yapısı değişmektedir. Prolin şaraplarda en fazla bulunan aminoasittir (Soufleros ve ark., 1998).

Soufleros ve ark. (1998) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, malolaktik fermentasyon sırasında amino asit konsantrasyonunun azaldığı, biyojen amin konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir.

Biyojen amin konsantrasyonunun toplam aminoasit konsantrasyonu ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu, fakat teker teker herbir biyojen aminin kendi öncül aminoasitleri ile negatif bir korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Şaraplarda biyojen amin oluşumu sadece belirli mikroorganizmaların varlığı ile ilişkili olmayıp diğer faktörlere de bağlıdır (Üren ve ark., 2001). Hammadde kalitesi, şarap üretim prosesinin teknolojik koşulları örneğin; sıcaklık ve kükürt uygulaması; malolaktik fermentasyon, mayşe fermentasyonu, fıçıda olgunlaştırma süresi, şıradaki bakteri ve maya gelişimi biyojen amin oluşumunda rol oynamaktadır. Bütün bunlara ek olarak kırmızı şarap üretiminde mayşe fermentasyonu süresi ve şıradaki amino asit içeriği, bentonit uygulaması da etkili olmaktadır.

Ayrıca Bauze ve ark. (1995) şaraplarda yaptıkları çalışmalarda biyojen amin oluşumunda azotlu gübre uygulaması, maya, mayşe fermentasyonu, alkol fermentasyonu süresi ve tahta fıçılarda dinlendirme gibi faktörlerin etkili olduğunu vurgulamışlardır (Denli ve Anlı, 1998).

Şarap üretim prosesinin teknolojik koşulları ve hammaddenin kalitesi biyojen amin oluşumunda önemli parametreler olarak öne çıkmaktadır (Zappavigna ve ark., 1974). Şaraptaki son amin konsantrasyonu üzerine şarap üretim yöntemleri de etkili olmaktadır (Denli ve Anlı, 1998).

Üren ve ark. (2001) gerçekleştirdikleri çalışmada geç hasat edilen üzümlerin asitliği daha düşük olduğu için, bu üzümlerden yapılan şarapların en yüksek biyojen amin miktarına sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Zee ve ark. (1983) tarafından Kanada, Amerika ve Avrupa şaraplarında yapılan bir çalışmada biyojen aminler tespit edilmiş ve

aralarındaki farklılığın üzüm çeşidinin ve şarap üretim prosesinin farklılığından kaynaklandığı belirlenmiştir. Ayrıca Fransa'nın farklı bölgelerinde üretilen şaraplarda biyojen amin miktarlarının farklılığının coğrafik koşullar ve şarap üretim prosesinin farklılığından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Şaraplarda biyojen amin oluşumu üretim süreci sırasında yeterli hijyen koşullarının sağlanamaması ile de ilgilidir (Moreno-Arribas ve ark., 2003). Buteau ve ark. (1984) şaraplarda biyojen aminlerin mikroorganizmalarca kontaminasyon sonucunda oluştuğunu ve şarap üretiminde biyojen aminlerin hijyenik olmayan koşulların indikatörü olduğunu belirtmiştir. Bu durumda histamin şarap üretimindeki olumsuzluğun bir indikatörü veya şarapların bir kalite parametresi olarak gösterilebilir.

Şarap yapım sürecinde kullanılan aletlerde üzümün doğal mikroflorasından kaynaklanan bakteriyal popülasyon da bu aminlerin şaraplarda oluşumuna neden olabilmektedir.

Kırmızı şarap üretimi; kırmızı renk maddelerinin ekstraksiyonu için üzüm kabukları ve pulpu varlığında gerçekleştirilir. Bu durum ise şarapta yüksek histidin konsantrasyonuna yol açar. Eğer kırmızı şarap tortu ile uzun süre tutulursa peptidlerin ve serbest aminoasitlerin laktik asit bakterilerince hidrolizasyonu ve dekarboksilasyonu için uygun süre ve ortam sağlanmış olur ve sonuçta yüksek biyojen amin konsantrasyonu gözlenir (Üren ve ark., 2001).

Goni ve Azpilicueta (2001) maya suşunun şaraptaki biyojen amin içeriğine etkisi üzerine çalışmışlardır. Maya suşuna göre biyojen amin miktarları arasında az bir farklılık tespit edilmiştir.

Bentonit çoğunlukla beyaz şarap üretiminde durultma amaçlı kullanılmaktadır. Bentonit kısmen histamini absorplar ve bu durum beyaz şaraplarda daha düşük histamine neden olmaktadır (Üren ve ark., 2001;

Lonvoud-Funel, 2001). 5 g/l bentonit şaraplardaki histamin içeriğini 2 mg/l nin altına düşürmek için yeterlidir (Jakob, 1968).

Malolaktik fermentasyon alkol fermentasyonundan sonra neredeyse tüm kırmızı şaraplarda ve çoğu beyaz şarapta istenmektedir. Bu fermentasyonun amacı malik asit dekarboksilasyonu ile asitliğin azaltılması ve ikincil bakteriyal metabolizma ile duysal kalitenin kompleksleştirilmesidir (Lonvoud-Funel, 2001)

Şıra ve şarap birkaç laktik asit bakterisinin gelişimini destekleyen seçici bir ortamdır. Bu ortamda, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türleri bulunmaktadır. Alkol fermentasyonu sırasında LAB popülasyonu genellikle *Oenococcus oeni*'den oluşmaktadır (Moreno-Arribas ve ark., 2003).

Şarap üretiminde malolaktik fermentasyon açısından amaçlanan malolaktik bakterilerin çalışmasının teşvik edilmesi öte yandan arzu edilmeyen bakterilerin aktivitesinin önlenmesidir (Lonvaud-Funel, 2001).

Biyojen aminler arasında histamin şaraplarda en sık rastlanılanıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda şarap yapım prosesinde malolaktik fermentasyon sırasında *O. oeni* suşlarının baskın hale geldiği ve bazı suşlarının HDC aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *O. oeni* IOEB 9204 üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada bu suşun HDC aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sitrik asit ve L-laktik asit HDC aktivitesini inhibe edici etkiye sahiptirler. Fakat sitrik asit malolaktik fermentasyon sırasında bakteriler tarafından kullanılır. L-laktik asit malik asit dekarboksilasyonu sonucu şarapta birikmektedir. 2 g/l L-laktik asit aktiviteyi % 22 oranında inhibe etmektedir (Lonvaud-Funel, 2001).

Rollan ve ark. (1995) histidin dekarboksilaz aktivitesine şarapta bulunan bazı bileşiklerin etkisini incelemişlerdir. Buna göre pH 7,6'da enzim sigmoidal bir eğri göstermiş, % 12 alkol konsantrasyonunda hücre süspansiyonu içerisindeki enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir.

Bakterilerin dekarboksilasyon kapasiteleri suşlarına göre değişmektedir. Bu nedenle pH hem bakterilerin biyolojik aktivitesi ve çeşitliliğine karar vermede, hem de mikroorganizmalar için seçici bir faktördür. pH arttıkça biyojen amin miktarı da artış göstermektedir. Beyaz şaraplar genelde kırmızı şaraplara göre daha asidik oldukları için biyojen amin içerikleri daha düşüktür (Lonvaud-Funel, 2001).

Malolaktik fermentasyondan sonra şaraptaki maya ve bakterileri elimine etmek için şarap kükürtdioksit ile muamele edilir. Bunun normalde mikroorganizmaların neden olduğu değişimleri engellemesi gerekmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda fermentasyon sonunda artan pH'nında etkisiyle kükürtdioksidin bakterilerce gerçekleştirilen biyokimyasal aktiviteyi durdurmadığı ve bazı biyojen amin miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Özellikle kırmızı şaraplarda polifenol içeriğinden ötürü bu sonuç çok daha net görülebilmektedir (Lonvaud-Funel, 2001).

Soufleros ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada biyojen amin analizi yanında ester, alkol, uçucu asitlik, karbonil bileşikleri, poliol ve organik asit analizleri yapılmıştır. Biyojen amin içeriği ile bu bileşikler arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

İspanyol şaraplarında histamin, tiramin düzeyi ile kükürtdioksit içeriği, uçar asit miktarı ve malolaktik fermentasyon arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmacılar beyaz ve pembe şaraplarda bu iki amin ve uçar asit miktarı arasında önemli bir pozitif korelasyon belirlemelerine karşın kırmızı şaraplarda amin içeriği ve kükürtdioksit düzeyi arasında önemli negatif korelasyon olduğunu belirlemişlerdir. Bütün şarap örneklerinde

amin içeriği ve malolaktik fermentasyon derecesi arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir (Vidal-Carou ve ark., 1990).

Tüketicilerin daha sağlıklı ve iyi gıda tüketme istekleri, biyojen aminlerin bahsedilen toksikolojik etkileri ve uyulması gereken yasal düzenlemeler göz önüne alındığında konunun önemi ve şarap üreticilerinin bu konuda hassasiyet göstermesinin gerekliliği anlaşılmaktadır. Üretilen şarabın asit karakterine göre malolaktik fermentasyon gerekli görülüyorsa (özellikle asidi düşük, pH'sı yüksek olan kırmızı şaraplarda) tortunun fermentasyondan hemen sonra ayrılmasına özen gösterilmeli, malolaktik fermentasyon oluşumuna neden olan faktörler ortadan kaldırılmalıdır. Malolaktik fermentasyonun uygulanacağı durumlarda ise kullanılacak saf kültürlerin amino asit dekarboksilaz aktivitesi bir seleksiyon kriteri olarak mutlaka ele alınmalıdır.

2.4. Biyojen Aminlerin Toksikolojik Etkileri

Biyojen aminler insan ve hayvanlarda hastalıklara neden olabilen toksik bileşiklerdir. Sinir sistemi üzerinde (psikoaktif) veya damarlar üzerinde (vasoaktif) doğrudan veya dolaylı etkilere sahiptirler. Örneğin tiramin ve histamin, sinir sisteminde ve vasküler sistemde bu tür etkiler gösterebilirler (Van-Boekel ve Arentsen-Stasse, 1987).

Son yıllarda biyojen aminlerin gıdalardaki varlığı ve saptanması bu bileşiklerin insan vücudu üzerine olan farmakolojik ve fizyolojik etkilerinden dolayı gittikçe önem kazanmıştır (Bauza ve ark., 1995).

Çizelge 2.3.'de biyojen amin bulunduran gıdaların tüketimiyle meydana gelen toksik etkiler verilmektedir (Shalaby, 1996).

Çizelge 2.3. Biyojen aminler ve Farmakolojik Etkileri

Biyojen Amin	Öncül Amino Asit	Farmakolojik Etkiler
Histamin	Histidin	Adrenalin ve noradrenalin serbest bırakır. Motor ve duyu sinir hücrelerini uyarır. Solunum ve bağırsak düz kaslarını uyarır. Gastrik asit salgılanmasını kontrol eder. Kalp atışlarını hızlandırır.
Tiramin	Tirozin	Göz yaşı ve tükürük salgısını artırır. Solunumu hızlandırır. Kan şekeri seviyesini artırır.
Putresin ve kadaverin	Ornitin ve Lizin	Yüksek tansiyona neden olur. El ve ayaklarda hafif felç görülür.
β -feniletilamin	Fenilalanin	Kan basıncını attırır. Migrene neden olur. Noradrenalin serbest bırakır.
Triptamin	Triptofan	Kan basıncını artırır.

Yapılan çalışmalar sonucunda putresin, kadaverin gibi biyojen aminlerin ısıtma işlemi ile pirolidin ve piperidin gibi sekonder aminlere dönüştüğü ve bu sekonder aminlerin nitrit ile reaksiyona girerek kanserojenik bileşikler olan nitrozaminleri oluşturduğu saptanmıştır (Halasz ve ark., 1994).

Histamin biyolojik olarak aktif bir kimyasaldır ve piridoksal fosfat içeren dekarboksilaz enzimi aracılığıyla histidinin dekarboksilasyonu sonucu oluşur. Histamin hücrel membranlarda reseptörlerle etkileşimi nedeniyle toksik etkiler gösterir. H_1 ve H_2 reseptörleri olarak bilinen histamin reseptörlerinin iki tipi insanlarda mevcuttur. Histamin zehirlenmesinin ortak semptomları bu iki reseptörü içeren kardiyovasküler sistem üzerinde histaminin etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. Histamin, kan damarlarının ve kılcal damarların genişlemesine neden olmaktadır (Stratton ve ark., 1991).

Histamin iki enzimatik iz yolu üzerinden metabolize olmaktadır. Birinci iz yolunda, histaminin halkalı yapısı histamin-N-metiltransferaz enzimi ile N-metil histamin oluşturmak üzere metillenmekte ve N-metil histamin de metil imidazol asetik asit oluşturmak üzere MAO ile okside olmaktadır. İkinci iz yolunda, DAO enzimi ile histamin okside olmakta ve bunun sonucunda imidazolasetik asit oluşmakta ve vücuttan atılmaktadır (Stratton ve ark., 1991).

Normal koşullarda memelilerin sindirim sisteminde dietle vücuda alınan biyojen aminler detoksifiye edilmektedirler. MAO ve DAO enzimleri detoksifikasyon mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. *Potentiatorler* tarafından detoksifikasyon inhibe edilebilmektedir. *Potentiatorler* putreaktif aminler veya farmakolojik ajanlar olarak sınıflandırılabilirler (Silla-Santos, 1996). Putresin ve kadaverin (putreaktif aminler) gibi bazı aminler histamini detoksifiye eden

enzimlerin her ikisini de (DAO ve MAO) inhibe etmektedirler. Belirli ilaçlar (farmakolojik ajanlar) ise histamin zehirlenmesinde yardımcı faktörleri içermektedir. Bazı antihistaminler, antimikrobiyallar ve diğer bazı ilaçlar histamini metabolize eden enzimleri inhibe edebilmektedir (Stratton ve ark., 1991).

Tiramin, triptamin ve β -feniletilamin vazodaktif aminler olarak tanımlanmaktadır (Shalaby, 1996). Şiddetli baş ağrısı ve yüksek tansiyon krizi olarak ortaya çıkan *peynir reaksiyonu*, tiramince zengin gıdaların tüketilmesinden sonra görülmektedir. Bu tür zehirlenme en fazla peynirlerde görülmektedir (Vale ve Gloria, 1998).

Çizelge 2.4.'te dünyanın değişik ülkelerinde biyojen amin kaynaklı gıda zehirlenmelerine neden olan gıdalar verilmiştir.

Çizelge 2.4. Biyojen amin kaynaklı gıda zehirlenmesine neden olan gıdalar

ÜLKE	GIDA
KANADA	Balık, Çedar Peyniri
DANİMARKA	Balık
FRANSA	Balık, İsveç Peyniri
ALMANYA	Balık, Gouda Peyniri
BÜYÜK BRİTANYA	Balık
JAPONYA	Balık, tavuk
HOLLANDA	Gouda peyniri
YENİ ZELLANDA	Balık
ABD	Balık, İsveç peyniri

2.5. Yasal Düzenlemeler

Biyojen aminlerin bahsedilen toksikolojik etkileri düşünüldüğünde bu konuda ülkelerin yasal düzenlemeler getirmesi gerekliliği ve bu konuya yeterli önemin verilmesinin gerekliliği anlaşılmaktadır.

Histamin taze balıklarda genellikle 50 ppm'den daha az düzeyde bulunmaktadır. Bu aminin gıdalarda yüksek düzeyde bulunması histamin zehirlenmesine neden olduğundan, bazı ülkeler yasal düzenlemeler yaparak belli gıdalar, özellikle balık ve ürünleri için maksimum kabul edilebilir histamin düzeyi belirlemişlerdir. Bu limitlerin ülkeye bağlı olarak 100-1000 ppm arasında değiştiği bildirilmektedir (Veciana-Nogues ve ark., 1989). Yaklaşık 100 ppm histamin alımı orta düzeyde klinik semptomların ortaya çıkması için yeterlidir (Krüger ve ark., 1995).

ABD sadece tuna balığında bulunabilecek histamin ile ilgili yasal bir takım sınırlamalar getirmiştir. Buna göre, 50 mg histamin/100 g tuna insan sağlığına zarar verebilecek değer (HAL), 10 mg histamin/100 g tuna balığının dekompoze olduğunu gösteren değer (DAL)'dir (Stratton ve ark., 1991).

Arnold ve Brown (1978) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 1 g histamin/kg gıda alımının insanlarda toksik etkiye neden olduğu, 3 mg feniletilamin alımının kişilerde migren ağrılarına neden olduğu, 6 mg toplam tiramin alımının MAO inhibitörü alan kişilerde tehlikeli bir doz olduğu belirlenmiştir (Shalaby, 1999).

Maijala ve Eerola (1993)'e göre 8-40 mg histamin alımı az, 40-100 mg histamin orta düzeyde, 100 mg'ın üzerinde histamin alımı yüksek düzeyde histamin zehirlenmesine neden olmaktadır. Hernandez - Javer ve ark. (1997)'na göre β -feniletilamin için toksisite düzeyi gıdalarda 30

mg/kg olarak ifade edilmiş olup, putresin ve kadaverin histamin ve tiramin *potentiator* olarak gösterilmiş ancak bunlar için toksik limitler ifade edilmemiştir (Ayhan ve ark., 1999).

Lüthy ve Schlatter (1983)'a göre oral histamin alımında kritik doz 100-200 mg olarak ifade edilmiştir. Til ve ark. (1997) deney hayvanlarında gerçekleştirdikleri çalışmada tiramin, putresin ve kadaverin için 180 mg/kg vücut ağırlığı başına günlük alımın herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığını ifade etmişlerdir.

Avrupa Birliği, ABD ve FDA 50-200 mg histamin /kg balık dokusu olarak histamin sınırını belirlemişlerdir (Aygün ve ark., 1999).

Süt ve ürünleri için belirlenmiş herhangi bir limit bulunmamakla beraber, Taylor ve ark. (1982), gıda zehirlenmesine neden olabilecek peynirin 15 mmol /kg histamin içerdiğini ifade etmişlerdir. Tiramin için 100-800 mg/kg düzeyinin resmi bir değer olmamakla beraber tehlikeli olabileceği belirtilmektedir (Stratton ve ark., 1991).

Öğün başına 40 mg'ın üzerinde biyogen amin alımı potansiyel olarak toksik olarak düşünülmektedir. Tüm aminler eşit toksisiteye sahip olmamakla beraber histamin, tiramin ve β -feniletilamin için bu değer söz konusu iken, gerçekleştirilen çalışmalara göre peynirde tiramin, histamin, putresin, kadaverin 900 mg/kg değerini geçmemelidir (Valsamaki ve ark., 2000).

Şaraplarda 8 mg/l histamin alımının baş ağrısına neden olduğu ifade edilmektedir (Gloria ve ark., 1998).

Bazı ülkelerde şaraplarda bulunan histamin için tavsiye edilen en üst limit Almanya 2 mg/l, Belçika 5-6 mg/l, Fransa 8 mg/l ve İsviçre 10 mg/l olarak ifade edilmektedir (Gloria ve ark., 1998).

Türk Gıda Kodeksinde sadece balıklar ve şaraplar için ve yalnız histamine ait kabul edilebilir en yüksek değerler mg/kg olarak yer almaktadır. Balıklar için 200 mg/kg, şaraplarda ise 10 mg/kg sınır değeri verilmiştir.

2.6. Literatürdeki Biyojen Amin Analiz Yöntemleri

Histamin ve diğer biyojen aminlerin nitel ve nicel tayinleri için florimetrik, enzimatik ve kromatografik çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler farklı aminlerin ayrımı için en uygun yöntemlerdir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), Gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ve yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) biyojen amin analizinde kullanılan kromatografik yöntemlerdir (Shakila ve ark., 2001). Bunlar içinde HPLC en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemle biyojen amin analizi için kolon öncesi yada kolon sonrasında dansil klorür, OPA, benzoil klorür, dabsil klorür gibi türevlendirme reaktiflerinden biriyle biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekmektedir (Busto ve ark., 1997). Bu türevlendirme reaktifleri içinde dabsil klorür iyi bir türevlendirme reaktifi olup, birincil ve ikincil aminlerin dabsil türevleri oda sıcaklığında oldukça kararlıdır (Romero ve ark., 2000). OPA ise aminlerle oldukça hızlı reaksiyon vermektedir fakat sadece birincil aminlerin türevlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Busto ve ark., 1997).

Gıdaların genelde matriksi kompleks olduğundan kromatografik olarak analiz edilmeden önce ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları gerçekleştirilmelidir. Bu amaçla sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) veya katı-faz ekstraksiyonu (SPE) gibi yöntemler kullanılabilmektedir (Busto ve ark., 1997).

Biyojen aminlerin ekstraksiyonu için perklorik asit, trikloroasetik asit (TCA), hidroklorik asit ve saflaştırılması için n – bütanol, hekzan,

dietileter, kloroform gibi organik çözügenlerin kullanıldığı yöntemler ileri sürülmüştür (Vale – Gloria, 1997).

Çizelge 2.6.'da bazı gıdalar ve bu gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonu için kullanılan solventler verilmektedir (Lange ve ark., 2002).

Çizelge 2.6. Gıdalardan biyojen amin ekstraksiyonunda kullanılan solventler

GIDA	EKSTRAKSİYON SOLVENTİ
Balık	
Som Balığı	TCA, HCl, metanol
Ringa	TCA
Peynir	
Rokfort	HCl, TCA, metanol
Gorgonzala	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

Lahana turşusu ve şarap, peynir, balık ve et ürünleri gibi gıdalara kıyasla kompleks olmayan bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle de lahana turşusu ve şaraplarda biyojen amin analizinde türevlendirme işleminden önce herhangi bir ekstraksiyon aşamasına gerek duyulmamaktadır. Sadece biyojen aminlerle HPLC analizi esnasında girişim yapan fenolik maddelerin uzaklaştırılması için şarap örnekleri polivinilprolidon (PVP) ile muamele edilmektedir (Busto ve ark., 1994).

Üren ve ark. (2001) tarafından lahana turşularında gerçekleştirilen çalışmada örnek salamurası ile havanda ezildikten sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş, filtrat saf suyla belli bir hacme tamamlandıktan sonra belli miktarı herhangi bir ekstraksiyona tabi tutulmadan türevlendirilip HPLC cihazında incelenmiştir.

Kalac ve Krizek (1997) mantar örneklerinden biyojen aminleri ekstrakte etmek için perklorik asitten yararlanmışlardır.

Hwang ve ark. nın (1997) balık örneklerinde yaptıkları çalışmada, blendırda parçalanan örnekler % 6 lık TCA çözeltisi ve 1 M HClO₄ ile 3 dk homojenize edilmiştir. Daha sonra santrüföj edilen örnekler süzölmüş ve türevlendirilen örnekler HPLC cihazında analiz edilmiştir.

Kalac ve ark. (2002) sebze örneklerinde ekstraksiyon solventi olarak 0,6 M perklorik asitten yararlanmış ve örnekler santrüföj ve süzme işlemlerinden sonra analize hazır hale getirilmiştir.

Moret ve Conte (1996) gerçekleştirdikleri çalışmada peynir örneklerinden biyojen aminlerin ekstraksiyonu için 0,1 M HCl ile 2 kez ekstraksiyondan yararlanmışlardır. Balık ve et ürünlerinde ise % 5'lik TCA ile 3 kez ekstraksiyondan yararlanılmıştır.

Azim (2002) biyojen aminlerin ekstraksiyon ve saflaştırılması için çeşitli denemeler gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalarda gıdanın içerdiği biyojen aminler önce uygun bir asitle sulu faza alınmıştır. Bu sulu faz 5 M NaOH ile bazik yapıldıktan sonra 3 kez n-bütanol / kloroform (1:1) ile muamele edilmiş, organik fazlar bir kapta toplanmıştır. Ardından sulu faz 3 kez de n- bütanol ile ayırma hunisinde çalkalanmış ve organik fazlar toplanmıştır. Her 2 organik faz ayrı ayrı 5'er kez 0,1 M HCl ile çalkalanmıştır. Her bir organik faza ait HCl'li faz toplanmış ve türevlendirilmiştir.

Karababa (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada OPA ile türevlendirme yöntemi kullanılarak HPLC'de analizler gerçekleştirilmiştir. 9 ml metanol içinde 0,2 g OPA çözülmüştür. Bu karışım üzerine 1 ml 0,4 M (pH 9) borat tamponu ve 160 µl 2-merkaptetanol ilave etmek suretiyle türevlendirme reaktifi hazırlanmıştır. Türevlendirme basamağında 25 µl standart karışım alınmış, üzerine 0,4 ml metanol, 0,475 ml saf su ve 0,1 ml türevlendirme reaktifi eklendikten sonra Hamilton 81610 Gas Tight şırıngadan 0,5 µm'lik filtre kullanılarak süzölmüş ve 20 µl örnek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizler 10 µ'luk C₁₈ kolonda 1,0 ml/dk akış hızında floresans dedektör kullanılarak ($\lambda_{uyarma} = 340$ nm, $\lambda_{emisyon} = 420$ nm) gerçekleştirilmiştir. Dereceli elüsyon tekniği kullanılmıştır. A solventi olarak asetat tamponu:THF(96:4)-metanol karışımı(%60-%40), B solventi olarak da metanol kullanılmıştır.Toplam süre 45 dakikadır.

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman(dk)</u>	<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>	<u>Metanol (%)</u>
0	75	25	55
8	75	25	55
12	66,7	33,3	60
25	50	50	70
30	0	100	100
35	66,7	33,3	60
40	75	25	55

Azim (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada benzoil türevleri kullanılarak biyogen aminlerin HPLC yöntemiyle analizi gerçekleştirilmiştir. Standart biyogen amin karışımı saf suyla 5 ml'ye tamamlanmış, 3 ml 5 M NaOH eklenerek ortam bazik yapılmış ve 60 µl benzoil klorür ilave edilerek 30 sn kuvvetlice çalkalanmış ve 45 dk türevlendirmeye bırakılmıştır. Süre sonunda 5 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra biyogen amin türevleri 3 kez 4 ml dietileter ile ayırma hunisinde 2 dk süreyle çalkalanmış ve dietileter fazları toplanmıştır. Bu faz üzerine 2 g susuz sodyum sülfat ilave edilmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı başka bir test tüpüne aktarılmış ve eter fazı azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Tüpteki kalıntı 1 ml metanolde çözöldükten sonra 0,5 µm filtreden geçirilmiş ve 10 µl'si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizler 10 µ'luk C₁₈ kolon kullanılarak 1 ml/dk akış hızında absorbands dedektörde ($\lambda = 254$ nm) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak metanol, metanol : su (55:45) kullanılmış, aşağıdaki dereceli elüsyon programı ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman (dk)</u>	<u>Metanol(%)</u>	<u>Metanol:su (55:45)(%)</u>
0	0	100
4	11	89
12	67	33
15	67	33
20	100	0
25	0	100

Toplam süre=30 dk

Shakila ve ark. (2001) tarafından balık ve balık ürünlerindeki biyojen aminlerin tayini için gerçekleştirilen 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 ($\text{pH} = 9$) 1 damla 4 N NaOH çözeltisi ve 2ml, 10 ml asetonda 50 mg dansil klorür çözülmesi ile hazırlanan türevlendirme reaktifi ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışımın ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 55 °C'de 1 saat süreyle türevlendirilmeye bırakılmıştır. Dansillendirilmiş aminlerden 5-10 μl HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizler 10 μl 'luk C_{18} kolonda 254 nm dalga boyunda absorbanst dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak HPLC saflıkta metanol ve su kullanılmıştır. Dereceli elüsyon programı şöyledir:

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman (dk)</u>	<u>Metanol (%)</u>	<u>Su (%)</u>
0	70	30
3,5	75	25
7	80	20
10	100	0
20	70	30

Toplam Süre= 20 dk

TLC yönteminde GF_{254} kaplanmış plakalar (0,25 mm kalınlığında, 5*20 ve 20*20 plakalar) kullanılmış, 10 μl türevlendirilmiş amin plakaya damlatılmış ve klorofom : trimetilamin (100:25) karışımı kullanılarak developpe edilmiştir. Plakaya isopropanol:triethanolamin (8:2)

püskürtülerek aminlere floresans karakter kazandırılmış ve densitometrede kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir.

Romero ve ark. (2000) tarafından şaraplardaki 8 biyojen aminin analizi için dabsil türevleri kullanılmış ve analizler HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. 12,4 mM dabsil klorür çözeltisi, 40 mg dabsil klorür 10 ml asetonda çözülerek ve 15 dk ultrasonik muamele görerek hazırlanmıştır. Tampon çözelti 1,06 g Na_2CO_3 50 ml suda çözülerek hazırlanmıştır. 1,5 ml örnek ya da 2 ml standart karışımın pH'sı tampon çözelti ile 8,2'ye ayarlanmış ve 3,8 ml su eklenmiştir. 1,6 ml türevlendirme reaktifi (dabsil klorür) eklendikten sonra karıştırılıp, karışım su banyosunda 70°C'de 21 dk arada karıştırarak ısıtılmıştır. 4,6 ml dilüsyon çözeltisi (50 ml asetonitril+25 ml etanol+25 ml A solventi) ilave edilerek su banyosunda bekletilmiştir. 20 µl türevlendirilen örnek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analizler 1 ml/dk akış hızında C_{18} kolonda 40 °C'de gerçekleştirilmiştir. Dereceli elüsyon tekniği kullanılmıştır. A solventi olarak $4 \cdot 10^{-2}$ M sodyum asetat, % 10 (v/v) DMF (dimetilformamid) ve pH 5'e asetik asit ile ayarlanmış olan % 0,25 trietilamin karışımı, B solventi olarak asetonitril – tert-bütilmetil eter-su (87,5: 10 : 2,5, v/v/v) kullanılmıştır. Analizde kullanılan dereceli elüsyon programı şu şekildedir:

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman (dk)</u>	<u>A (%)</u>	<u>B(%)</u>
0	45	55
3	45	55
13	25	75
23	0	100
33	0	100
38	45	55
53	45	55

Toplam Süre=55dk

Özoğul ve ark. (2002) tarafından modifiye atmosferde paketlenmiş balık örneklerinde biyogen amin analizinde benzoil korür ile türevlendirme yöntemi kullanılarak HPLC’de analizler gerçekleştirilmiştir. TCA ile ekstrakte edilen örneğin 2 ml’si üzerine 1 ml asetonyitrilde hazırlanmış % 2’lik benzoil klorür türevlendirme reaktifi olarak ilave edilmiştir. 1 dk vorteks karıştırıcıda karıştırılan örnek 24 °C’de 15, 20, 30 ve 40 dk sürelerle türevlendirmeye bırakılmış, daha sonra 2 ml doymuş NaCl eklenip, 2 kez 2 ml dietileter ile aminler ekstrakte edilmiş ve eter azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. 500 µl asetonyitrilde çözülen örnekten 5 µl cihaza enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak asetonyitril ve HPLC saflıkta su kullanılmış dereceli elüsyon tekniği ile analizler gerçekleştirilmiştir. Dereceli elüsyon programı şöyledir:

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman (dk)</u>	<u>Asetonyitril(%)</u>	<u>Su(%)</u>	<u>Akış hızı(ml/dk)</u>
0	50	50	1,2
2	60	40	1,5
4	70	30	1,8
8	80	20	1,8

Toplam Süre=10 dk

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kullanılan Kimyasallar:

Sodyum hidroksit, benzoil klorür, sodyum klorür, sodyum asetat Merck; susuz sodyum sülfat, metanol (HPLC saflıkta), dietileter (HPLC saflıkta), Lab-Scan firmasından, hidroklorik asit, tetrahidrofuran J. T. Baker firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan standart biyojen aminler:

Metilamin hidroklorür: Merck, 806020

Etilamin hidroklorür: Acros Organics, 214250050

Propilamin: Merck, 807477

Putresin dihidroklorür: Fluka, 32810

Kadaverin dihidroklorür: Sigma, C-8561

Triptamin: Sigma, T-2891

β -feniletilamin: Sigma-P-2641

Spermin: Sigma, S-3256

Tiramin: Sigma, T-7255

Agmatin sülfat: Sigma, A-7127

Histamin dihidroklorür: Sigma, H-7250

Kullanılan Cihazlar :

HPLC Cihazı: Biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla Hewlett-Packard (HP) 1050 HPLC cihazı kullanılmıştır.

Ultrasonik Su Banyosu: HPLC cihazında kullanılan hareketli fazların degaz edilmesi için kullanılmıştır.

İyon Değiştirici: Saf su eldesinde kullanılmıştır.

Destilasyon Düzeneği : Hamilton marka destilasyon düzeneği saf su eldesinde kullanılmıştır.

pH metre : Mod 821 NEL marka pH metre asetat tamponu :THF (96:4)-Metanol'dan oluşan hareketli fazın pH'sını ayarlamakta kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Standartların Hazırlanması

Her bir biyojen amin standardı 25 ml 0,1 M HCl çözeltisi içinde farklı miktarlarda çözülerek stok olarak hazırlanmıştır. Çizelge 3.1.'de stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan biyojen amin miktarları görülmektedir.

Çizelge 3.1. Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan biyojen amin miktarları

Biyojen amin	Miktar (mg)
Tiramin	25,6
Etilamin	25,9
Kadaverin	25,4
Putresin	26,0
Metilamin	25,2
Triptamin	24,1
β -feniletilamin	33,0
Histamin	26,6
Agmatin	26,2
Propilamin	25,0
Spermin	42,2

Stok biyojen amin çözeltilerden belli hacimlerde alınıp hacimler saf suyla 25 ml'ye tamamlanarak standart biyojen amin karışımı elde edilmiştir. Bu karışım türevlendirme koşulları ve kromatografik koşulların belirlenmesinde kullanılmıştır. Çizelge 3.2.'de standart karışımı oluşturmak için stok biyojen amin çözeltilerinden alınan hacimler belirtilmiştir. Agmatin ve histamin ile gerçekleştirilen denemeler için standart çözeltilerin hazırlanmasında da çizelge 3.2.'de bu aminler için belirtilen hacimlerden alınarak 25 ml'ye seyreltilmiştir.

Çizelge 3.2. Standart Biyojen Amin Karışımında Kullanılan Stok Biyojen Amin Hacimleri

Stok biyojen amin çözeltisi	Hacim (ml)
Tiramin	1,8
Etilamin	1,5
Kadaverin	1,5
Putresin	1
Metilamin	1,2
Triptamin	1,9
β -feniletilamin	2
Histamin	2
Agmatin	0,8
Propilamin	1,5
Spermin	1,5

3.2.2. Türevlendirme

Biyojen aminlerin HPLC cihazında analiz edilebilmeleri için belirli dalga boyunda absorbands yapma ya da floresans özelliğe sahip olmaları gerekmektedir. Bu amaçla biyojen aminlerin dansil klorür, dabsil klorür, benzoil klorür ya da OPA gibi türevlendirme reaktiflerinin biriyle kolon öncesi veya sonrasında türevlendirilmeleri gerekmektedir.

Benzoil klorür biyojen aminlere 254 nm dalga boyunda absorbands yapma özelliği kazandırmaktadır. Biyojen aminlerle benzoil klorür arasındaki reaksiyon Schotten–Baumann açillendirme reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır.

Türevlendirme işleminde literatürde yer alan Hornero-Mendez ve Garrido-Fernandez (1997) ve Azim (2002) tarafından uygulanan yöntemlerden yararlanılmıştır.

Uygun türevlendirme koşullarının belirlenmesi amacıyla çizelge 3.2.'de belirtilen standart karışım kullanılarak çeşitli denemeler yapılmıştır. Agmatin ve histamin için de farklı denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde türevlendirme sıcaklığı, türevlendirme sırasındaki çalkalama süresi, türevlendirilen örneklerin bekletilmesi gibi faktörlerin etkisi irdelenmiştir.

Çizelge 3.2.'de belirtilen standart biyojen amin karışımından 5 ml şilifli bir tüpe alınmış, 3 ml 5 M NaOH eklenerek ortam bazik yapılmış ve 60 µl benzoil klorür (türevlendirme reaktifi) ilave edilmiştir. Tüpün ağzı kapatılarak kuvvetlice 30 sn çalkalandıktan sonra 45 dk türevlendirmeye bırakılmıştır. Süre sonunda 5 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra oluşan biyojen amin türevleri 4 kez 3 ml dietileter ile ayırma hunisinde 2 dk süreyle çalkalanmış ve dietileter içeren fazlar

alınmıştır. Bu fazlar birleştirildikten sonra bir miktar susuz sodyum sülfat ilave edilmiş ve 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı başka bir test tüpüne aktarılmış ve eter fazı azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Tüpteki kalıntı 1 ml metanolde çözüldükten sonra 0,5 µm filtreden geçirilmiş ve 10 µl'si HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Türevlendirme sırasındaki çalkalama işleminin süresinin agmatin ve histamin analizi üzerine etkisini belirlemek amacıyla çalkalama işlemi 30 sn ve 1 dk olmak üzere iki farklı sürede gerçekleştirilmiştir.

Türevlendirme sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla türevlendirme işlemi 21 °C, 25 °C, 30 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Türevlendirilmiş ve eterli fazı azot gazı altında uzaklaştırılmış olan standart biyojen amin karışımı 1 ay süreyle buzdolabında +4 °C'de bekletildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiş ve biyojen amin türevleri üzerine bekletmenin etkisi irdelenmiştir.

3.2.3 Kromatografik Koşullar

Yapılan denemeler sonucunda benzoil türevleri kullanılarak HPLC cihazında biyojen aminlerin ayrımı için en uygun koşullar belirlenmiştir. Buna göre;

Akış hızı: 10 µ'luk kolon için 1,0 ml/dk

5 µ'luk kolon için 0,9 ml/dk

Pompa: Dereceli Elüsyon Pompası

Enjeksiyon Miktarı: 10 µl

Kolon 1: Hichrom, C₁₈, 10 µ, 3,9*300 mm

Kolon 2: Phenomenex, Bondcolone, C₁₈, 10 μ , 3,9*300 mm

Kolon 3: Hichrom, C₁₈, 5 μ , 4,6*250 mm

Kolon Sıcaklığı: 21 °C, 25 °C, 30 °C

Ara yüzey: HP 35900

Dedektör: Waters 486 UV dedektör, λ =254 nm

Hassasiyet: 1-1,4 AUFS 10 μ 'luk kolon

2 AUFS 5 μ 'luk kolon

Mobil Faz: (A) 0,05 M Asetat tamponu: THF (96:4)-Metanol

(%60 THF'li asetat tamponu, % 40 metanol)

(B) Metanol

HPLC cihazında (A) hattına bağlanan asetat tamponu: THF(96:4)-metanol çözeltisinin hazırlanması için 2,4618 g sodyum asetat 600 ml suda çözülmüş, bu çözeltiden 576 ml alınıp 24 ml THF ile karıştırılmış ve üzerine 400 ml HPLC saflıkta metanol ilave edilmiş, pH ayarlaması yapılmış, sisteme bağlanmadan önce mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş, hareketli faz rezarvuarına alınmış ve içinde çözülmüş gazların uzaklaştırılması için ultrasonik su banyosunda degaz edilmiştir. pH 6,05, 7,00 ve 8,05 olmak üzere 3 farklı pH'da hazırlanan hareketli fazlar ile denemeler gerçekleştirilmiştir. B solventi olarak HPLC saflıkta metanol kullanılmış ve degaz edildikten sonra sisteme bağlanmıştır.

Biyojen aminlerin benzoil türevlerinin en uygun ayrımını sağlamak amacıyla denemeler sonucunda bir dereceli elüsyon programı belirlenmiştir.

Dereceli Elüsyon Programı

<u>Zaman (dk)</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>% metanol</u>
0	75	25	55
4	66,7	33,3	60
12	50	50	70
15	25	75	85
20	0	100	100
25	75	25	55
30	75	25	55

Toplam süre= 35 dk

Biyojen aminlerin en iyi ayrımını sağlamak amacıyla türevlendirme koşullarını ve kromatografik koşulları değiştirerek farklı değişkenlerin etkisi irdelenmiştir. Bu amaçla;

- Hareketli faz pH'sı,
- Kolon sıcaklığı,
- Kolon partikül çapı,
- Kolonun eski ya da yeni olması,
- Türevlendirme koşullarının (türevlendirme sıcaklığı, türevlerin bekletilmesi ve türevlendirme sırasındaki çalkalama süresi) etkileri irdelenmiştir.

4. BULGULAR

Biyojen aminlerin belirlenmesinde optimum kromatografik koşulların belirlenmesi amacıyla hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, kolon partikül çapı, kolonun yeni ya da eski olması, türevlendirme sıcaklığı ve koşulları gibi değişkenlerin biyojen aminlerin ayrımı üzerine olan etkilerini belirlemek için çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir.

4. 1. Hareketli faz pH'sı Denemeleri

HPLC cihazında (A) hattına bağlanan % 60 asetat tamponu:THF (96:4) - % 40 metanol'den oluşan çözeltinin pH'sı 6,05, 7,00 ve 8,05 olmak üzere 3 farklı değere ayarlanarak, 25 °C kolon sıcaklığında, 25 °C'de türevlendirilen standart karışımla 10 µ partikül çaplı C₁₈ kolonda çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir. Benzoil türevleri elde edilirken örnekler benzoil klorürle 30 sn çalkalanmıştır.

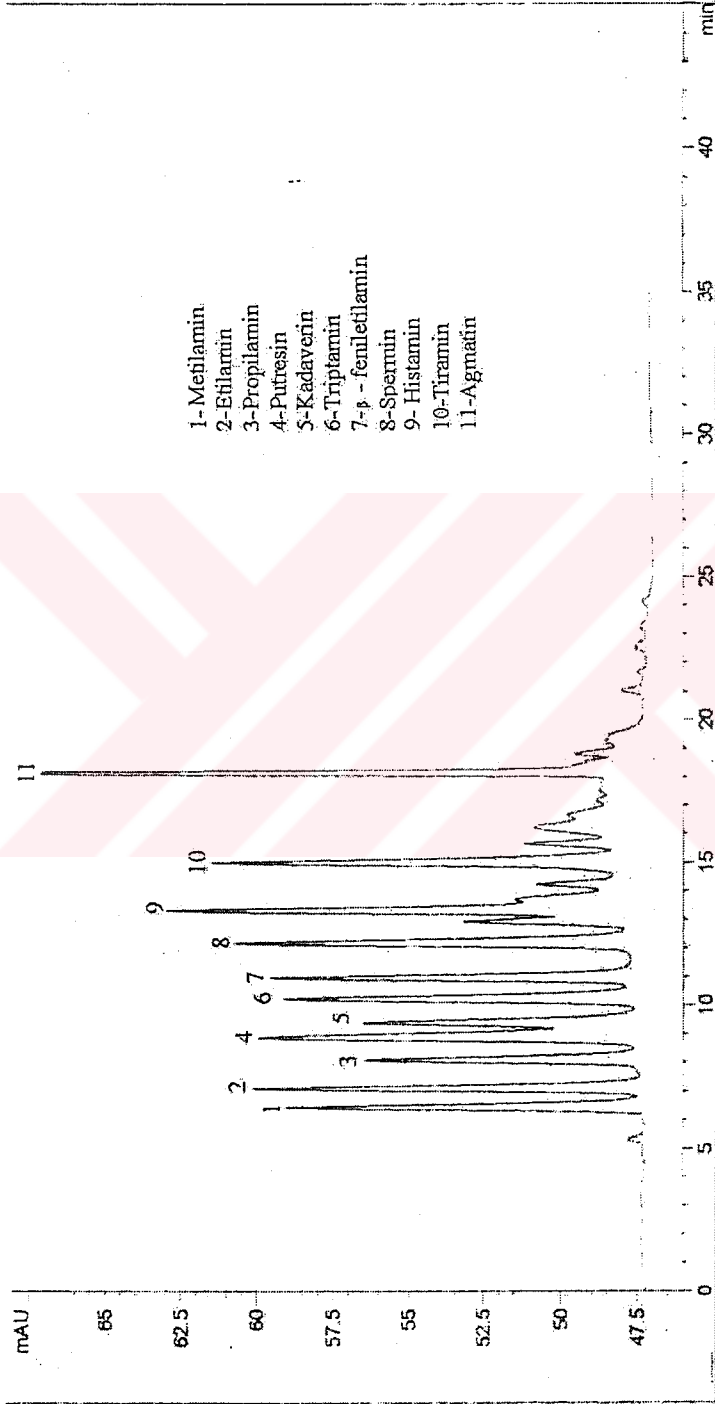
Birinci denemede, hareketli fazın pH değeri 6,05'e ayarlanmış, metilamin, etilamin, propilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β-feniletilamin, spermin, histamin, tiramin ve agmatinden oluşan standart karışım benzoil klorür ile türevlendirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Şekil 4.1.'de bu deneme sonucunda elde edilen kromatogram görülmektedir. Bu kromatogramdan da görüldüğü gibi agmatin bileşiği kısmen bozularak putresine dönüşmüş ve esas putresin pikini büyütüştür. Bu pH değerinde histamin bileşiğine ait pikin sağ ve sol tarafında 2 adet çatallanma görülmektedir. Sağ tarafta bulunan çatal pik histamine yanaşmıştır.

İkinci denemede, hareketli fazın pH'sı 7,00'ye ayarlanmış ve aynı standart karışım benzoil klorür ile türevlendirildikten sonra cihaza enjeksiyon yapılmıştır. Bu deneme sonucunda elde edilen kromatogram şekil 4.2.'de görülmektedir. Elde edilen kromatogram incelendiğinde kadaverin ve putresin piklerinin aynı büyüklükte olması beklenirken kadaverin bileşiğine ait olan pikin büyüklüğünün arttığı görülmektedir.

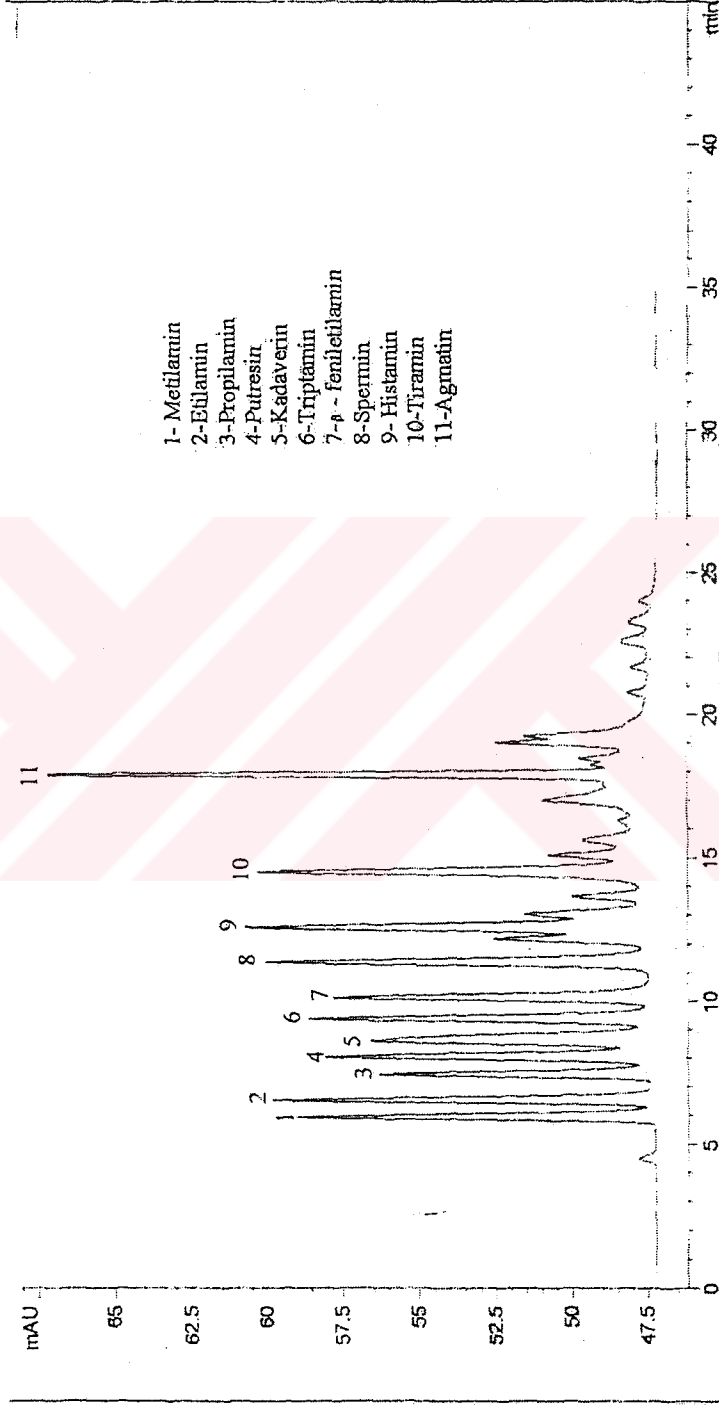
Bu artışın, agmatinin kısmen bozunmasıyla kadaverine yakın bir bileşiğe (K) dönüşmesi ve bu pikin kadaverin bileşiğine ait olan pikle çakışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kadaverine yakın bir bileşiğe ait olduğu düşünülen pik bu kromatogramda ve diğer kromatogramlarda (K) ile gösterilmiştir. Histamin bileşiğine ait pikin sağ ve sol tarafındaki çatallanmalar bu pH değerinde de görülmektedir. pH 6,05 koşullarındaki pike göre histaminin sağındaki çatal pik histamin bileşiğine ait olan pikten uzaklaşmıştır.

Hareketli fazın pH değerinin bazik ortama doğru kaymasının özellikle agmatin ve histamin gibi biyojen aminlerin bozunması ve ayrımı üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla hareketli fazın pH değeri 8,05'e getirilmiş ve standart karışım türevlendirilerek cihaza enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucunda alınan kromatogram şekil 4.3.'te verilmiştir. Bu kromatogram incelendiğinde agmatin bileşiğinin kısmen bozunması sonucu oluşan kadaverin benzeri pikin kadaverin bileşiğine ait olan pikle çakışmasından dolayı kadaverin bileşiğine ait pikin büyüklüğündeki artış görülebilmektedir. Histamin bileşiğine ait pikin sağ ve sol tarafındaki çatallanmalar bu pH değerinde de vardır. Tiramin bileşiğine ait olan pik kendinden sonraki pikle birleşmiştir.

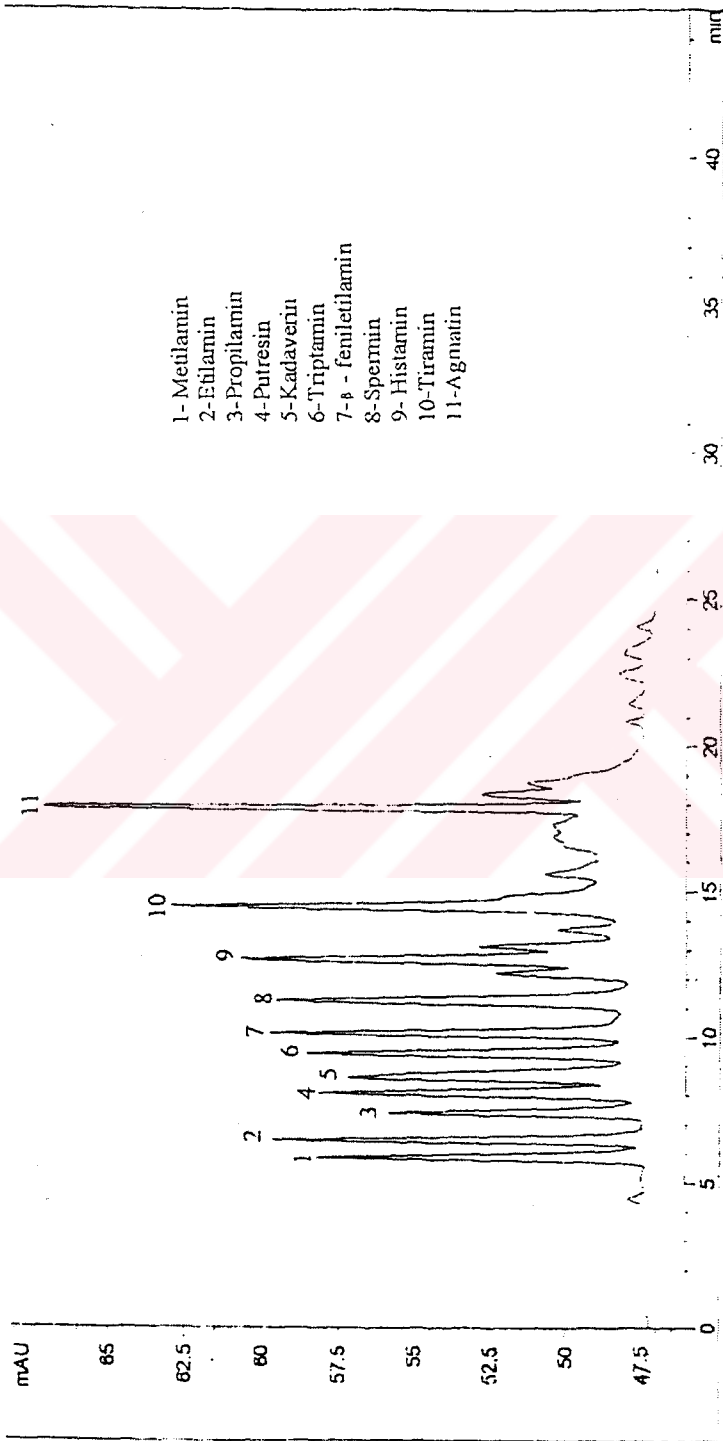
Elde edilen bu 3 kromatogram bir arada incelendiğinde, metilamin, etilamin, propilamin, spermin, β -feniletilamin, triptamin bileşiklerine ait olan piklerin 3 pH değerinde de büyüklüklerinde herhangi bir değişiklik görülmemektedir. pH 6,05 ve 7,00 değerlerinde tiramin bileşiğine ait olan pik sağ tarafında bulunan pikten ayrılırken, pH 8,05 değerinde tiramin sağ tarafındaki pik ile birleşerek tek bir pik oluşturmuştur. Her 3 pH değerinde de, agmatin kısmen bozunmaktadır. pH 6,05 değerinde agmatin kısmen bozunarak putresin, pH 7,00 ve 8,05 değerlerinde ise kadaverin benzeri bileşik vermektedir. pH 6,05, 7,00 ve 8,05 değerlerinde, agmatin aynı oranda bu bileşiklere dönüştüğünden agmatin bileşiğine ait olan piklerin büyüklüğü değişmemektedir. Histamin



Şekil 4.1. Hareketli faz pH'sı 6,05 iken elde edilen kromatogram



Şekil 4.2. Hareketli faz pH'sı 7,00 iken elde edilen kromatogram



Şekil 4.3. Hareketli faz pH'sı 8,05 iken elde edilen kromatogram

bileşğine ait olan pikin sağ ve sol tarafında her 3 pH değerinde de çatallanmalar görülmekte ancak pH 8,05'den 6,05'e doğru geldikçe sağdaki çatal pik esas histamin pikine yaklaşmaktadır.

4.2. Farklı Kolon Sıcaklıklarında Yapılan Denemeler

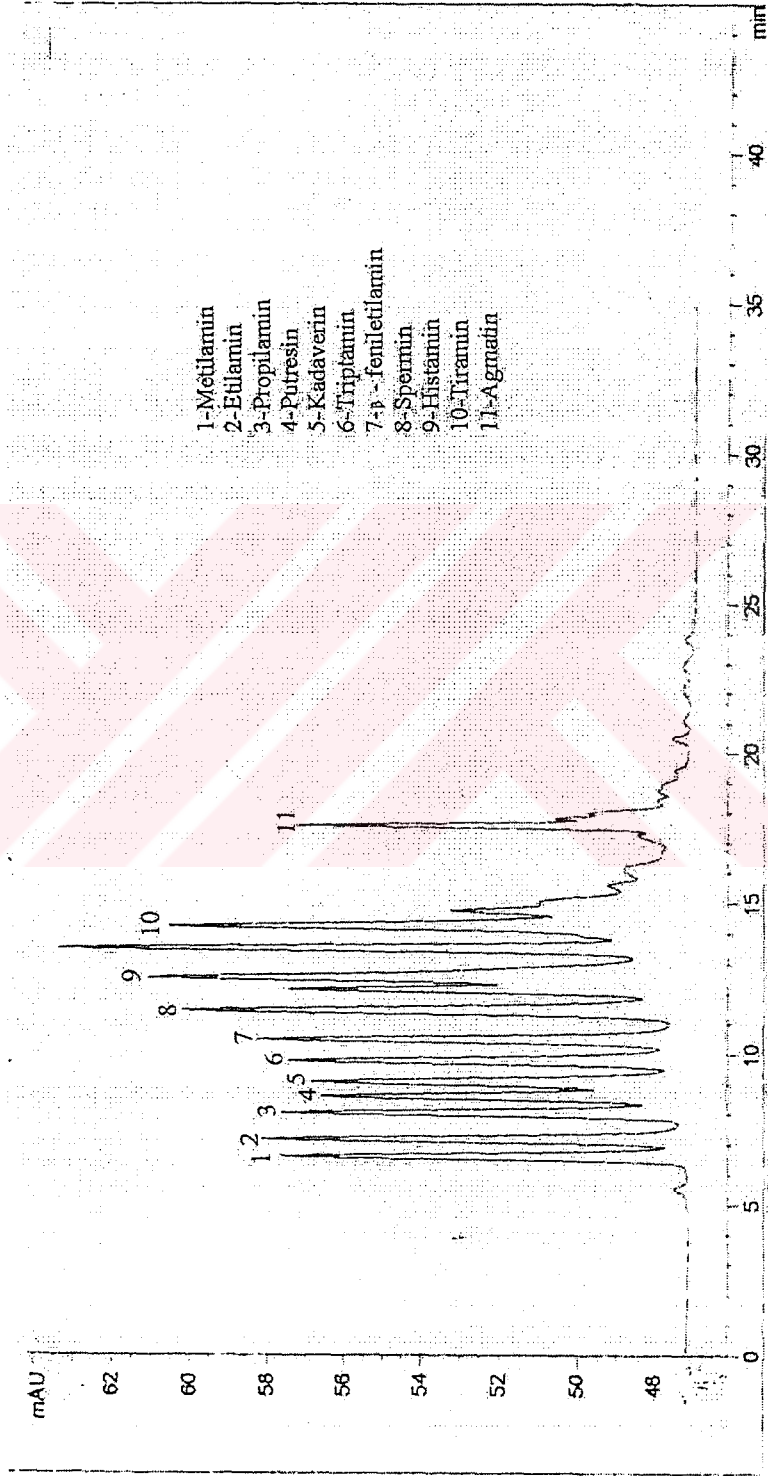
Kolon sıcaklığı ve hareketli fazın pH değerinin bir arada biyojen aminlerin ayrımı ve bozunmaları üzerine etkisini belirlemek ve kullanılacak optimum kolon sıcaklığını belirlemek amacıyla 10 µ partikül çaplı C₁₈ kolonda bazı denemeler yapılmıştır. Bu amaçla, metilamin, etilamin, propilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β-feniletilamin, spermin, histamin, tiramin ve agmatinden oluşan bir standart karışım hazırlanmış ve 25 °C'de benzoil klorür ile türevlendirilmiştir. Hareketli fazın pH'sı 6,05, 7,00 ve 8,05 değerlerine ayarlanmış ve her pH değerinde 21, 25 ve 30 °C kolon sıcaklıklarında denemeler gerçekleştirilmiştir. Benzoil türevleri elde edilirken örnekler benzoil klorür ile 30 sn çalkalanmıştır.

Birinci denemede; hareketli fazın pH değeri 6,05'e ayarlanmış ve 21, 25, 30 °C kolon sıcaklıklarında denemeler gerçekleştirilmiştir. Her 3 kolon sıcaklığında da 25 °C'de türevlendirilen standart karışımlar HPLC cihazına enjekte edilerek, şekil 4.4, 4.5. ve 4.6.'da görülen kromatogramlar elde edilmiştir. Bu kromatogramlar incelendiğinde çalışılan tüm sıcaklıklarda metilamin, etilamin, propilamin, spermin, triptamin, β-feniletilamin, tiramin bileşiklerine ait olan piklerin büyüklüklerinde bir farklılık bulunmamaktadır. Kadaverin ve putresin bileşiklerine ait olan pikler incelendiğinde bu pH'daki tüm sıcaklıklarda kısmen bozunan agmatinin az oranda bu bileşiklere katkısı olduğu görülmektedir. Tiramin bileşğine ait pik 3 sıcaklıkta da sağdaki pikten ayrılmıştır. 30 °C'de çalışırken histamin bileşğine ait olan pikin sağ ve sol kısmında çatallanmalar görülürken, 25 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında sağdaki çatal pik histamine yaklaşmaktadır. 21 °C'de ise histaminin sağdaki çatal pik histamin pikine eklenmektedir. 3 kolon

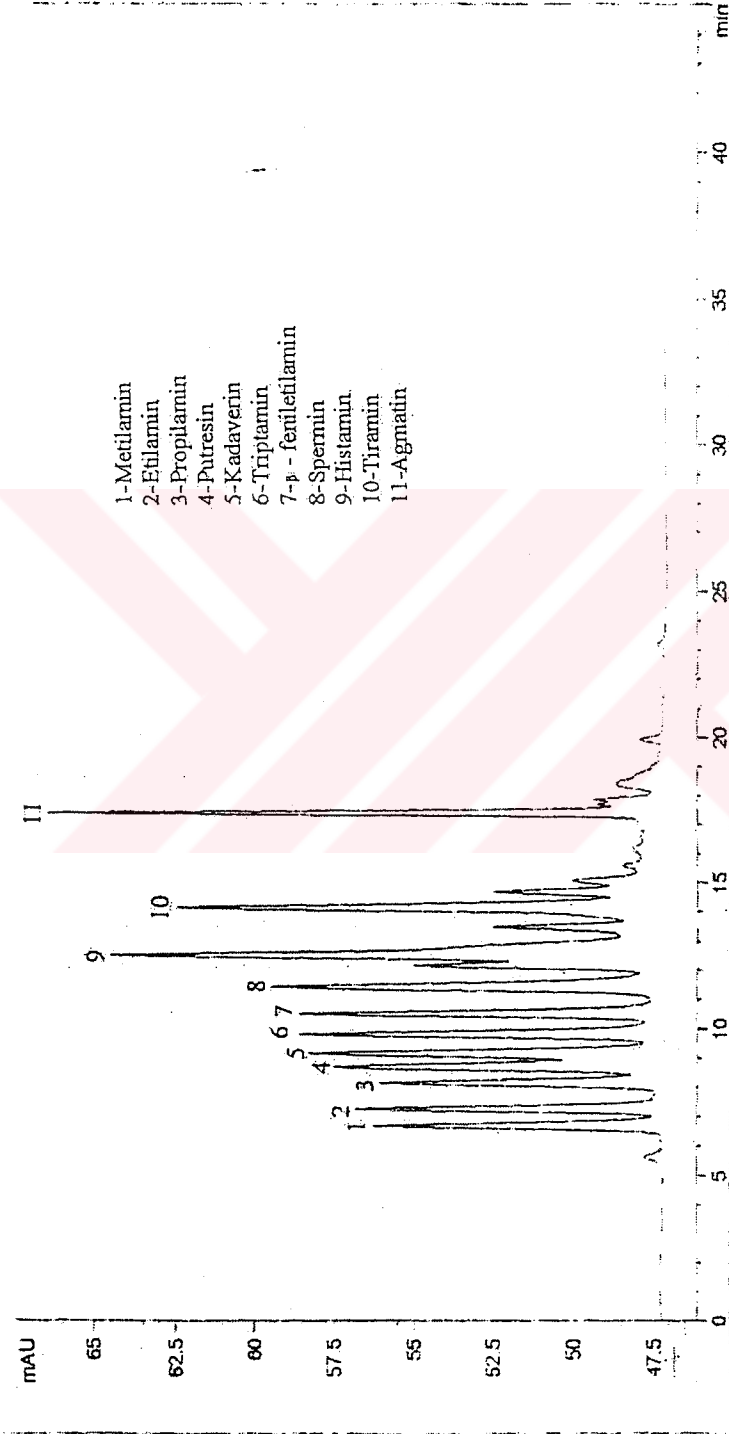
sıcaklığında ikişer paralel olarak gerçekleştirilen denemelerin sonuçları pik alanlarına göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, pH 6,05 değerinde $p < 0,05$ olasılıkla her 3 sıcaklıktaki histamin piklerinin büyüklükleri arasında fark bulunmamaktadır. Agmatin için istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında $p < 0,05$ olasılıkla her 3 sıcaklıktaki agmatin piklerinin büyüklükleri arasında fark vardır. 25 °C kolon sıcaklığında agmatin en fazla bulunurken, 21 °C’de en az miktarda bulunmaktadır.

Gerçekleştirilen 2. denemede ; hareketli fazın pH’sı 7,00 değerine ayarlanmış, 25 °C’de türevlendirilen standart karışımlar ile 21, 25 ve 30 °C olmak üzere üç farklı kolon sıcaklığında çalışılmıştır. HPLC cihazında analiz sonucu elde edilen kromatogramlar şekil 4.7., 4.8. ve 4.9.’da verilmiştir. Her 3 sıcaklık değerinde de agmatinin kısmen bozunmasından dolayı kadaverin pikinin olması gerekenden daha fazla çıktığı görülmektedir. Bu bozunma özellikle 21 ve 25 °C kolon sıcaklıklarında çalışıldığında daha belirgin olarak görülmektedir. Bu pH değerinde 25 ve 30 °C kolon sıcaklıklarında histaminin sağında ve solunda çatallanmalar görülürken, 21 °C’de histamin pikinin sağındaki çatallanma esas histamin pikine dahil olarak kaybolmaktadır. Ancak histamin için gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirmeye göre 21 ve 25 °C sıcaklıklarda $p < 0,05$ olasılıkla histamin piklerinin büyüklükleri arasında fark bulunurken, diğer sıcaklıklar arasında bir fark bulunmamıştır. Histamin pikinin alanı 21 °C da en büyüktür. Tiramin bileşiğine ait olan pik 25 ve 30 °C’de gerçekleştirilen çalışmalarda sağındaki pikten ayrılırken, 21 °C’de sağındaki pik ile birleştiği ve tek bir pik verdiği görülmektedir. Kromatogramlar incelendiğinde bu biyojen aminler dışındaki aminlerin büyüklükleri arasında bir farklılık görülmemektedir.

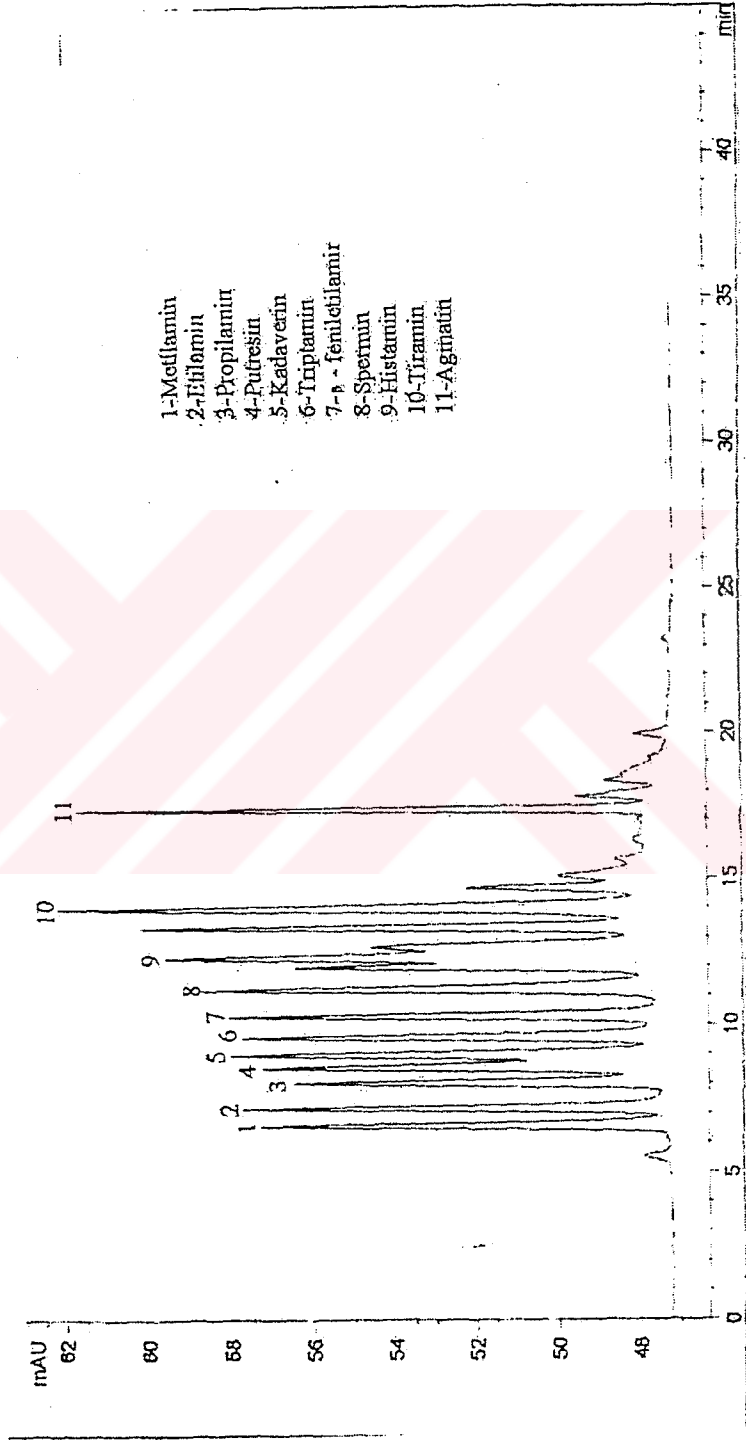
Üçüncü denemede hareketli fazın pH’sı 8,05 değerine ayarlanmış, 25 °C’de türevlendirilen standart karışımlar ile 21, 25 ve 30 °C kolon sıcaklıklarında çalışılmıştır. Elde edilen kromatogramlar şekil 4.10, 4.11. ve 4.12’de verilmiştir.



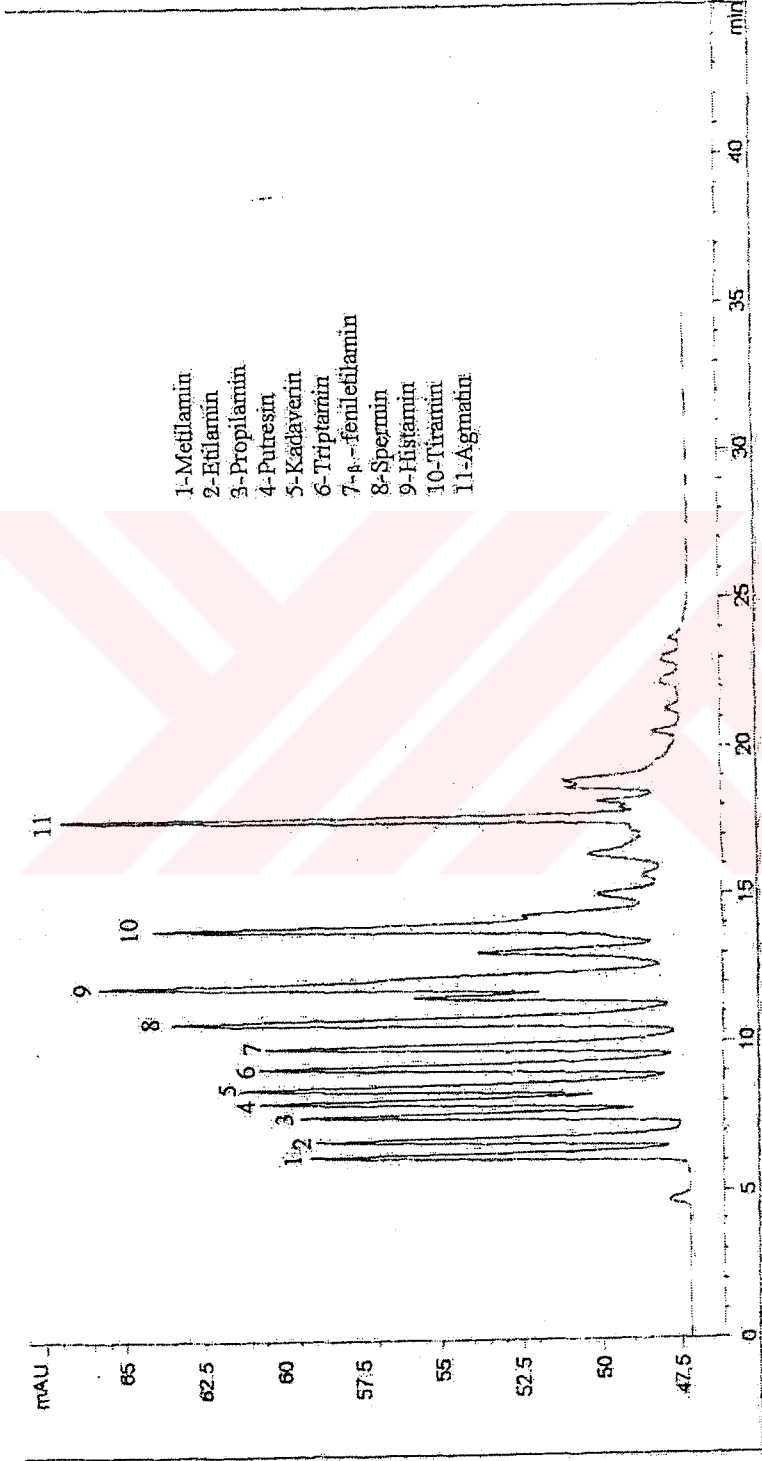
Şekil 4.4. pH 6,05'te 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



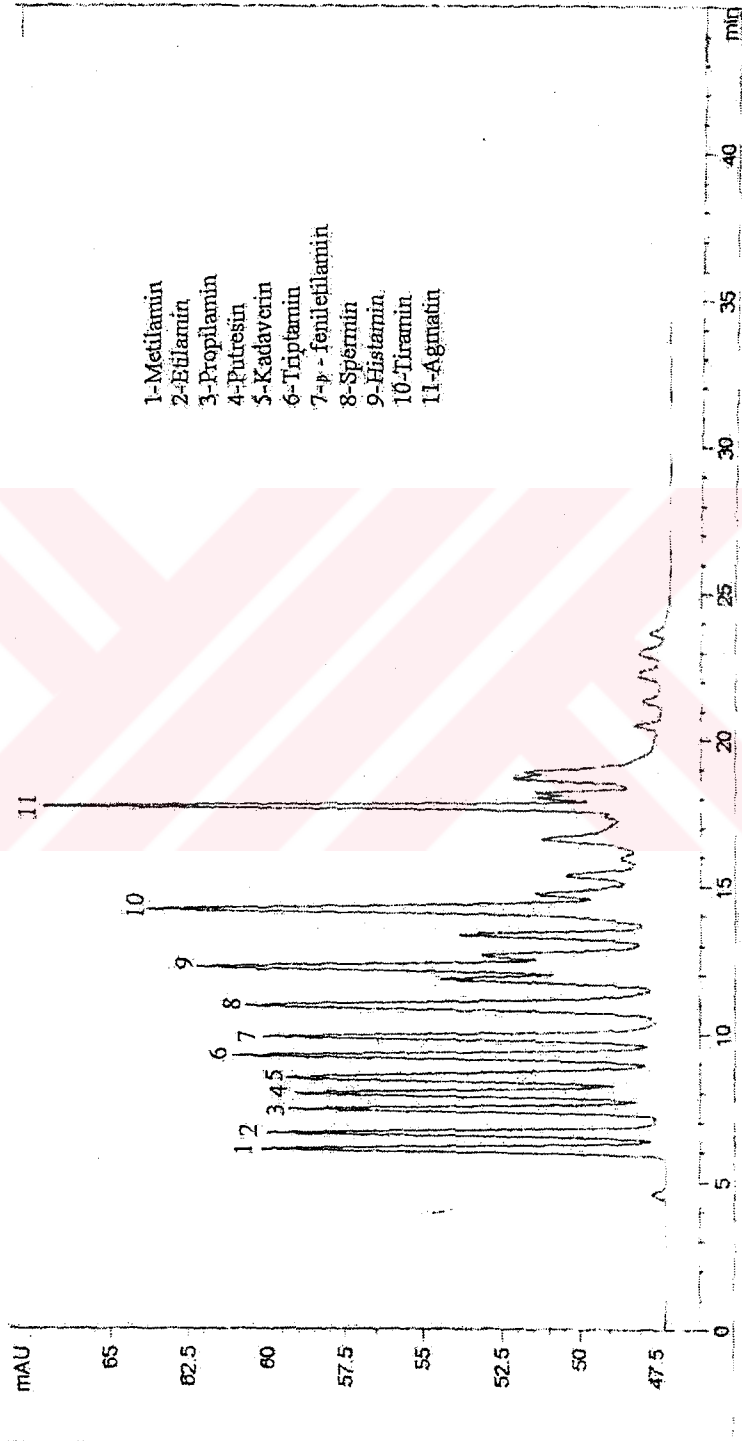
Şekil 4.5. pH 6,05'te 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



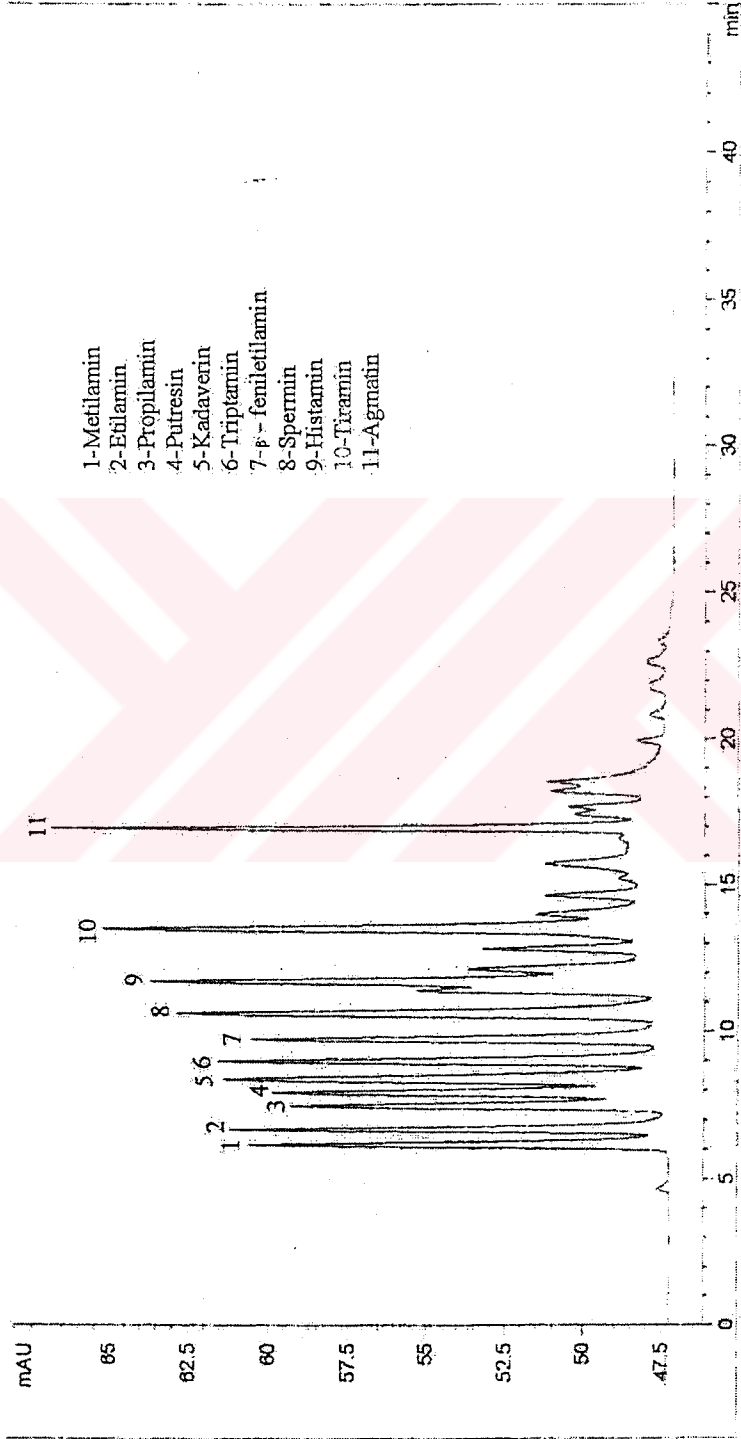
Şekil 4.6. pH 6,05'te 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



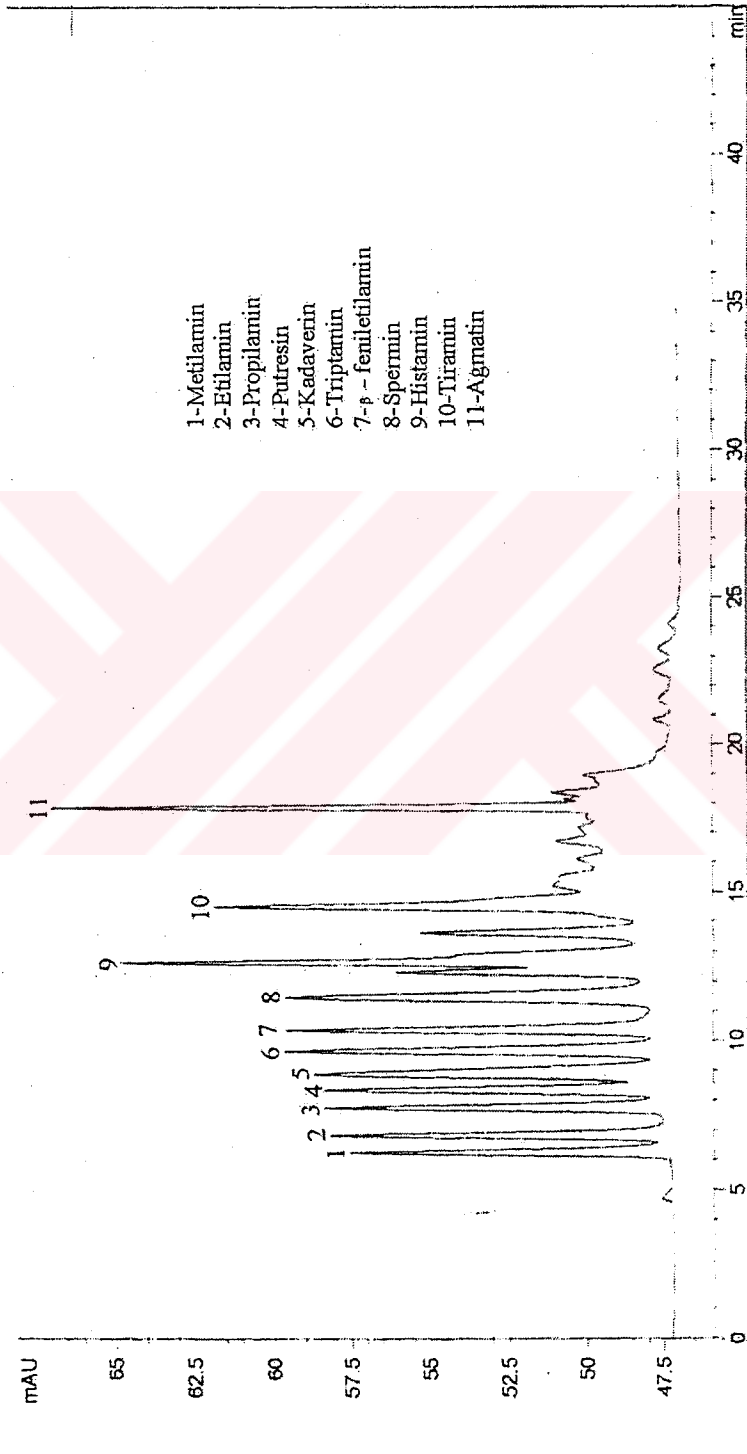
Şekil 4.7. pH 7,00'de 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



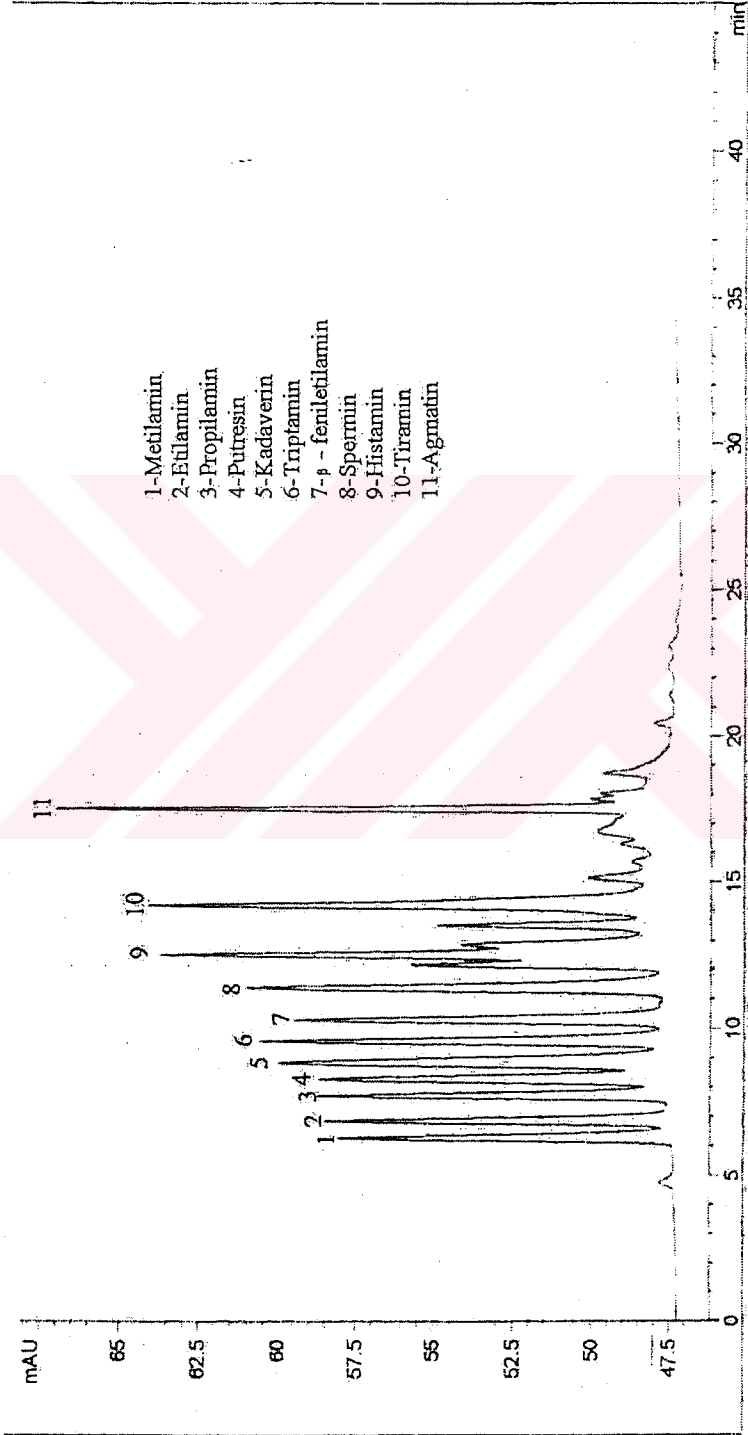
Şekil 4.8. pH 7,00'de 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



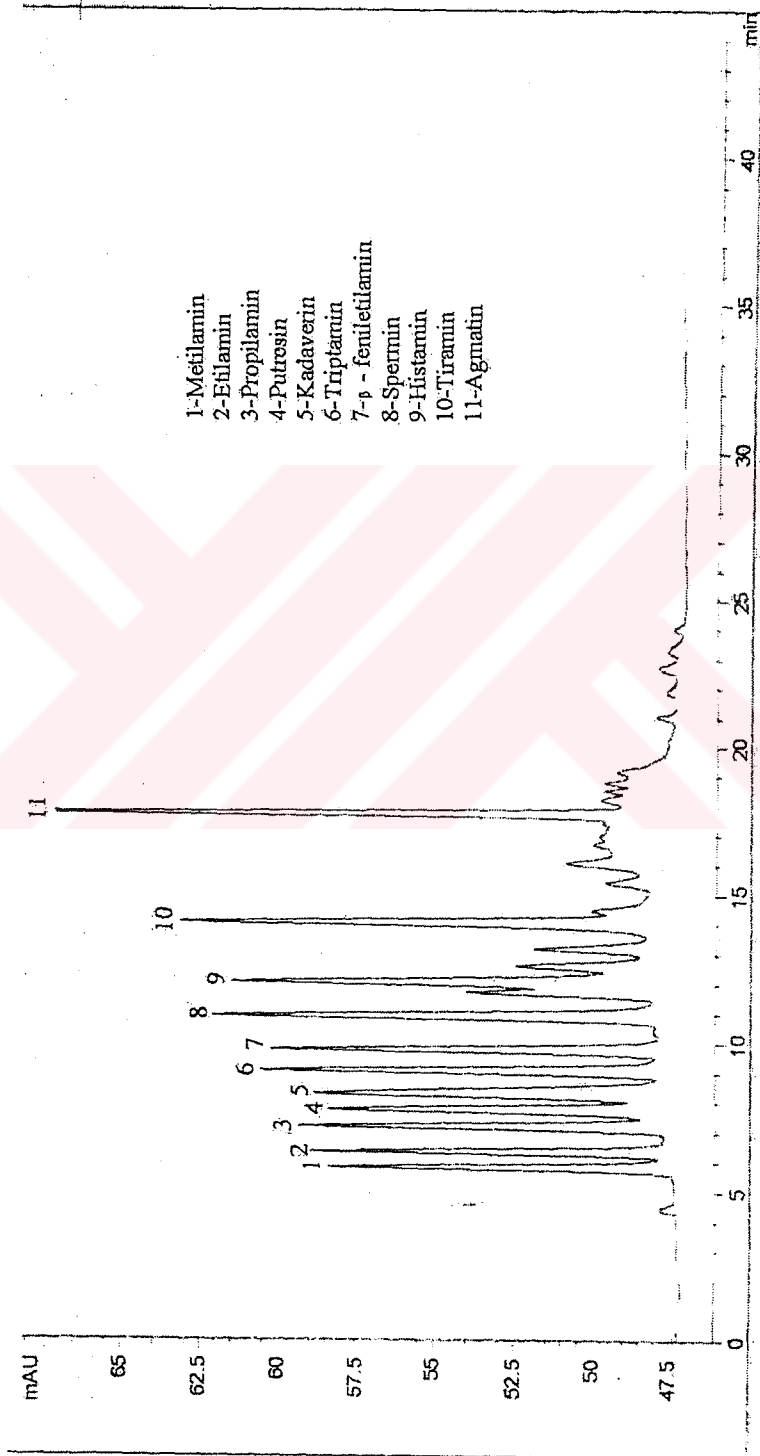
Şekil 4.9. pH 7,00'de 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Sekil 4.10. pH 8.05'te 21°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.11. pH 8,05'te 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.12. pH 8,05'te 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram

Diğer pH'larda gerçekleştirilen sıcaklık denemelerinde olduğu gibi agmatin bu pH' da da her 3 sıcaklık değerinde aynı oranda bozunarak kadaverin benzeri bir bileşik vermektedir. Metilamin, etilamin, propilamin, triptamin, β -feniletilamin, spermin ve putresin piklerinin büyüklükleri her 3 sıcaklıkta da değişmemektedir. 21 °C'de histaminin sağındaki çatal pik histamine yaklaşıırken, 25 ve 30 °C kolon sıcaklıklarında histaminin hem sağında hem solunda çatallanmalar görülmekte, sıcaklık düştükçe sağ kısımdaki çatal pik esas pike yaklaşmaktadır. Her 3 sıcaklık değerinde ikişer tekrar olarak yapılan analizlerin sonucu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olasılıkla histamin bileşiğine ait piklerin büyüklükleri arasında fark bulunmaktadır. 25 °C kolon sıcaklığında histamin pikinin büyüklüğü en fazla iken, 30 °C'de en azdır.

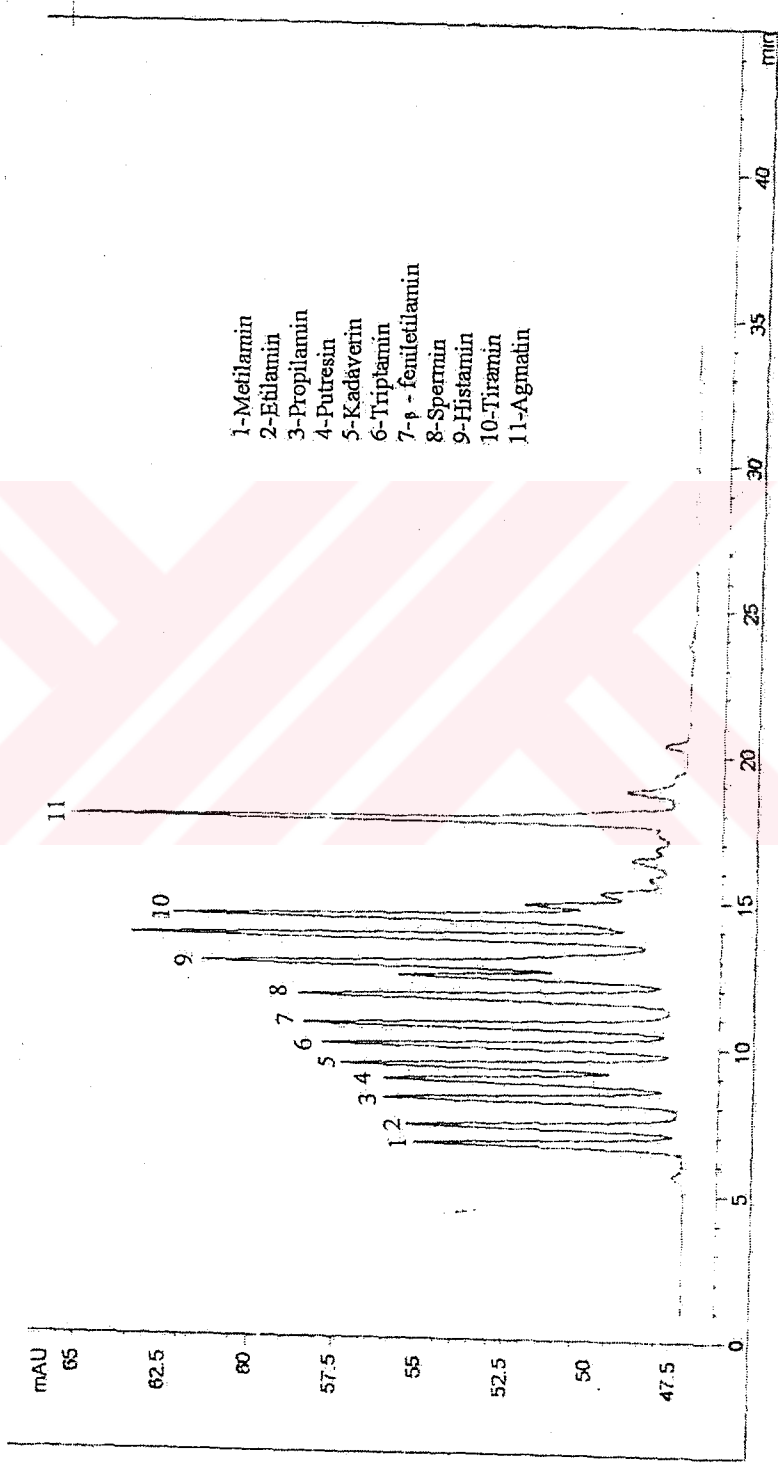
4.3. Türevlendirme Koşulları Denemeleri

4.3.1. Türevlendirme Sıcaklığı Denemeleri

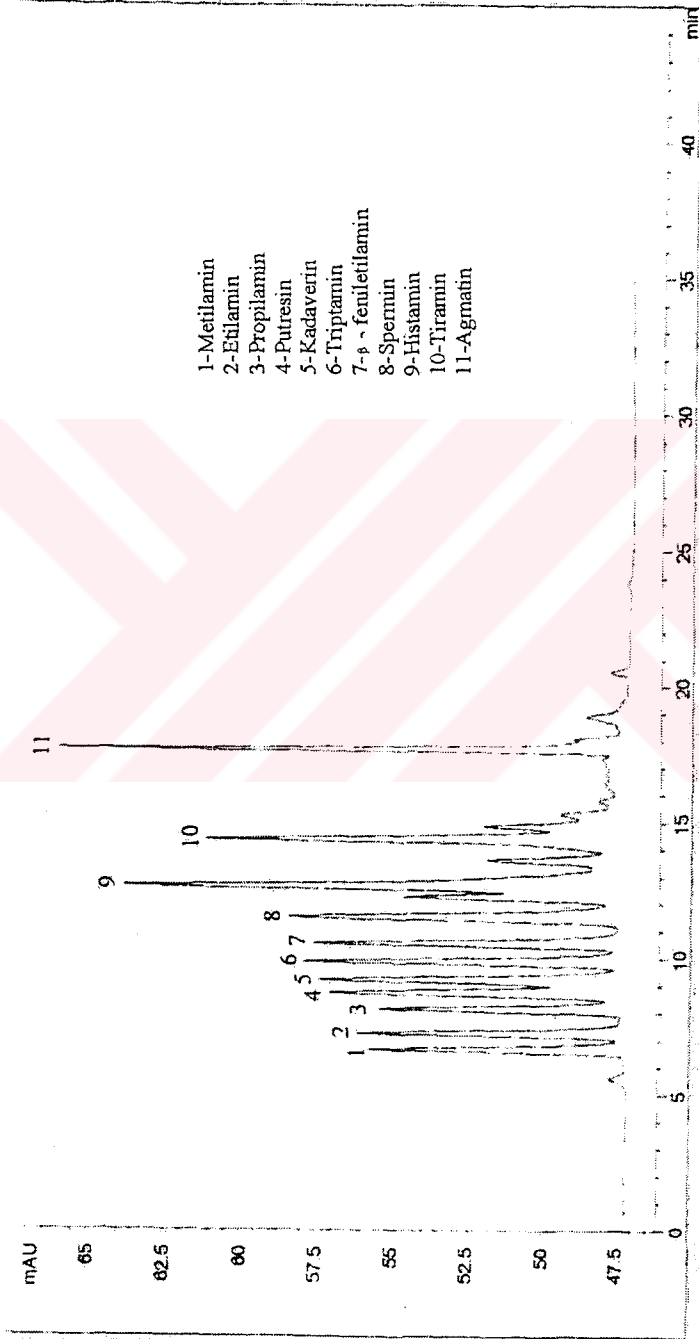
Biyojen aminlerin türevlendirilmesinde en önemli faktörlerden biri de türevlendirme sıcaklığıdır. Türevlendirme sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla metilamin, etilamin, propilamin, triptamin, β -feniletilamin, spermin, putresin, kadaverin, histamin, agmatin ve tiraminden oluşan standart karışım hazırlanarak, 3 farklı deneme gerçekleştirilmiştir.

Birinci denemede hazırlanan standart karışım 21 °C'de türevlendirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bu deneme sonucunda elde edilen kromatogram şekil 4.13'te görülmektedir.

İkinci denemede aynı standart karışım bu kez 25 °C'de türevlendirilmiş, HPLC cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Bu deneme sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.14'de görülmektedir.



Şekil 4.13. 20°C'de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

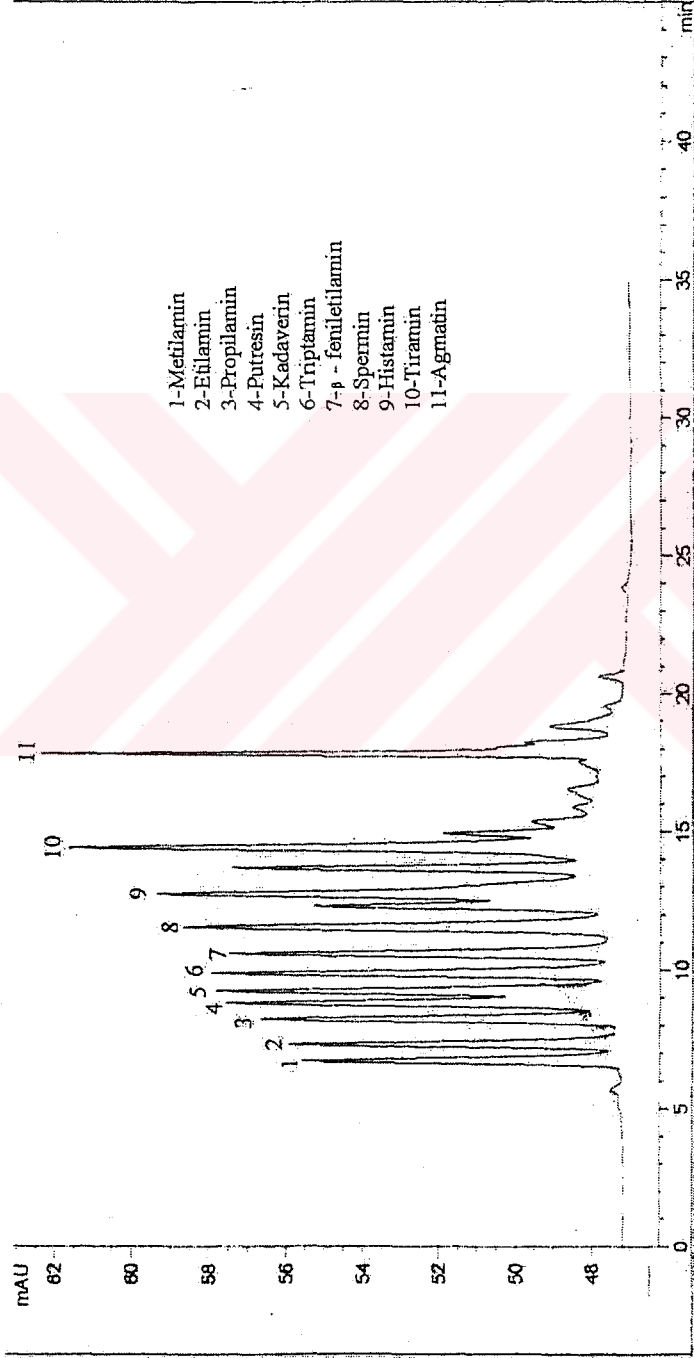


Şekil 4.14. 25°C'de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucunda edilen kromatogram

Üçüncü denemede, standart karışımın türevlendirilmesi 30 °C'de gerçekleştirilmiş olup, analiz sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.15'de görülmektedir.

İkişer paralel olarak gerçekleştirilen deneme sonuçlarına göre standart biyojen amin karışımındaki biyojen aminlerin herbiri için istatistiksel olarak pik alanlarına göre değerlendirme yapılmıştır. Her 3 türevlendirme sıcaklığında da $p < 0,05$ olasılıkla metilamin, etilamin, propilamin, kadaverin, triptamin, β -feniletilamin ve tiramin arasında fark yoktur. $p < 0,05$ olasılıkla 21 ve 30 °C'de türevlendirilen putresin bileşiklerine ait piklerin büyüklükleri arasında fark vardır ve 30 °C'de türevlendirildiğinde putresin alanı daha fazladır. Spermin için yapılan değerlendirmeye göre $p < 0,05$ olasılıkla 21 ve 25 °C'de türevlendirilen sperminler arasında fark bulunmaktadır ve 25 °C'de türevlendirildiğinde spermin pik alanı daha fazladır. Histamin için gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre $p < 0,05$ olasılıkla 21 ve 25 °C'de türevlendirilen ve 25 ve 30 °C'de türevlendirilen histamin bileşiklerine ait pikler arasında fark vardır. En büyük histamin piki 25 °C türevlendirme koşullarında bulunurken, 30 °C'de türevlendirmede histamin piki en küçüktür. Agmatin için gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucuna göre $p < 0,05$ olasılıkla 21 ve 25 °C'de türevlendirilen agmatinler arasında fark bulunmaktadır. 21 °C'de türevlendirilen agmatin bileşiğine ait olan pik daha küçüktür.

3 deneme sonucunda elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında 30 °C'de türevlendirmenin özellikle biyojen aminler içinde en önemlisi olan histamin için oldukça olumsuz olduğu görülmektedir.



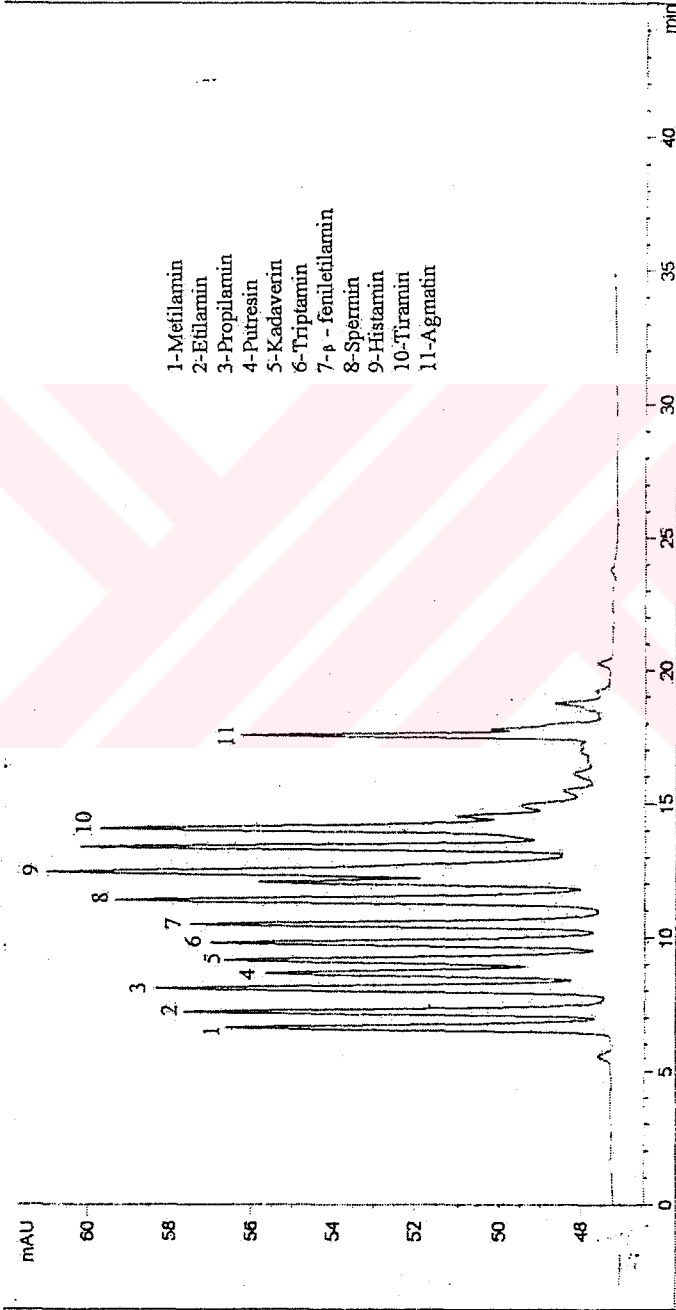
Şekil 4.15. 30°C'de türevlendirilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

4.3.2. Türevlerin Bekletilmesi Denemeleri

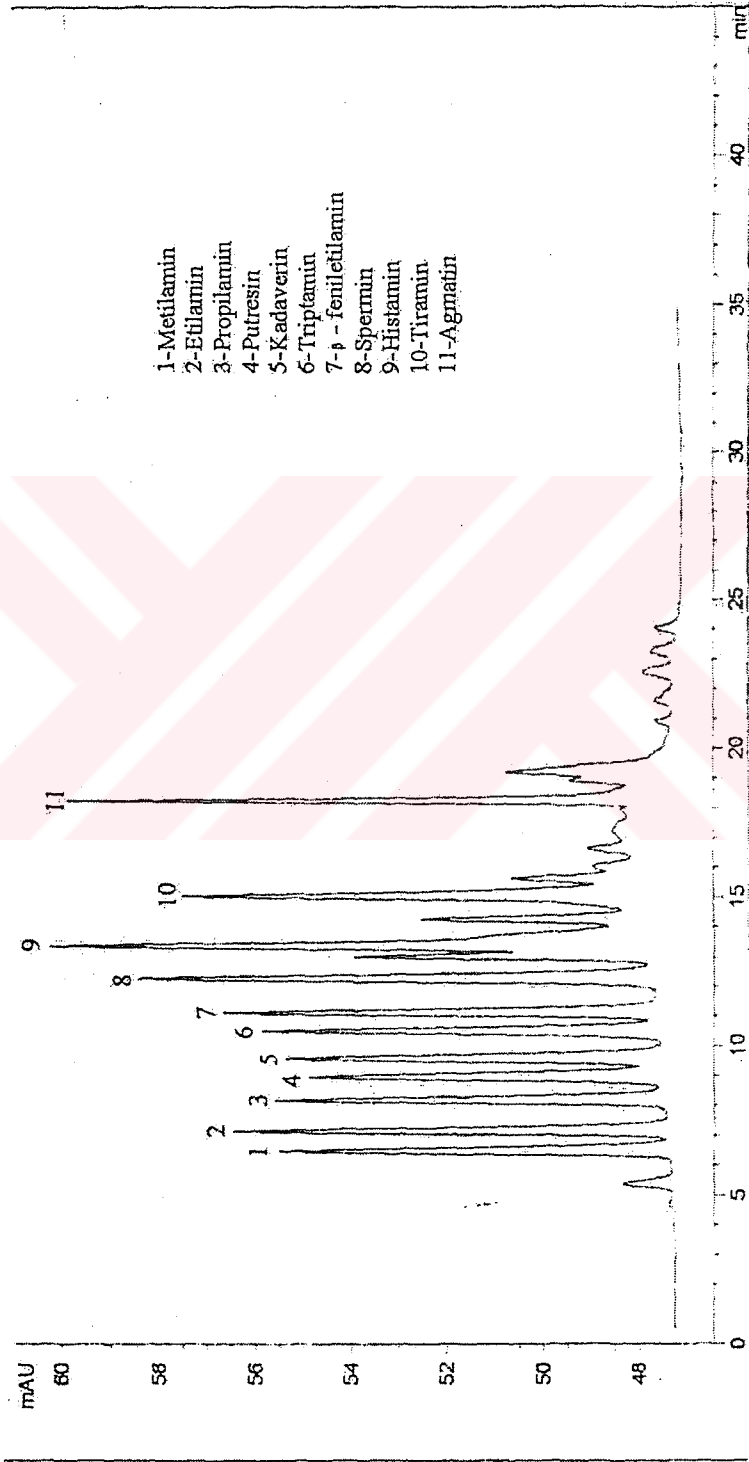
Biyojen aminlerin benzoil türevlerinin bekletilmesinin biyojen aminlerin bozunması ve ayrılması üzerine etkisini belirlemek amacıyla bir deneme gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla metilamin, etilamin, propilamin, triptamin, β -feniletilamin, spermin, putresin, kadaverin, histamin, agmatin ve tiraminden oluşan standart karışımlar hazırlanarak türevlendirilmiştir. Bu karışımların bir kısmı türevlendirildikten hemen sonra metanolde çözülerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bir kısmı ise buzdolabında 1 ay süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş ve bu süre sonunda metanolde çözülerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bu denemeler sonucunda elde edilen kromatogramlar şekil 4.16. ve şekil 4.17'de görülmektedir. 1 ay süreyle bekletilen biyojen amin türevlerine ait kromatogramda histaminin sağ kısmında bir omuz verdiği görülmektedir. Herbir biyojen amin için pik alanlarına göre gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirme sonucunda bekletilen ve bekletilmeden enjekte edilen türevlerde $p < 0,05$ olasılıkla etilamin, spermin, histamin, tiramin, agmatin, kadaverin ve β -feniletilamin arasında fark bulunmamıştır. Metilamin, propilamin, putresin ve triptamin arasında fark bulunmuştur. 1 ay süreyle bekletilen metilamin, propilamin, putresin ve triptamin bileşiklerine ait olan pikler, bekletilmeden enjekte edilenlere göre küçülmüştür.

4.4. Agmatin Denemeleri

Standart karışımlarda biyojen aminlerin ayrımı ve bozunması üzerine etki edebilecek faktörlerin etkisi irdelenmiş ve histamin ve agmatin dışındaki biyojen aminlerin oldukça kararlı olduğu ve koşulların değişmesinden pek fazla etkilenmediği görülmüştür. Bu nedenle histamin ve agmatin için ayrıca bazı denemeler gerçekleştirilmiştir. Analizler $10\ \mu$ 'luk kolonda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16. Yeni türevlendirilmiş standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 4.17. 1 ay bekletilen standart karışım enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

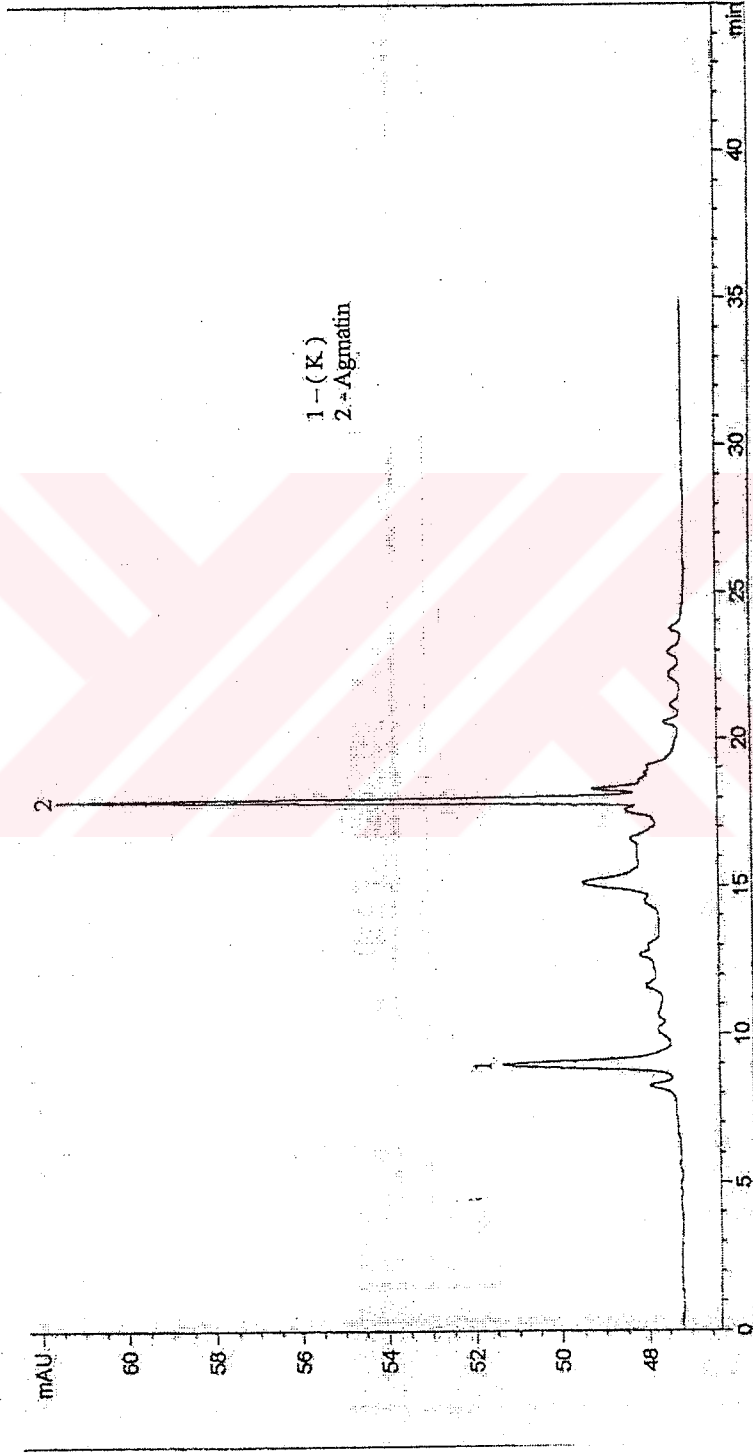
Birinci denemede, hareketli faz pH'sı 6,05 değerine ayarlanmış, 2 farklı kolon sıcaklığında (20 ve 30 °C) standart agmatin 25 °C'de türevlendirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bu denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar şekil 4.18. ve şekil 4.19.'da verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde agmatin her 2 sıcaklık değerinde de kısmen bozunmaktadır. Ancak 20 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında agmatin bozunarak kadaverin benzeri bir bileşik, 30 °C kolon sıcaklığında ise putresin vermektedir.

İkinci denemede hareketli faz pH'sı 8,05 değerine getirilmiş, 2 farklı kolon sıcaklığında (20 ve 30 °C) standart agmatin 25 °C'de türevlendirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Şekil 4.20. ve şekil 4.21.'de bu denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar görülmektedir. Bu kromatogramlara göre, her 2 kolon sıcaklığında da agmatin bir miktar bozunarak kadaverin benzeri bir bileşik vermektedir.

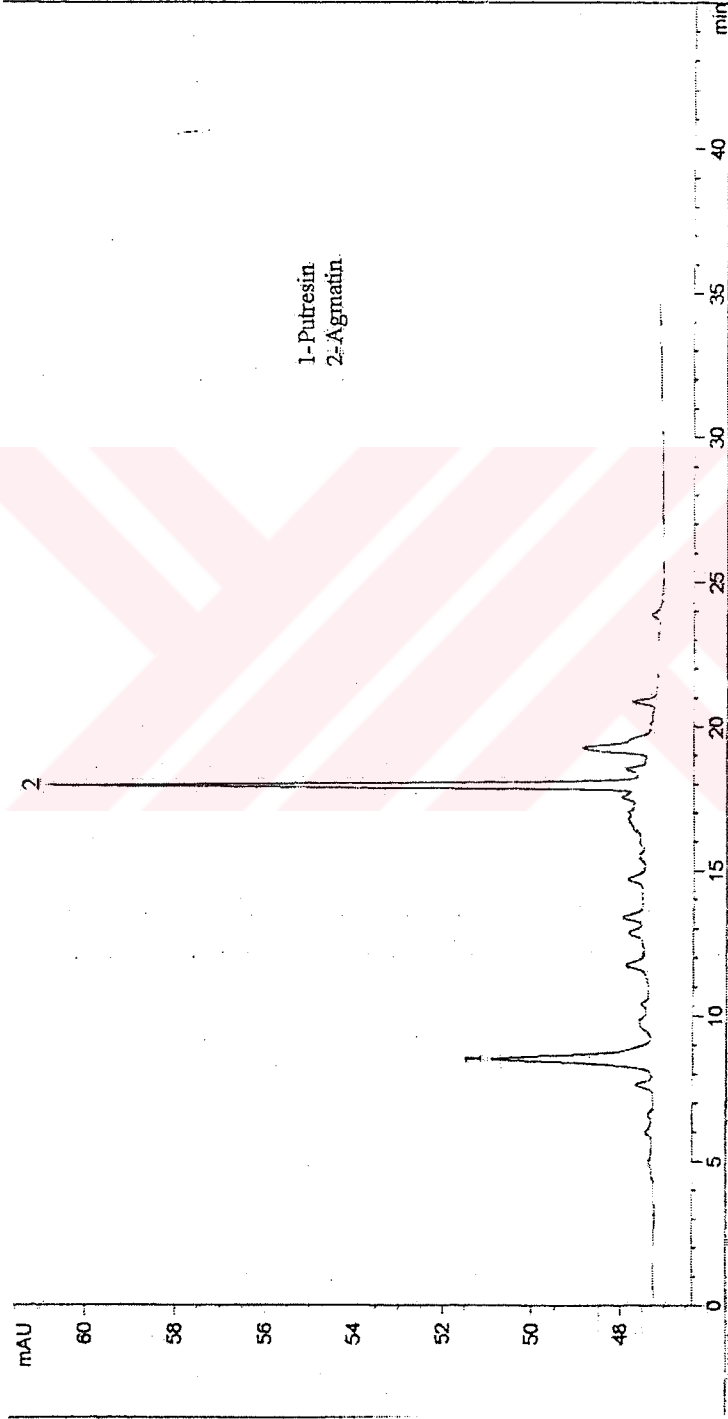
Hareketli faz pH'sı 6,05 ve pH 8,05 değerlerinin her ikisinde de farklı kolon sıcaklıklarında gerçekleştirilen denemelerde pik alanları incelendiğinde, agmatin bileşiğine ait olan pikin büyüklüğünün değişmediği, aynı oranda putresin veya kadaverin benzeri bileşik vererek bozunduğu görülmektedir.

Üçüncü denemede, hareketli faz pH'sı 6,05'e ayarlanmış, 25 °C'de türevlendirilen agmatin standartı 25 °C kolon sıcaklığında HPLC cihazında analiz edilmiştir. Bu deneme sonucunda elde edilen kromatogram şekil 4.22.'de verilmiştir. Bu koşullarda da agmatin kısmen bozunarak putresin vermektedir.

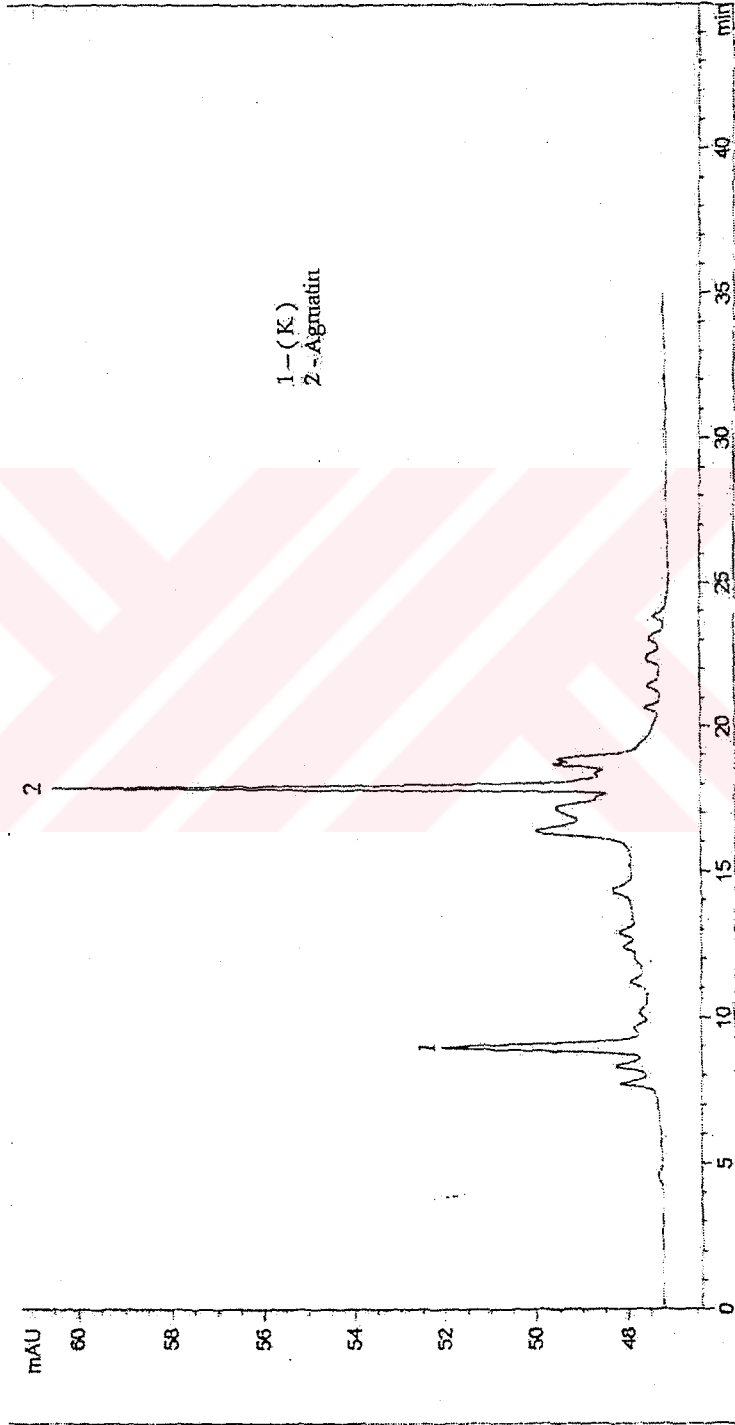
Dördüncü denemede, hareketli faz pH'sı 7,00'ye ayarlanmış, 25 °C'de türevlendirilen agmatin, cihaza enjekte edilmiştir. Analiz 27 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon sonucunda alınan kromatogram şekil 4.23'de verilmiştir. Kromatogram incelendiğinde, agmatinin kadaverin benzeri bileşik vererek bozunduğu görülmektedir.



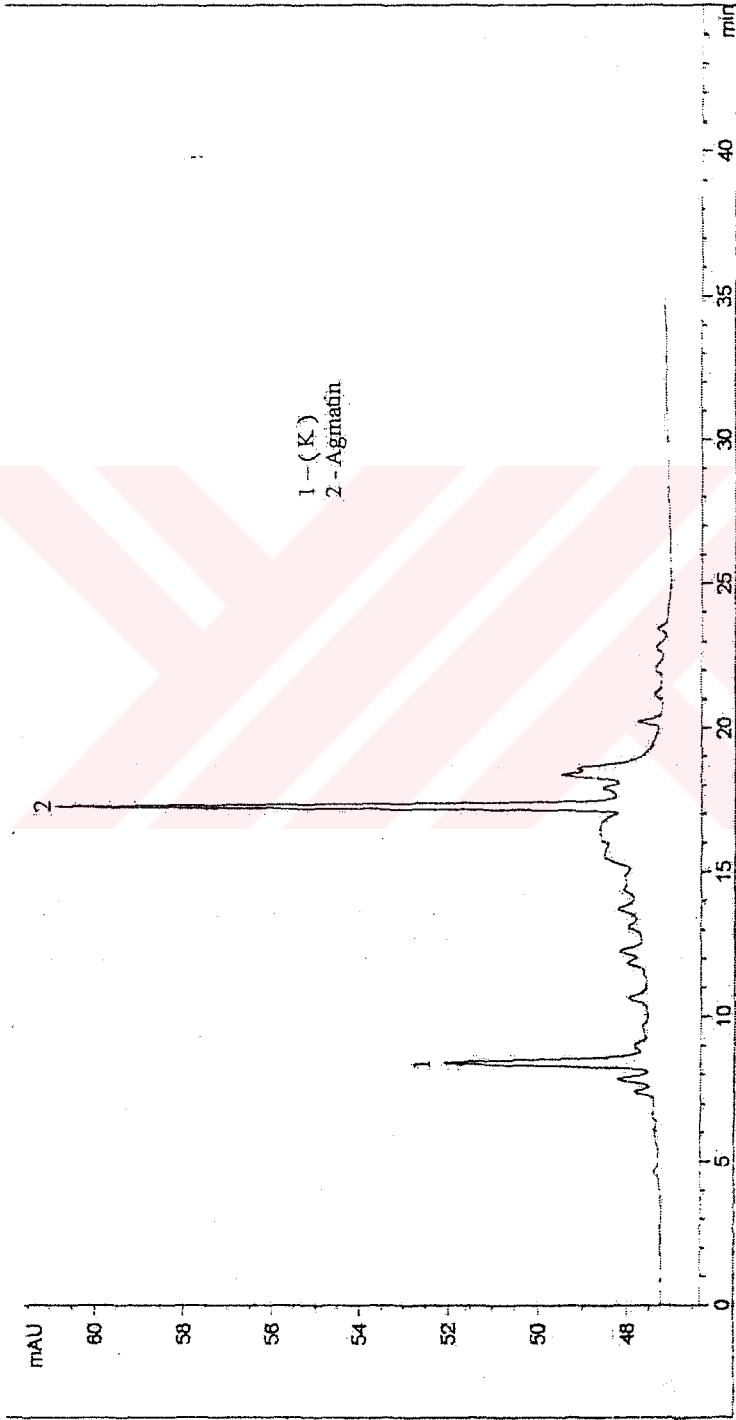
Şekil 4.18. pH 6,05'te agmatin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



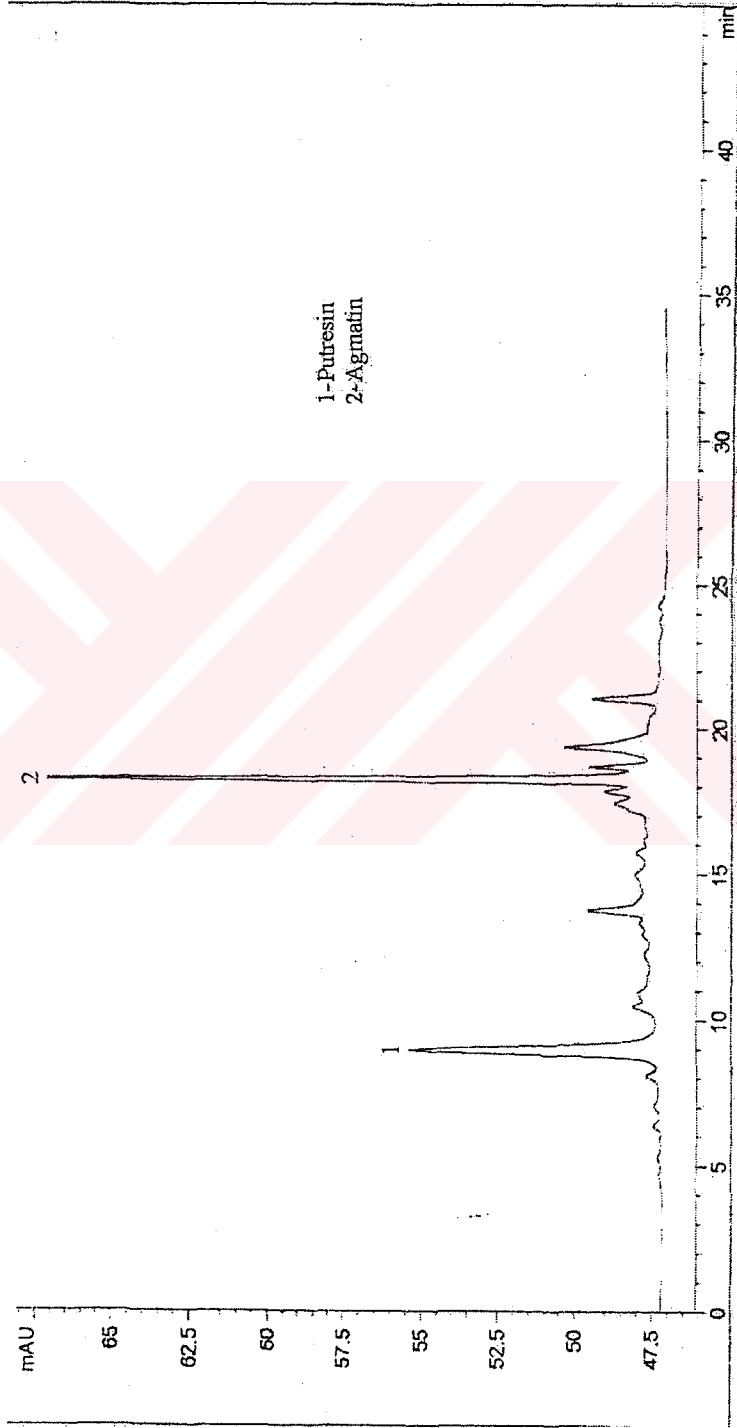
Şekil 4.19. pH 6,05'te agmatin enjeksiyonu sonucu 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



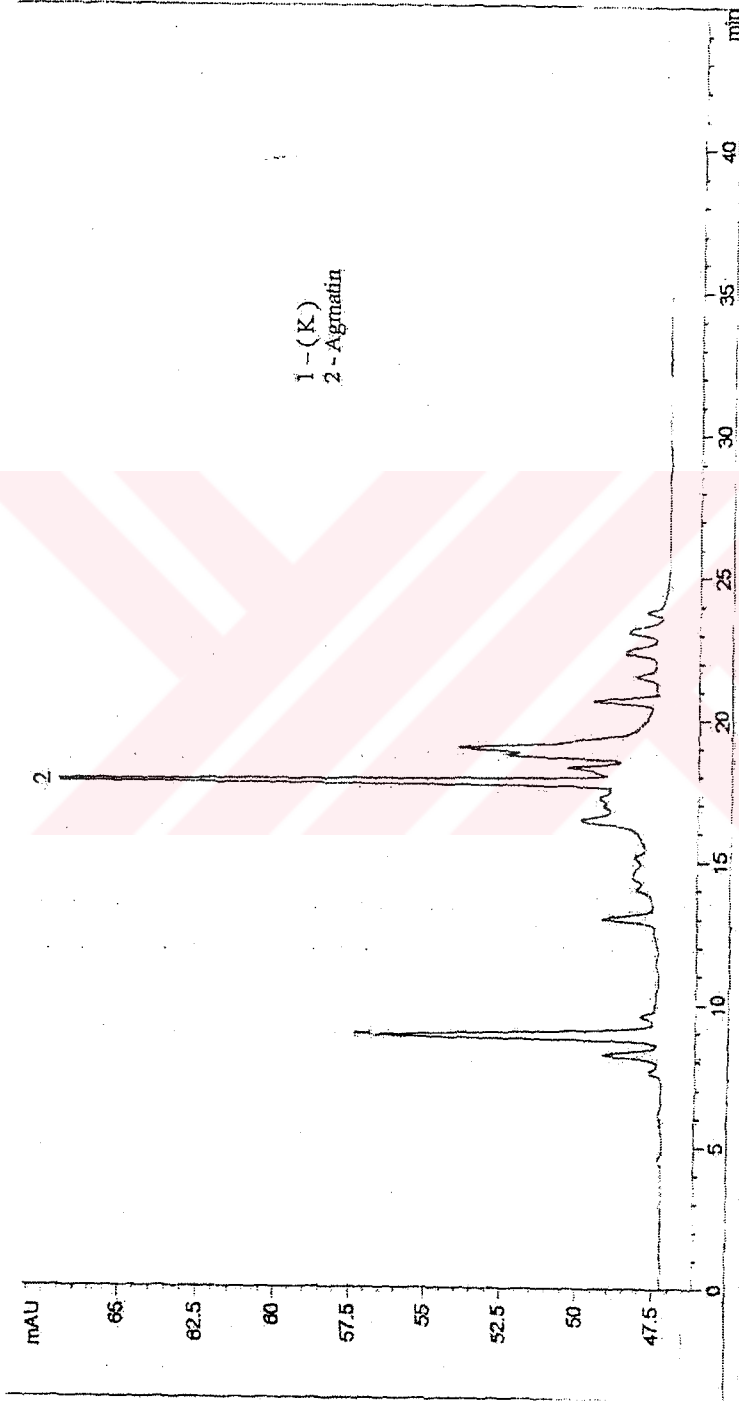
Şekil 4.20. pH 8,05'te agmatin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.21. pH 8,05'te agmatin enjeksiyonu sonucu 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.22. pH 6,05'te agmatin enjeksiyonu sonucu 25°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram

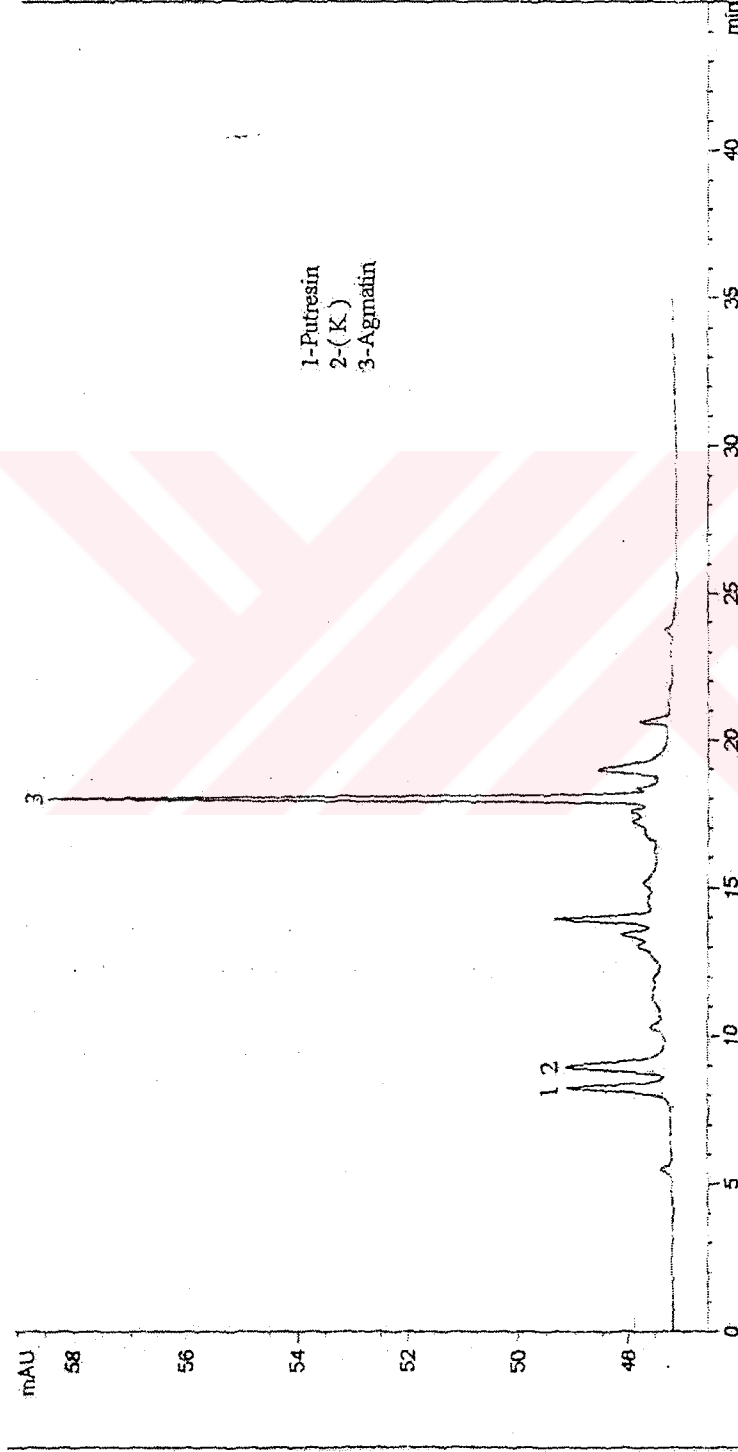


Şekil 4.23. pH 7,00'de agmatinin enjeksiyonu sonucu 27°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram

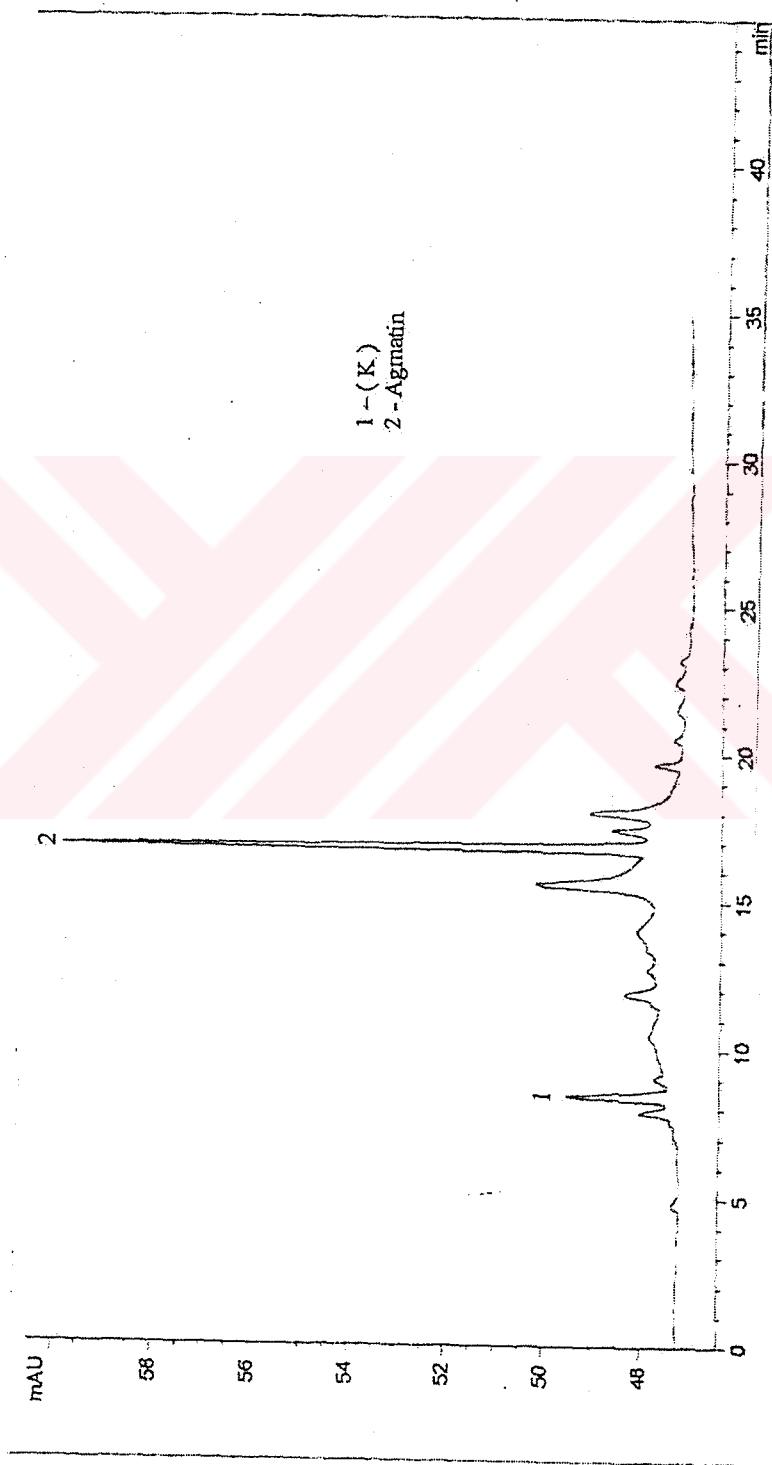
Beşinci deneme türevlendirme sıcaklığının agmatinin bozunması üzerine etkisini irdelemek için gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz pH'sı 6,05 değerine getirilmiş, 20 °C kolon sıcaklığında, 20 °C'de türevlendirilen agmatin cihaza enjekte edilmiştir. Bu deneme sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.24'te görülmektedir. Agmatin bozunarak hem putresin hem de kadaverin vermektedir. Aynı koşullarda 25 °C'de türevlendirilen agmatin ile karşılaştırıldığında, 20 °C'de türevlendirilen agmatin, 25 °C'de türevlendirilene göre küçülmüştür (Bkz. Şekil 4.18.).

Altıncı denemede hareketli faz pH'sı 8,05'e ayarlanmış, 20 °C'de türevlendirilen agmatin, HPLC cihazında 30 °C kolon sıcaklığında analiz edilmiştir. Bu deneme sonucunda elde edilen kromatogram şekil 4.25.'de görülmektedir. Bu koşullarda agmatin bozunarak yine kadaverin benzeri bileşik vermektedir. 25 °C'de türevlendirmeye göre agmatin piki küçülmüştür.

Hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı ve türevlendirme sıcaklığı gibi değişkenlerin agmatinin bozunması üzerine etkisi irdelenmiş ve her koşulda agmatinin putresin ve/veya kadaverin benzeri bir bileşik vererek kısmen bozunduğu görülmüştür. Çalışılan hareketli faz pH'sına ve kolon sıcaklığına bağlı olarak bozunma ürünü değişmektedir. pH 6,05 ve 20 °C kolon sıcaklığında, agmatin standartı ile çalışıldığında türevlendirme sırasında iyi bir karıştırma gerçekleştirilmediğinden, yüksek benzoil klorür konsantrasyonunda agmatinin bozunarak putresin ve kadaverin verdiği görülürken, standart karışımla çalışıldığında ortamdaki benzoil klorür konsantrasyonu azaldığından böyle bir bozunma görülmemektedir. Ayrıca türevlendirme sıcaklığı da agmatin üzerinde etkili olup, 20 °C'de türevlendirme agmatini küçültmektedir.



Şekil 4.24. pH 6,05'te 20°C'de türevlendirilen agmatinin enjeksiyonu sonucu 20°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



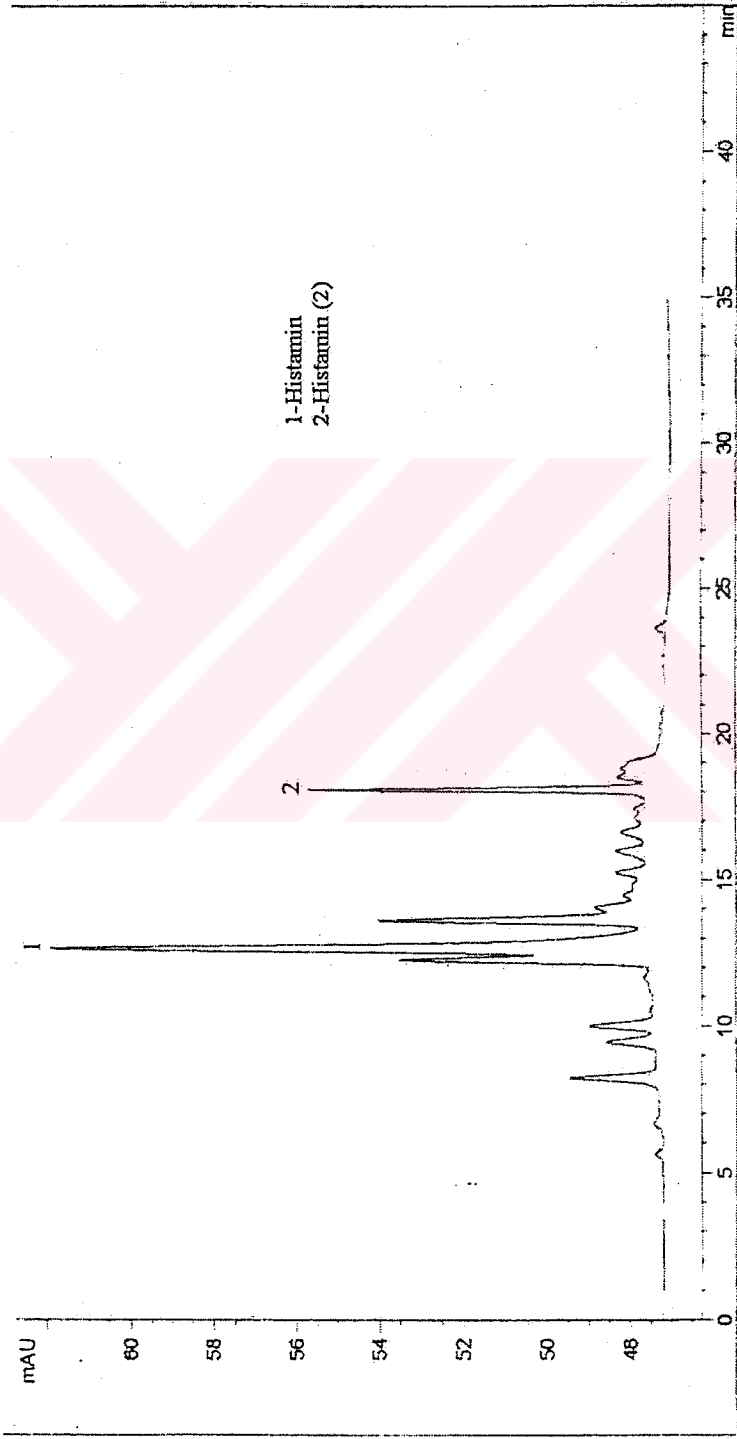
Şekil 4.25. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen agmatinin enjeksiyonu sonucu 30°C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram

4.5. Histamin Denemeleri

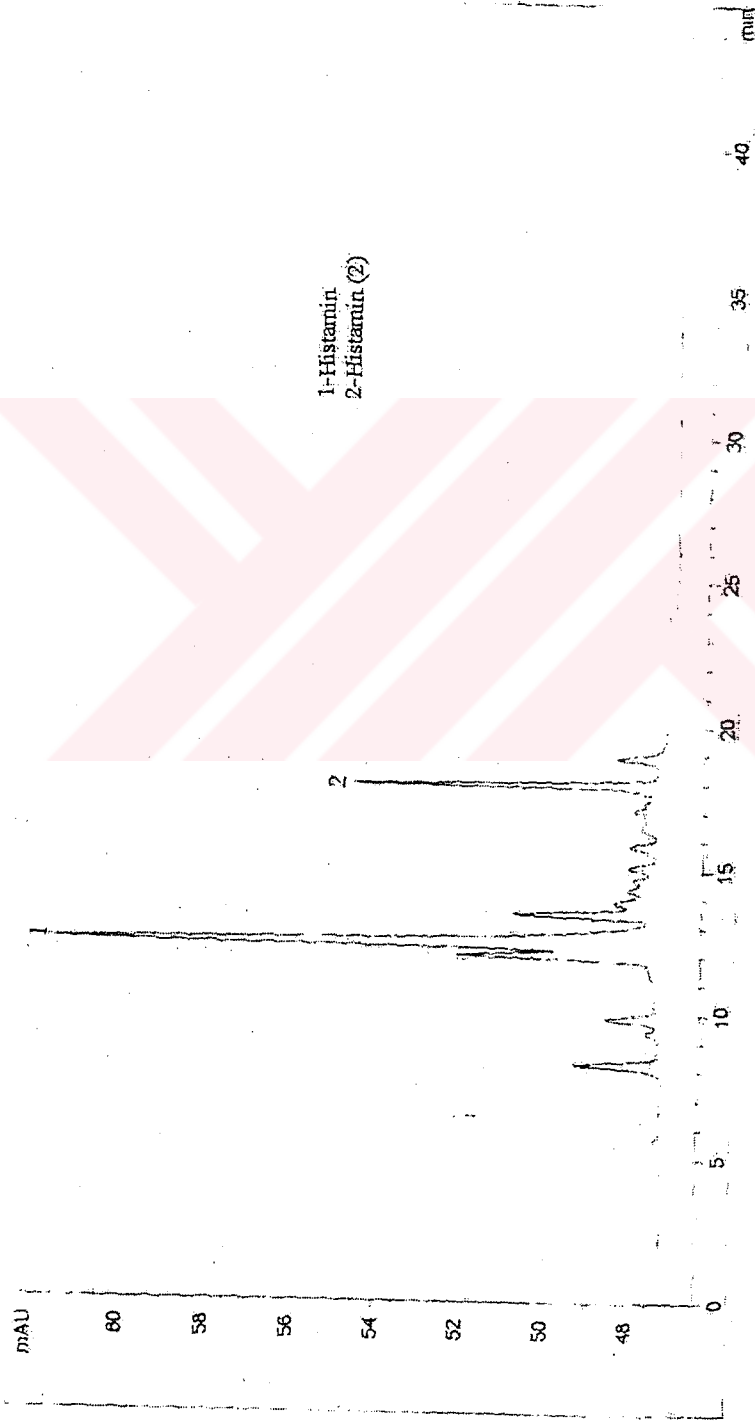
Histaminin ayrımı için en uygun koşulların belirlenmesi için kolon sıcaklığı, türevlendirme sıcaklığı ve ortamdaki histamin konsantrasyonu gibi faktörlerin etkisi irdelenmiştir. Denemeler 10 µ'luk kolonda gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla gerçekleştirilen birinci denemede, türevlendirme sıcaklığının etkisini görebilmek için 2 farklı sıcaklıkta türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Stok histamin çözeltisinden 2,25 ml alınarak 25 ml'ye seyreltilmiş ve bu standart çözeltiden 5'er ml alınarak 20 ve 25 °C'de türevlendirilmiştir. Hareketli faz pH'sı 6,05 değerine ayarlanmış, 20 °C kolon sıcaklığında HPLC cihazında analizler gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda elde edilen kromatogramlar şekil 4.26. ve şekil 4.27.'de verilmektedir. Kromatogramlar incelendiğinde pH 6,05 ve 20 °C kolon sıcaklığında çalışıldığından histamin bileşiğinin sadece solunda bir çatallanma varken, sağdaki çatallanma görülmemektedir. Ayrıca kromatogramlarda histamin bileşiğine ait olan pik dışında ikinci bir pik daha görülmektedir. Bu pik histaminin 2 kez benzoillenmiş türevi olarak düşünülmektedir. 20 veya 25 °C'de türevlendirmenin histaminin bozunması üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

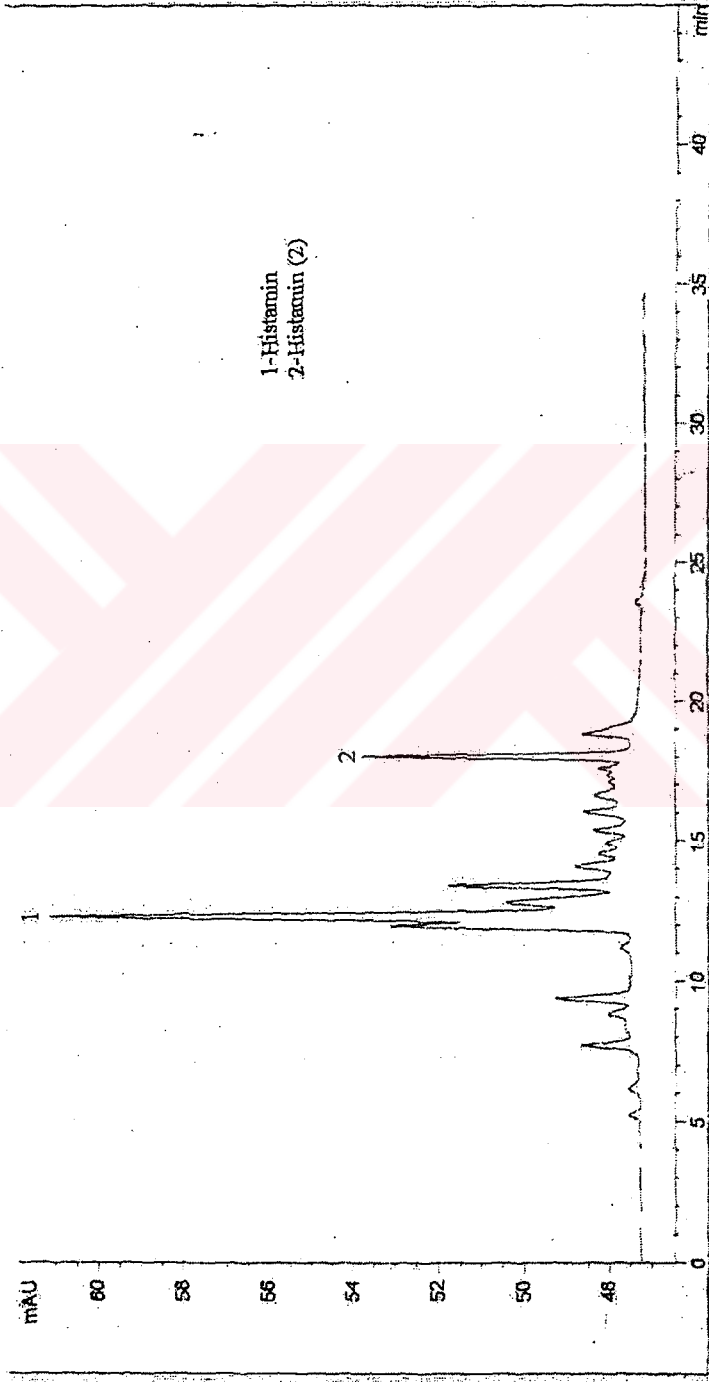
İkinci denemede, pH ve sıcaklık değişiminin etkisi irdelenmiştir. Bu amaçla stok histamin çözeltisinden 2,25 ml alınarak 25 ml'ye seyreltilmiş ve bu çözeltiden 5'er ml alınarak 25 °C'de türevlendirilmiştir. Bu türevlerden bir tanesi hareketli faz pH'sı 6,05 değerinde ve 30 °C kolon sıcaklığında HPLC cihazında analiz edilmiştir. Bu deneme sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.28.'da verilmiştir. Histamin türevlerinden diğeri hareketli faz pH'sı 8,05 değerinde ve 20 °C kolon sıcaklığında HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Şekil 4.29.'da bu deneme sonucu elde edilen kromatogram görülmektedir. Bu denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında pH 6,05'de ve 30 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında sıcaklık artışından dolayı histamin



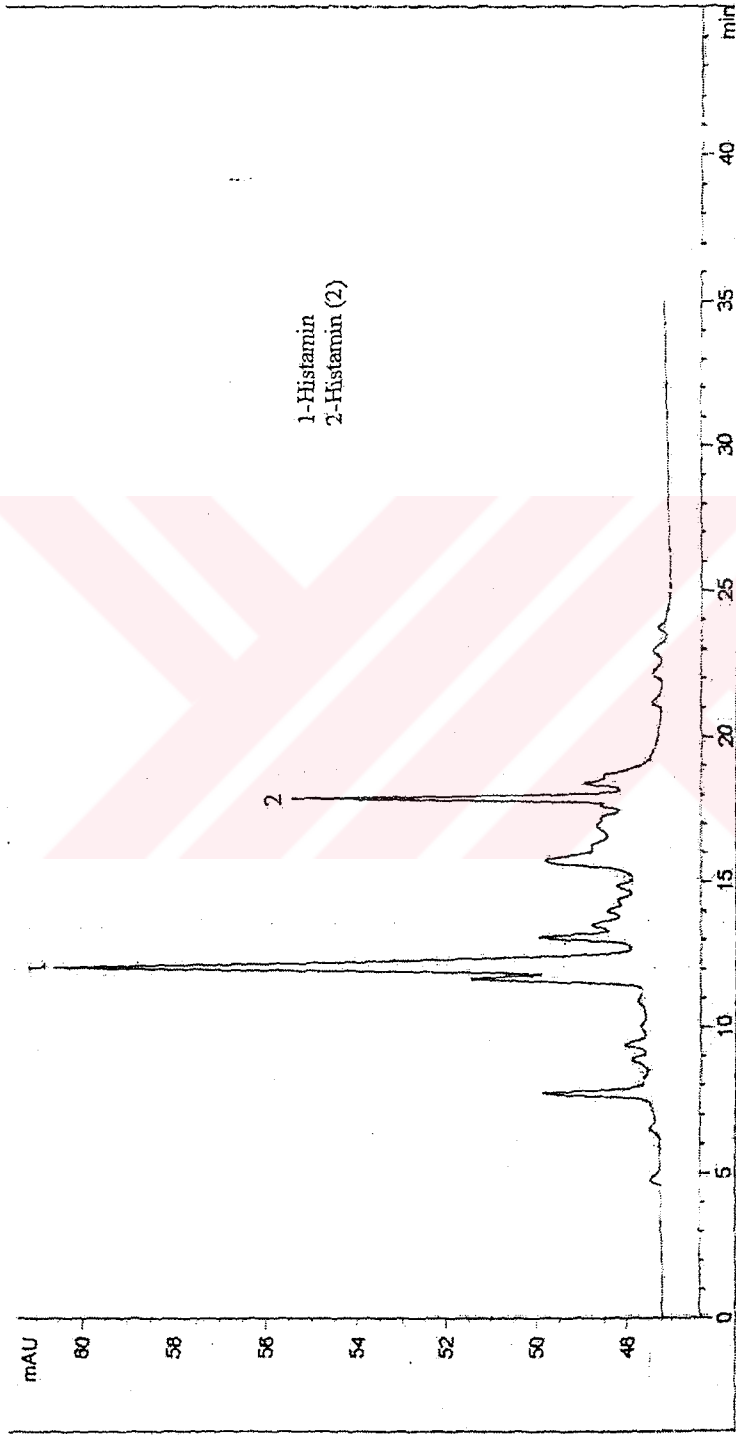
Şekil 4.26. pH 6,05'te 20 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.27. pH 6,05'te 25 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.28. pH 6,05'te 25 °C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.29. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram

bileşğine ait pikin sağ tarafında çatallanma görülmektedir. pH 8,05'de ve 20 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında ise sıcaklık düşmesinden ötürü bu çatal pik asıl histamin pikine yaklaşmaktadır.

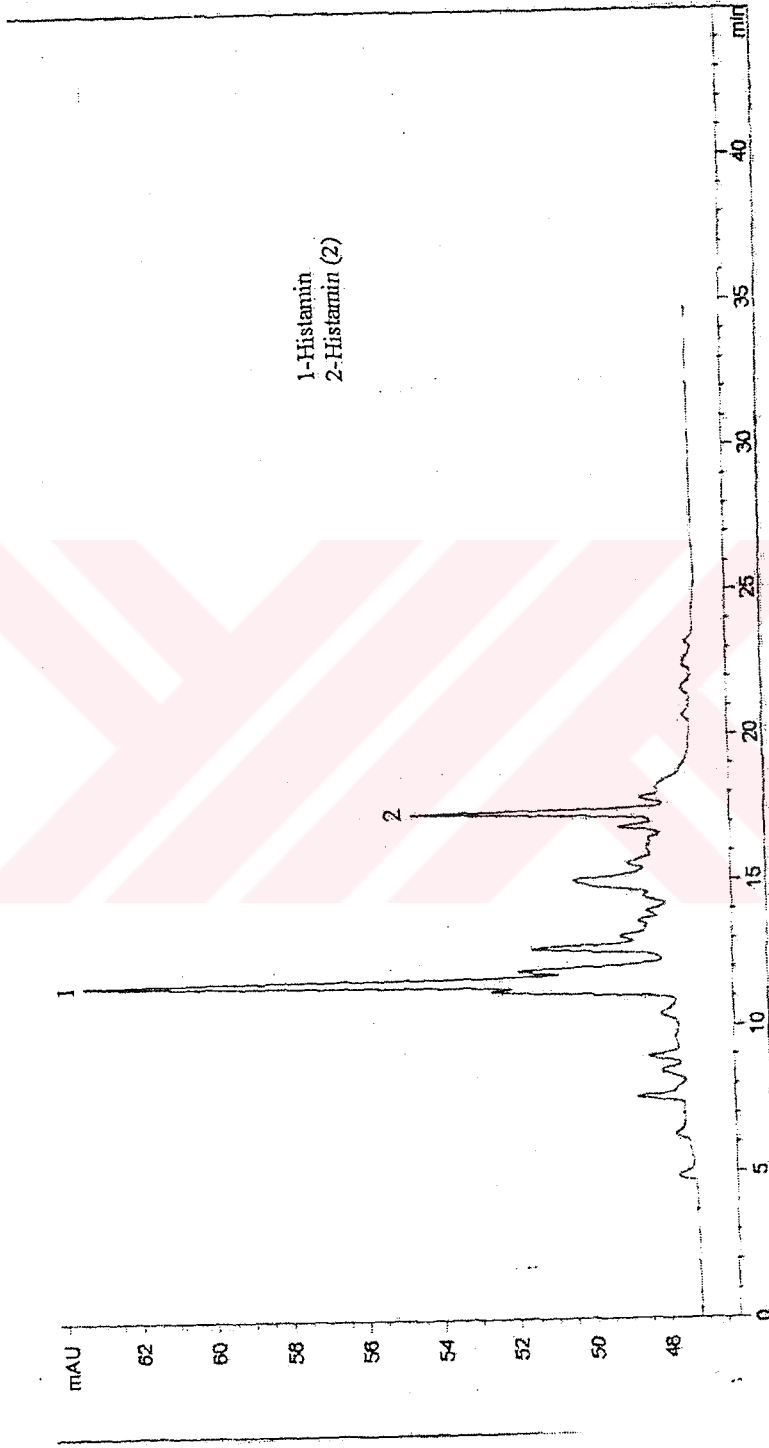
Üçüncü denemede histaminin bozunması üzerine pH 8,05'de türevlendirme sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla stok histamin çözeltisinden 2,25 ml alınarak 25 ml'ye seyreltilmiş ve bu çözeltiden 5'er ml alınarak 20 ve 25 °C'de türevlendirilmiştir. Hareketli faz pH'sı 8,05'e getirilmiş ve 20 °C'de türevlendirilen standart histamin, HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Analiz 30 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 25°C'de türevlendirilen standart histamin de, 30 °C kolon sıcaklığında hareketli faz pH'sı 8,05 değerinde analiz edilmiştir. Bu denemeler sonucu elde edilen kromatogramlar şekil 4.30. ve 4.31.'de görülmektedir. Kromatogramlar karşılaştırıldığında bu pH değerinde de türevlendirme sıcaklığının histamin üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Hareketli faz pH'sının 8,05 olması ve özellikle kolon sıcaklığının artışı, histaminin sağındaki çatallanmaya neden olmaktadır.

Dördüncü denemede kullanılmak üzere stok histamin çözeltisinden 0,5 ml alınarak 25 ml'ye seyreltilmiş böylece önceki denemelere göre daha seyreltik bir standart çözelti hazırlanmıştır. Bu standart karışımdan 5 ml alınarak 25 °C'de türevlendirilmiştir. Hareketli faz pH'sı 6,05 değerine getirilerek 20 ve 30 °C kolon sıcaklıklarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bu deneme sonucu elde edilen kromatogramlar şekil 4.32. ve şekil 4.33.'de görülmektedir. Bu kromatogramlar aynı koşullarda daha derişik konsantrasyondaki histamin çözeltisi ile çalışıldığında elde edilen kromatogramlar ile karşılaştırıldığında, daha seyreltik standart çözeltiler ile çalışıldığında histaminin 2 kez benzoillenmiş türevinin miktarının arttığı görülmektedir. Histamin ortamda daha az oranda bulunduğunda, histaminin türevlenmesi için daha az miktarda benzoil klorür gerekmektedir ve böylece ortamda reaksiyona girmemiş fazla oranda benzoil klorür bulunmaktadır. Bu durumda histamin 2. kez benzoillenmektedir. Pik alanlarına bakarak bir değerlendirme

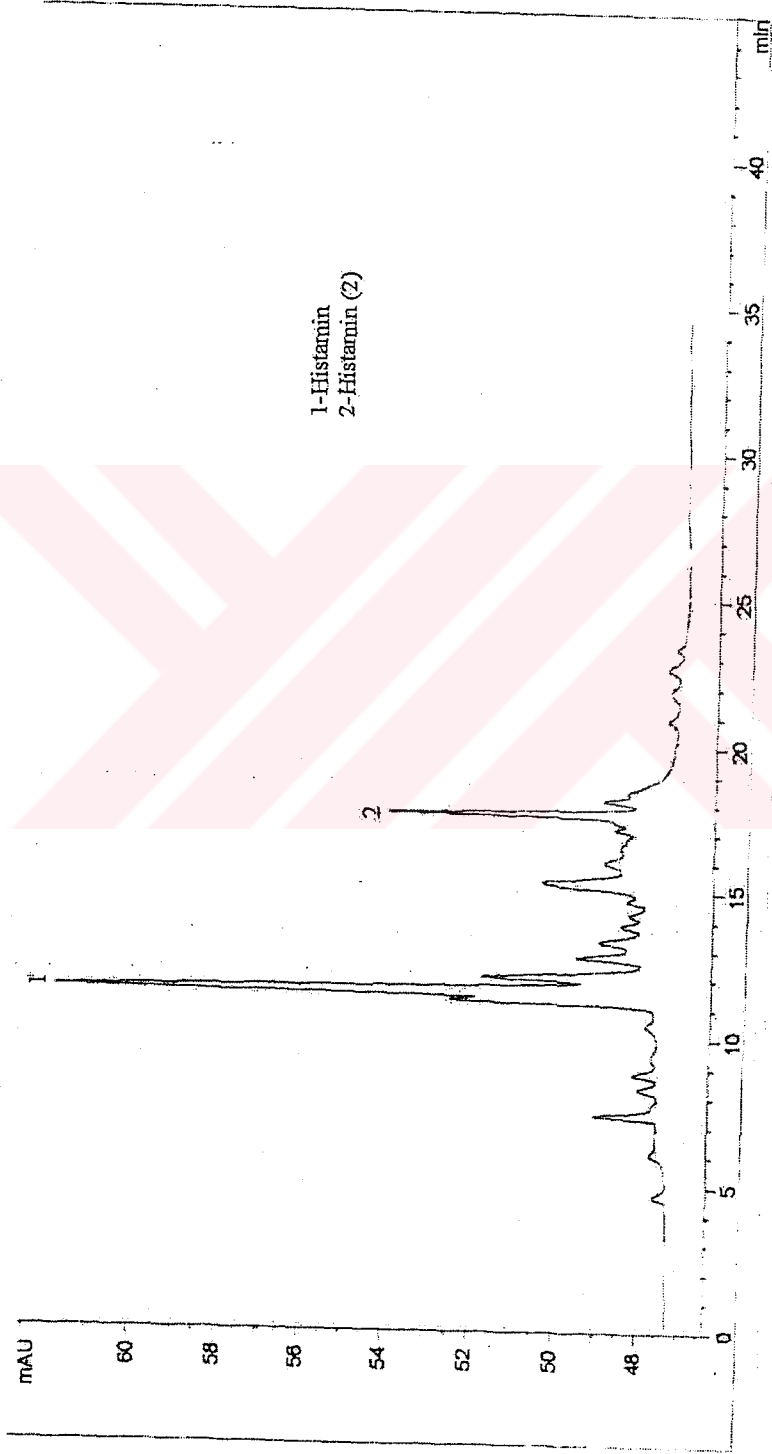
yapıldığında, seyreltik standart histamin çözeltisi ile 20 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında asıl histamin bileşiğine ait olan pik, pik alanları toplamının %51,3'ünü, 30 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında asıl histamin bileşiğine ait olan pik, pik alanları toplamının %43,4'ünü oluşturmaktadır. Aynı koşullarda derişik standart histamin çözeltisi ile 20 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında asıl histamin bileşiğine ait olan pik, toplam pik alanlarının %66,3'ünü oluşturmaktadır, 30 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında ise %53,2'sini oluşturmaktadır. 30 °C kolon sıcaklığında çalışıldığında histaminin sağında bir çatallanma olduğundan hem seyreltik hem de derişik histamin konsantrasyonlarında histaminin oranı 20 °C'ye göre daha düşüktür.

Beşinci denemede, hareketli faz pH'sı 7.00'ye ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Stok histamin çözeltisinden 1 ml alınarak 25 ml'ye seyreltilmiş ve bu standart çözeltiden 5 ml alınarak 25 °C'de türevlendirilmiş ve 28 °C kolon sıcaklığında HPLC cihazında analiz edilmiştir. Bu histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.34.'de verilmiştir. Bu kromatogram incelendiğinde, histaminin en bozuk şeklinin elde edildiği görülmektedir. Histamin bileşiğine ait olan pik küçülürken, histaminin iki kez benzoillenmiş türevine ait olan pik büyümektedir. Bu koşullarda esas histamin bileşiğine ait olan pik, toplam alanın %31,1'ini oluşturmaktadır. Aynı koşullarda derişik histamin çözeltisi ile çalışıldığında esas histamin bileşiğine ait olan pik, pik alanları toplamının %42,2'sini oluşturmaktadır.

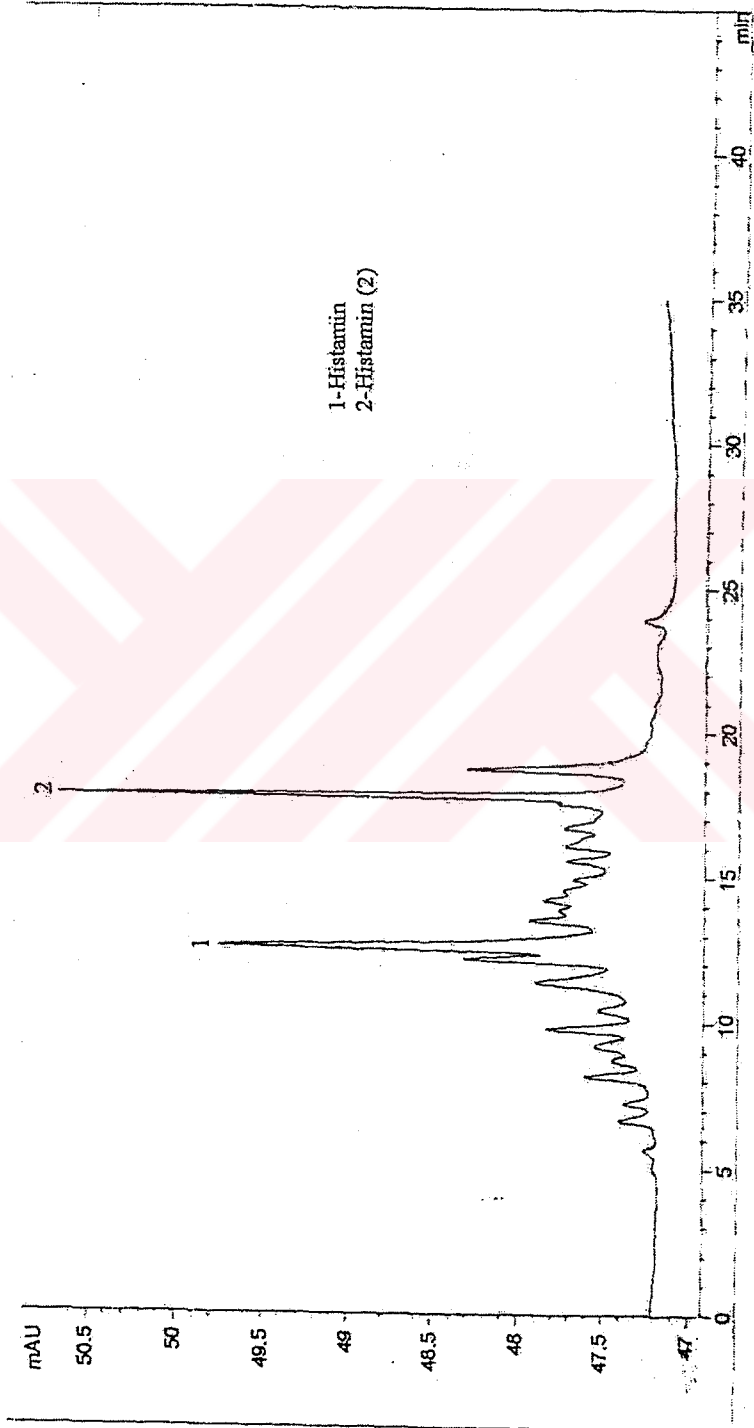
Altıncı deneme, türevlendirme sırasındaki çalkalama süresinin agmatin ve histaminin bozunması üzerine olan etkisini tespit edebilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu denemede kullanılmak üzere histamin ve agmatinden oluşan standart karışım hazırlanmıştır. Bu karışıma türevlendirme reaktifi olarak benzoil klorür ilave edildikten sonra, karışım 30 sn çalkalamak yerine 1 dk süreyle çalkalanmıştır. Şekil 4.35'de bu deneme sonucu elde edilen kromatogram görülmektedir.



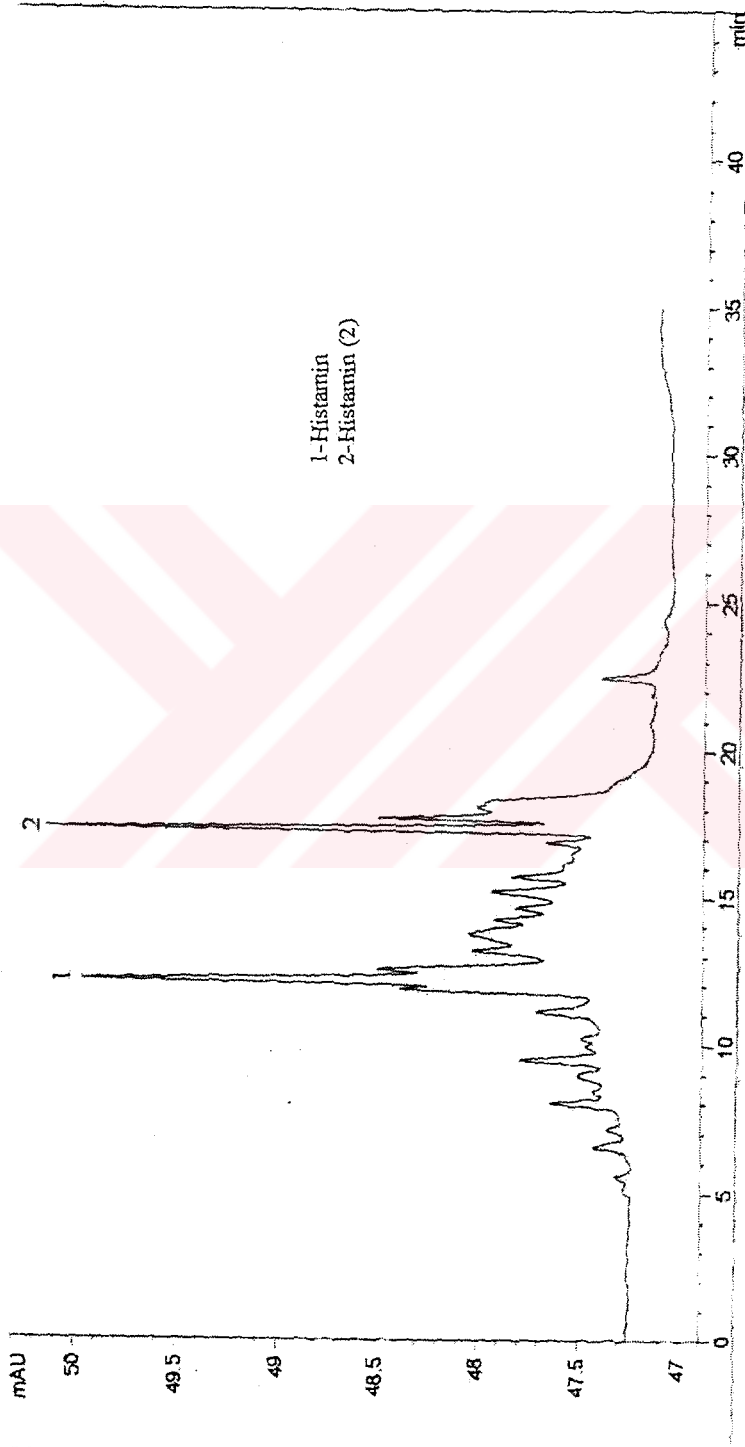
Şekil 4.30. pH 8,05'te 20°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



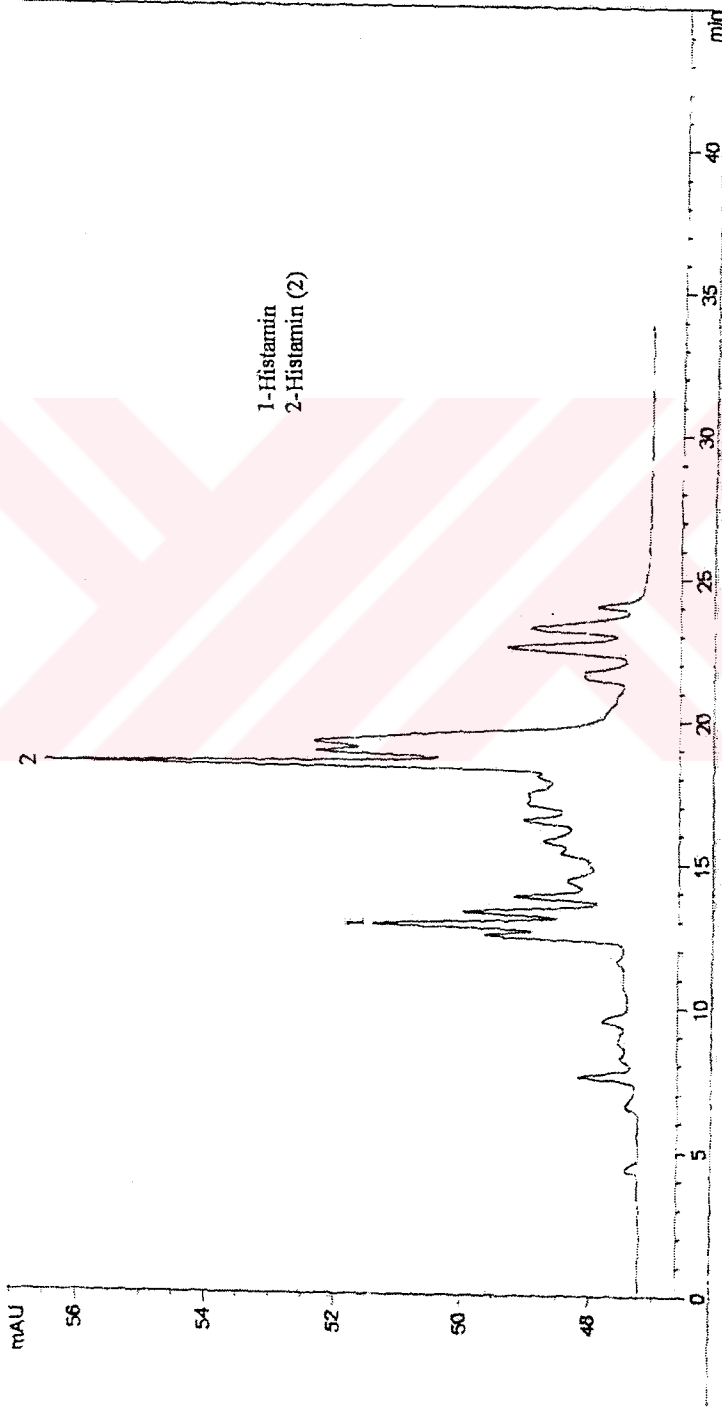
Şekil 4.31. pH 8,05'te 25°C'de türevlendirilen histamin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



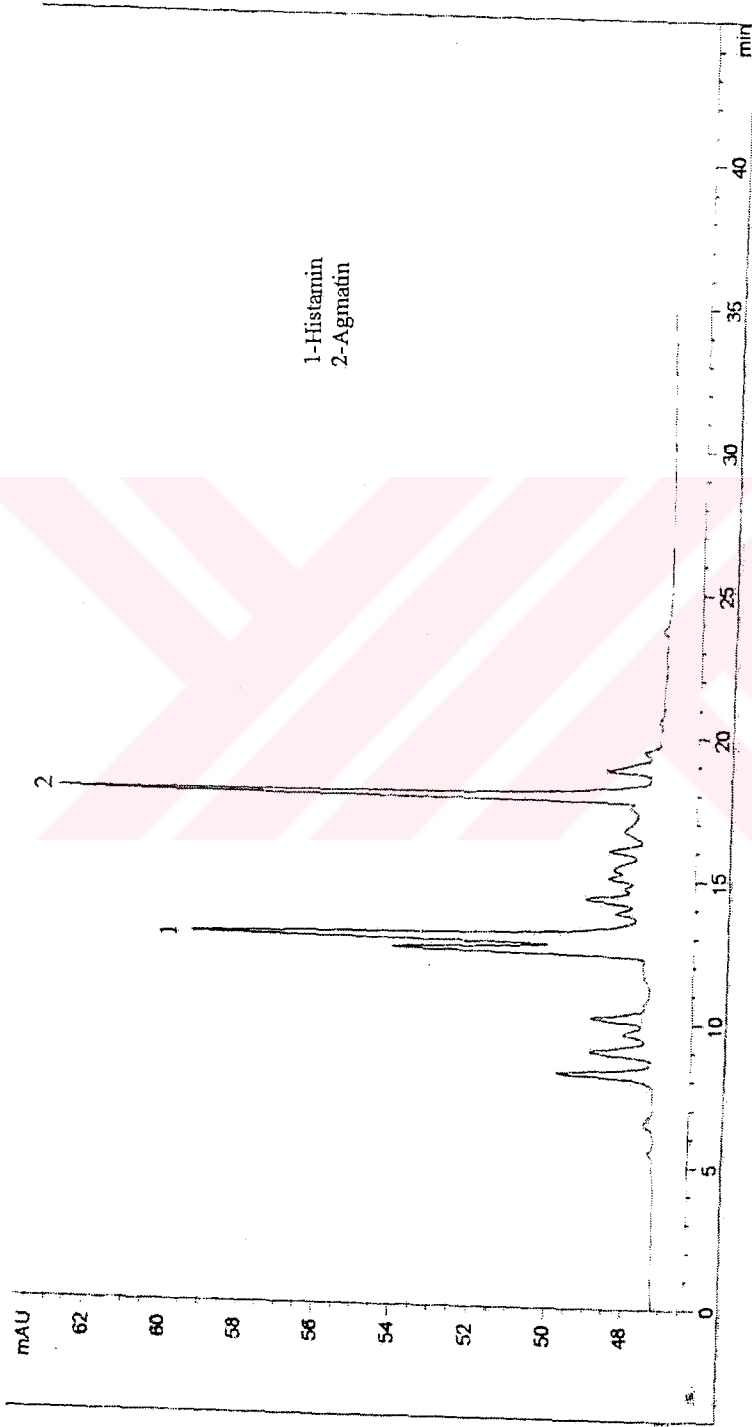
Şekil 4.32. pH 6,05'te seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.33. pH 6,05'te 25°C'de seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 30 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.34. pH 7,00'de seyreltik histamin çözeltisinin enjeksiyonu sonucu 20 °C kolon sıcaklığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.35. 1 dk çalkalanarak türevlendirilen agmatin ve histamin karışımının enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

Türevlendirme işlemi 25 °C'de yapılmıştır. Hareketli faz pH'sı 6,05 değerine ayarlanarak, 20 °C kolon sıcaklığında HPLC'de analiz gerçekleştirilmiştir. Kromatogram incelendiğinde, agmatinin bozunmasının minimum düzeye düştüğü ve histaminin 2 kez benzoillenmiş türevinin az oranda oluştuğu görülmektedir. Bu koşullarda çok daha iyi bir karıştırma sağlandığından agmatin ve histaminin bozunması oldukça azalmıştır.

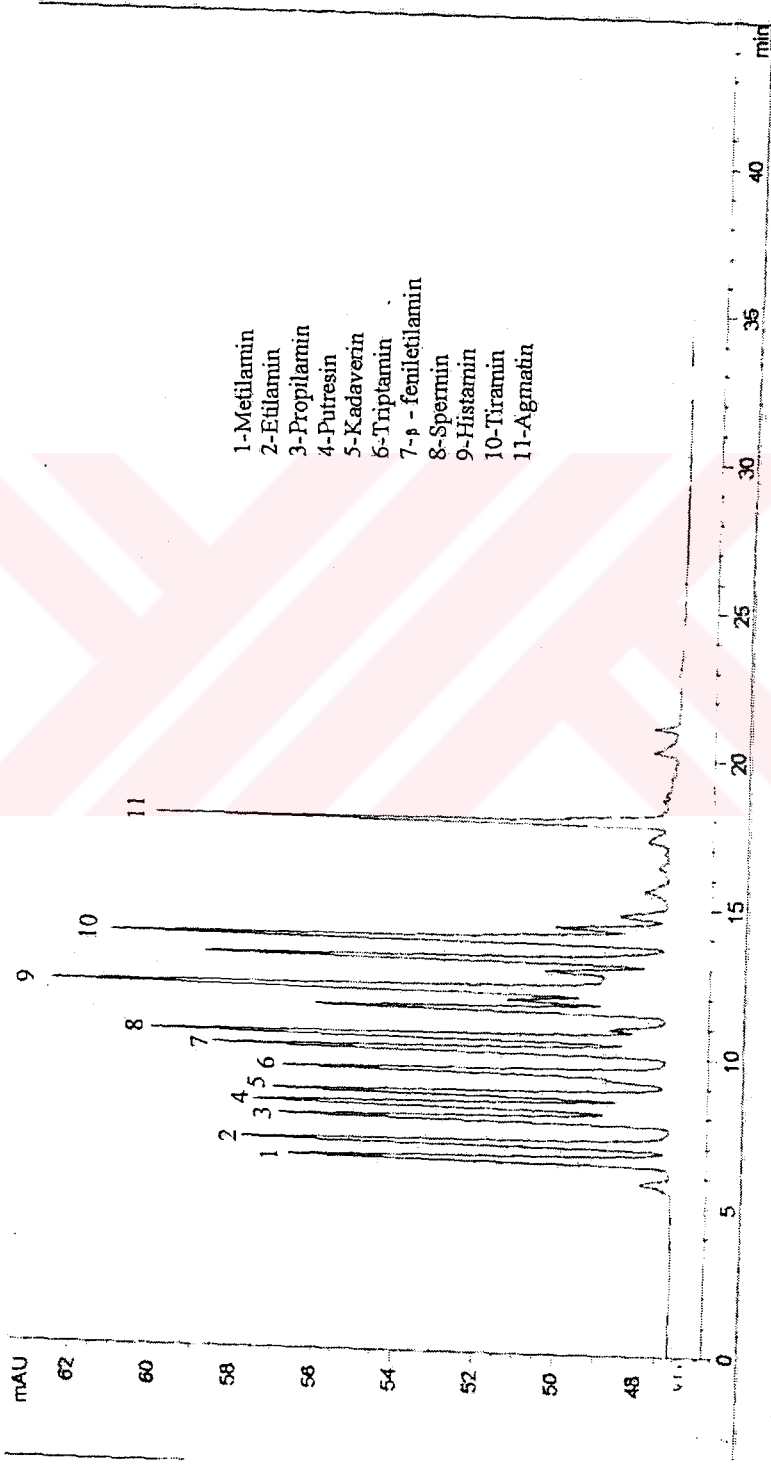
Histaminin bozunması üzerine hareketli faz pH'sı ve kolon sıcaklığının her ikisinde etkili olup, 30 °C gibi yüksek kolon sıcaklıklarında sıcaklık çok daha önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Türevlendirme sıcaklığının 20 veya 25 °C olmasının histamin üzerine herhangi bir etkisi görülmemektedir. Yüksek kolon sıcaklıklarında, hareketli faz pH'sı bazik ortama doğru kaydırsa, histamin düşük konsantrasyonlarda bulunduğu ve iyi bir karıştırma sağlanmadığında histaminin bozunma oranı artmaktadır. Histaminin bozunması üzerinde, histamin ve benzoil klorür konsantrasyonlarının oranı oldukça önemlidir.

4.6. Farklı Kolon Denemeleri

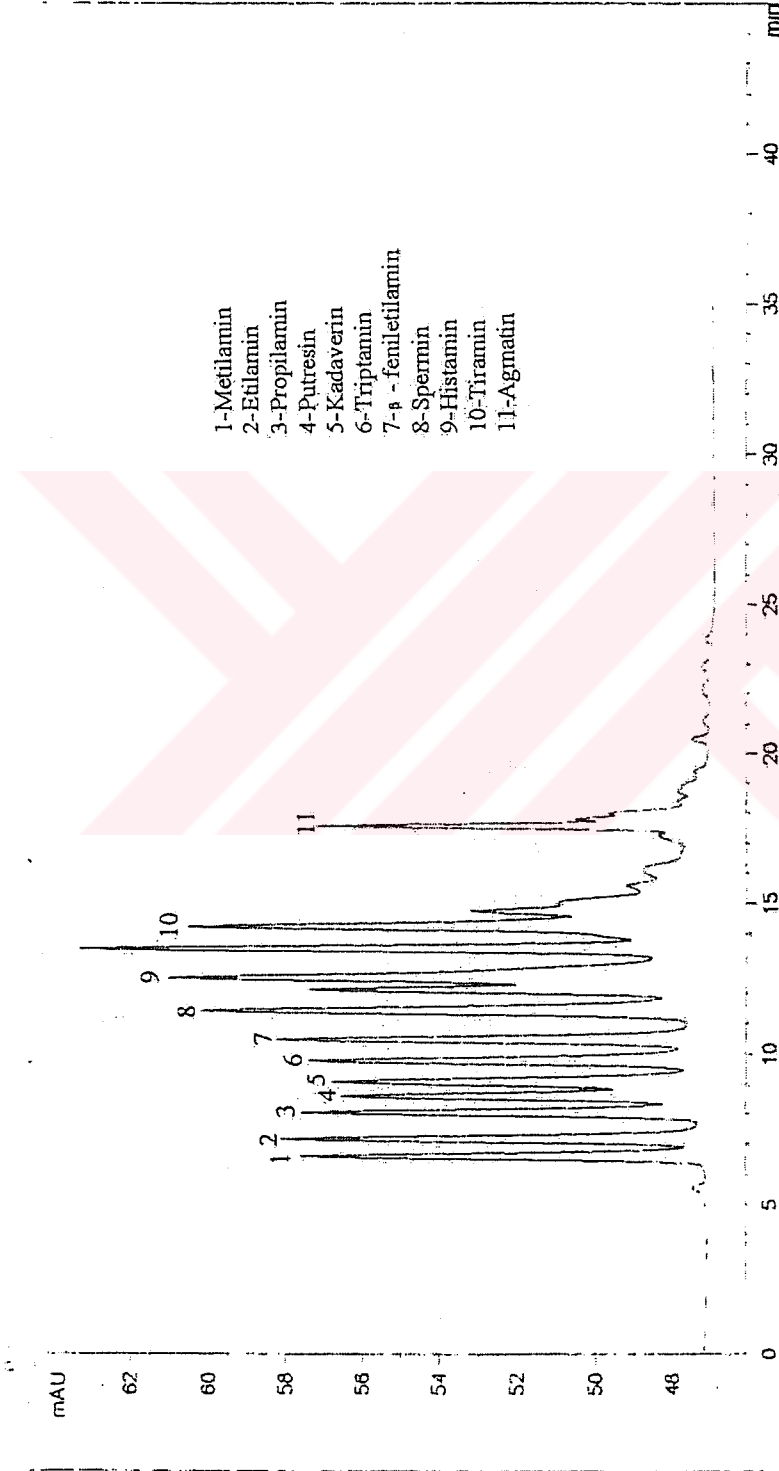
5 ve 10 µ partikül çaplı kolonlarda biyojen aminlerin analizlerinin gerçekleştirilmesi için metilamin, etilamin, propilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β-feniletülin, spermin, histamin, tiramin ve agmatinden oluşan bir standart karışım 25 °C'de türevlendirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiş ve hem 5 hem de 10 µ'luk kolonlarda ayrımlar incelenmiştir. Şekil 4.36. ve 4.37.'de bu denemeler sonucunda elde edilen kromatogramlar görülmektedir. 5 µ'luk kolonda 10 µ'luk kolona göre daha sivri pikler elde edilmiştir. β-feniletülin ve spermin bileşiklerine ait olan piklerin 5 µ'luk kolonda birbirine yaklaştığı, spermin ve histamin bileşiklerine ait olan piklerin aralarındaki mesafenin arttığı görülmektedir. 10 µ partikül büyüklüğüne sahip olan kolonda yapılan analiz sonucu elde edilen kromatogram incelendiğinde histamin

bileşimine ait olan pikin sol kısmında bir çatallanma görülürken, 5 μ 'luk kolonda bu çatallanma histaminden ayrılarak histamin öncesi bir pik gibi görülmektedir. İki kolon arasındaki farklılık kolon tanecik büyüklüklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

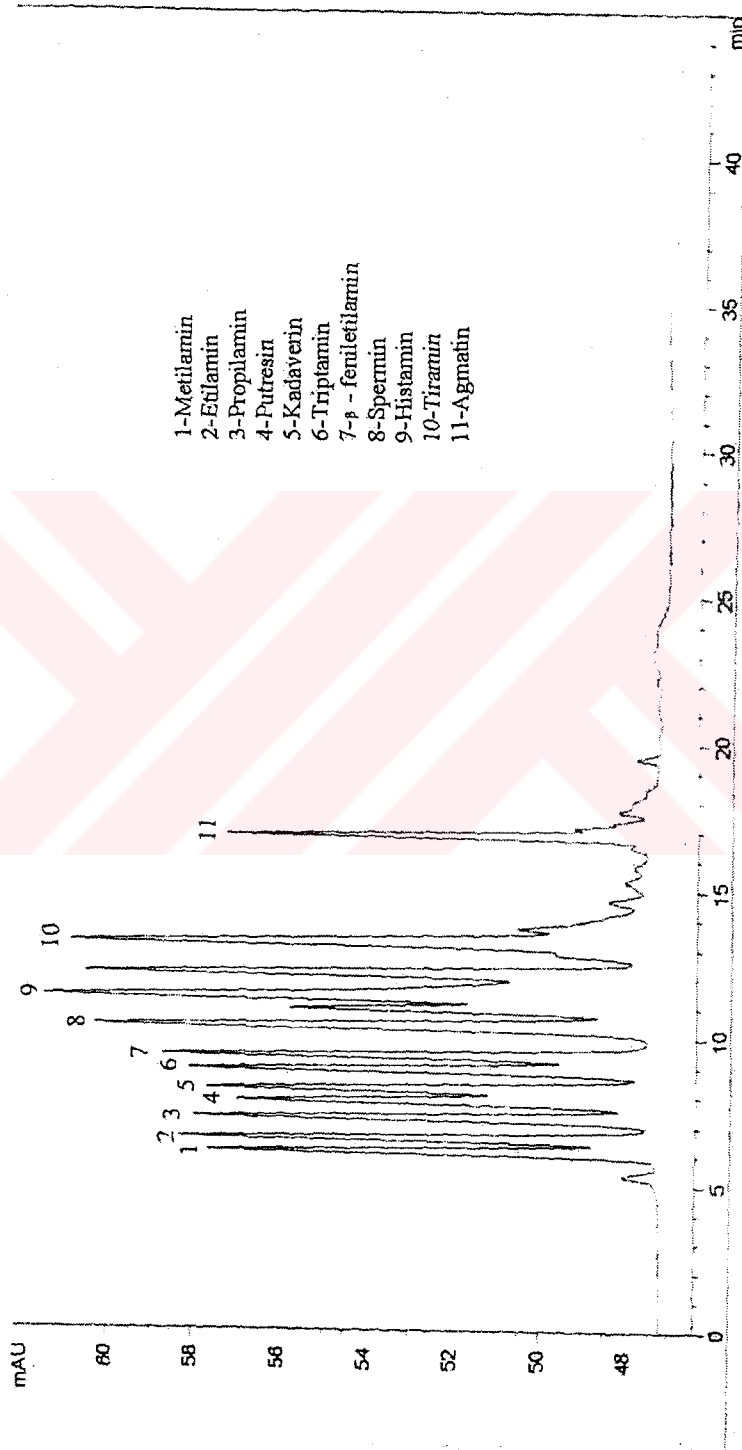
Bu denemelerden başka 10 μ 'luk daha fazla kullanılmış daha eski bir kolonda aynı standart karışım kullanılarak deneme tekrarlanmış, kolonun eski yada yeni olmasının piklerin ayrımı üzerine etkisi irdelenmiştir. Bu deneme sonucu elde edilen kromatogram şekil 4.38'de görülmektedir. Şekil 4.37'de görülen yeni bir 10 μ 'luk kolonun kullanılması sonucu elde edilen kromatogramla karşılaştırıldığında, eski kolonda β -feniletülin ve spermin bileşiklerine ait olan piklerin birbirinden uzaklaştığı ve pikler arasındaki mesafenin arttığı görülmektedir. Elde edilen kromatogramlarda pik alanları karşılaştırıldığında tüm biyojen aminlerin büyüklükleri arasında fark yoktur. Histamin için gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirme sonucunda her 2 kolonda $p < 0,05$ olasılıkla histamin piklerinin büyüklükleri arasında fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.36. 5 μ 'luk kolonda elde edilen kromatogram



Şekil 4.37. 10 μ 'luk yeni kolonda elde edilen kromatogram



Şekil 4.38. 10 μ 'luk eski kolonda elde edilen kromatogram

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Gerçekleştirilen denemeler sonucunda benzoil türevleri kullanılarak biyojen aminlerin analizi için yeni bir yöntem ortaya konmuştur. Biyojen amin analizleri C_{18} kolonda gerçekleştirilmiş, metanol ve asetat tamponundan oluşan dereceli elüsyon programı uygulanmıştır. Ayrımın en iyi bir şekilde gerçekleşmesi için dereceli elüsyon programının nasıl olması gerektiği ortaya konmuştur.

Metilamin, etilamin, propilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β -feniletilamin, spermin, histamin, tiramin ve agmatinden oluşan standart karışımın analizinde en uygun kromatografik koşulların ve türevlendirme koşullarının belirlenmesi için bir takım denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda agmatin ve histamin dışındaki biyojen aminlerin oldukça kararlı türevler oluşturduğu, hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, türevlendirme sıcaklığı gibi faktörlerin değişmesinden etkilenmediği tespit edilmiştir. Koşulların değişmesinden en fazla etkilenen biyojen aminlerin agmatin ve histamin olduğu belirlenmiştir. Hareketli faz pH'sı bazik ortama doğru kaydıka ve kolon sıcaklığı da arttırıldığında özellikle histaminin bozunma oranı artmaktadır.

Hareketli faz pH'sı 6,0 değerinde ve 20 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirilen denemeler sonucunda, histaminin sağ tarafındaki çatallanmanın esas pike dahil olduğu görölmektedir. Bu koşullarda agmatin ve tiramin bileşiklerine ait olan piklerin de iyi bir rezolüsyon gösterdiği görölmüştür. HPLC cihazında 22°C kolon sıcaklığında çalışmanın pratik açıdan daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Histamin benzoil klorür konsantrasyonları oranı iyi ayarlanmadığında ve türevlendirme sırasında yetersiz karıştırma olduğunda histamin bileşiğine ait olan pik küçölmekte ve histaminin iki kez benzoillenmiş türevine ait olan pik büyülmektedir. Agmatin için gerçekleştirilen denemelerde, agmatin yetersiz karıştırma koşullarında kısmen bozularak putresin ve/veya kadaverine yakın molekül ağırlığında bir bileşik vermektedir. Bu

bozunmaların engellenmesi için türevlendirme sırasındaki çalkalamanın 1 dk süreyle gerçekleştirilmesi ve biyojen amin konsantrasyonu/benzoil klorür konsantrasyonu oranının dengeli bir şekilde ayarlanması gerekmektedir.

Türevlendirme sıcaklığı konusunda gerçekleştirilen denemeler sonucunda 30 °C'de türevlendirmenin histamin bileşiğine ait olan piki küçülttüğü, 20 °C'de türevlendirmenin ise agmatini küçülttüğü tespit edilmiştir. 25 °C'de türevlendirme tüm biyojen aminler için en uygun türevlendirme sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Biyojen amin türevlerinin 1 ay süreyle +4 °C'de bekletilmesi histamin, agmatin, etilamin, spermin, tiramin, kadaverin ve β -feniletilamin türevlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Metilamin, propilamin, putresin ve triptamin bileşiklerine ait olan pikler 1 ay bekletme sonunda sadece az bir oranda küçülmüştür. Sonuç olarak örnek ve standartların türevleri eğer gerekiyorsa 1 ay süreyle buzdolabında depolanıp daha sonra analiz edilebilir.

5 ve 10 μ partikül büyüklüğüne sahip kolonlarda yapılan denemeler sonucunda, tanecik büyüklüğünün piklerin ayrımını ve pikler arasındaki mesafeyi etkilediği görülmüştür. Bu denemeden başka 10 μ 'luk daha fazla kullanılmış daha eski bir kolonda aynı standart karışım kullanılarak deneme tekrarlanmış, kolonun eski ya da yeni olmasının piklerin ayrımı üzerine bir etkisi olmadığı, sadece β -feniletilamin ve spermin bileşiklerine ait olan piklerin birbirinden uzaklaştığı görülmüştür.

Benzoil türevleri kullanılarak biyojen aminlerin yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle analizi ile ilgili Hornero-Mendez ve Garrido Fernandez (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışma incelendiğinde, fermente sebze ürünlerinde triptamin, β -feniletilamin, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermin, spermidin ve agmatin biyojen aminlerinin analizini gerçekleştirdikleri görülmektedir. Analizler 5 μ partikül büyüklüğüne sahip C₁₈ kolonda absorbans dedektör

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 225 nm ve 254 nm dalga boylarında çalışmanın biyogen aminler üzerine etkileri irdelenmiş, türevlendirme reaktifi olarak benzoil klorür kullanılmıştır. Türevlendirme işlemi oda sıcaklığında 45 dk süreyle bekletilerek gerçekleştirilmiş, ortama doymuş NaCl ilave ettikten sonra dietileter ile biyogen aminlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra eter fazı azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Mobil faz olarak metanol ve deiyonize su kullanılmıştır. Analizler dereceli elüsyon programı kullanılarak, HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Ancak hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, türevlendirme sıcaklığı gibi değişkenlerin biyogen aminlerin ayrımı üzerine olan etkileri irdelenmemiştir.

Azim (2002), tarafından gerçekleştirilen benzoil türevleri kullanarak biyogen aminlerin analizinde, etilamin, putresin, kadaverin, triptamin, β -feniletilamin, spermidin, spermin ve tiraminin ayrımı için en uygun türevlendirme ve ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. En uygun türevlendirme sıcaklığı 20 °C, en uygun kolon sıcaklığında 25 °C olarak belirlenmiştir. Mobil faz olarak metanol:su (55:45, v/v) kullanılmıştır. En önemli biyogen aminlerden olan agmatin ve histamin ile çalışılmamıştır. Ayrıca diğer değişkenlerin etkileri de irdelenmemiştir.

Gerçekleştirilen denemeler sonucunda benzoil türevleri kullanarak biyogen aminlerin en uygun ayrımını sağlayacak hareketli faz pH'sı 6,0, kolon sıcaklığı 22°C, türevlendirme sırasındaki çalkalama süresi 1 dk ve türevlendirme sıcaklığı da 25°C olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 1 ay süreyle biyogen amin türevlerinin +4°C'da bekletilmesinin örneklerde biyogen amin tayininde herhangi bir olumsuz etkiye yol açmayacağı sonucuna varılmıştır.

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışmasında amaç yöntem belirlemek olduğu için örneklerle çalışılmamıştır. Biyogen aminlerin ayrımı için belirlediğimiz optimum türevlendirme koşulları ve kromatografik koşullar kullanılarak yöntemin değişik gıda örneklerindeki biyogen aminlerin analizinde kullanılması mümkündür.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ababouch, L., Afilal, M. E. & Benabdeljelil, H.,** 1991, Quantitative Changes in Bacteria, Amino Acids and Biogenic Amines in Sardine (*Sardina pilchardus*) Stored at Ambient Temperature (25-28 °C) and in Ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 26, 297-306.
- Alberto, M. R., Arena, M. E. & Manca De Nadra, M. C.,** 2002, A Comparative Survey of Two Analytical Methods for Identification and Quantification of Biogenic Amines, *Food Control*, 13, 125-129.
- Askar, A., Treptow, H.,** 1986. Biogene Amine in Lebensmitteln Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung, Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart, Germany
- Aygün, O., Schneider, E., Scheuer, R., Usleber, E., Gareis, M. & Mörtlbauer, E.,** 1999, Comparison of ELISA and HPLC for the Determination of Histamine in Cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1961-1964.
- Ayhan, K., Kolsarici, N. & Özkan, G.,** 1999, The Effects of A Starter Culture on the Formation of Biogenic Amines in Turkish Soudjoucks, *Meat Science*, 53, 183-188.
- Azim, Ö.,** 2002, Gıdalarda Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Biyojen Amin Analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bauza, T., Blaise, A., Mestres, J. P., Teissedre, P. L., Daumar, F. & Cobonis, J. C.,** 1995. Biogenic Amines Contents and Their Variation Parameters in Cotes du Rhone, Wallee du Rhone and Provence Wines, *Sciences des Aliments*, 15(4), 367-380.
- Buiatti, S., Boschelle, O., Mozzon, M. & Battistutta, F.,** 1995, Determination of Biogenic Amines in Alcoholic and Non-Alcoholic Beers by HPLC, *Food Chemistry*, 52, 199-202.
- 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.
- Busto, O., Miracle, M., Guasch, J. & Borrull, F.,** 1997, Determination of Biogenic Amines in Wines By High-Performance Liquid Chromatography With On-Column Fluorescence Derivatization, *Journal Of Chromatography A*, 757, 311-318.
- Buteau, C. and Duitschaeffer, C. L.,** 1984, High Performance Liquid Chromatographic Detection and Quantification of Amines in Must and Wine, *Journal Of Chromatography*, 284, 201-210.
- Denli, Y. & Anli, R. E.,** 1998, The Significance and Formation of Biogenic Amines in Wine and Beer, *Gıda*, 23 (5), 323-327.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

El-Sayed, M. M., 1996, Biogenic Amines in Processed Cheese Available in Egypt, *International Dairy Journal*, 6, 1079-1086.

Fernandez-Salguero, J. & Mackie, I. M., 1987, Technical Note: Preliminary Survey of The Contents of Histamine and Other Higher Amines in Some Samples of Spanish Canned Fish, *International Journal Of Food Science and Technology*, 22, 409-412.

Gloria, M. B. A., Watson, B. T., Simon-Sarkadi, L. & Daeschel, M. A., 1998, A Survey of Biogenic Amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3), 279-282.

Goni, D.T. & Azpilicueta, C.A., 2001, Influence of Yeast Strain On Biogenic Amines Content in Wines: Relationship With The Utilization of Amino Acids During Fermentation, *American Journal Of Enology And Viticulture*, 52(3), 185-190.

Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W., 1994, Biogenic Amines and Their Production by Microorganisms In Food, *Trends In Food Science and Technology*, 5, 42-49.

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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hwang, D. F., Chang, S. H., Shiua, C. Y. & Chai, T.,** 1997, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Fish Implicated in Food Poisoning, *Journal of Chromatography B*, 693, 23-30.
- Izquierdo-Pulido, M., Font-Fabregas, J., Carceller-Rosa, J. M., Marine-Font, A. & Vidal-Carau, C.,** 1997, Tyramine Formation By *Pediococcus spp.* During Beer Fermentation, *Journal of Food Protection*, 60 (7), 831-836.
- Izquierdo-Pulido, M., Font-Fabregas, J., Carceller-Rosa, J. M., Marine-Font, A. & Vidal-Carau, C.,** 1996, Biogenic Amine Changes Related to Lactic Acid Bacteria During Brewing, *Journal of Food Protection*, 59 (2), 175-180.
- Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A. & Vidal-Carou, M. C.,** 1994, Biogenic Amines Formation During Malting and Brewing, *Journal Of Food Science*, 59 (5), 1104-1107.
- Jakob, L.,** 1968, Absorption von Histamin und Acetylcholin bei der Bentonit Behandlung von Wein, *Weinbergu Keller*, 15(10), 555-560.
- Kalac, P. & Krizek, M.,** 1996, Formation Of Biogenic Amines in Four Edible Mushroom Species Stored Under Different Conditions, *Food Chemistry*, 58 (3), 233-236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

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.

Kalac, P., Savel, J., Krizek, M., Pelikánová, T. & Prokopová, M., 2002, Biogenic Amine Formation in Bottled Beer, *Food Chemistry*, 79, 431-434.

Kalac, P., Svecová, S. & Pelikánová, T., 2002, Levels Of Biogenic Amines in Typical Vegetable Products, *Food Chemistry*, 77, 349-351.

Karababa, Z., 2003, Ortafital-Aldehit Türevleri Kullanılarak Biyojen Aminlerin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemiyle Analizi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 123 s.

Kirschbaum, J., Rebscher, K. & Brückner, H., 2000, Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Fermented Foods After Derivatization with 3,5-Dinitrobenzoyl Chloride, *Journal Of Chromatography A*, 881, 517-530.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Krüger, C., Sewing, U., Stengel, G., Kema, I., Westermann, J. & Manz, B., 1995, ELISA zur Bestimmung von Histamin in Fisch (ELISA for the Determination of Histamine in Fish), *Arch. Lebensmittelhyg.*, 46, 115-119.

Künsch, U., Scharer, H., Pulver, D. & Temperli, A., 1989, Formation of Biogenic Amines During Sauerkraut Fermentation, International Conference Biotechnology and Food, Stuttgart

Lange, J., Thomas, K. & Wittmann, C., 2002, Comparision 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.

Lonvaud-Funel, A., 2001, Biogenic Amines in Wines: Role Of Lactic Acid Bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 199, 9-13.

Lüthy, J. & Schlatter, C., 1983, Biogene Amine in Lebensmitteln: Zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Phenylethylamin auf den Menschen (Biogenic Amines in Foods: Effects of Histamine, Tyramine and Phenylethylamine on Man), *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 177, 439-443.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P. & Alves, A., 1999, Evaluation Of Biogenic Amines in Some Portuguese Quality Wines by HPLC Fluorescence Dedection of OPA Derivatives, *American Journal Of Enology Viticulture*, 50 (1), 128-132.

Maijala, R., & Eerola, S., 1993, Contaminant Lactic Acid Bacteria of Dry Sausages Produce Histamine and Tyramine, *Meat Science*, 35(3), 387-395.

Mayer, K. & Pause, G., 1972, Biogene Amine in Sauerkraut, *Food Science and Technology*, 5, 108-109.

Mayer, K., 1976, Biogenic Amines in Food, Investigations in Wine and Sauerkraut, *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 26 (1/3), 263-269.

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F. & Munoz, R., 2003, Screening of Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From Grape Must And Wine, *International Journal of Food Microbiology*, 84, 117-123.

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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Nehring, P., Krause, H., 1969, Konserven Technisches Handbuch, Verlag Günther Hengel-Braunschweig.

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.

Özoğul, F., Taylor, K.D.A., Quantick, P. & Özoğul, Y., 2002 Biogenic Amines Formation in Atlantic Herring (*Clupea Harengus*) Stored Under Modified Atmosphere Packaging Using A Rapid HPLC Method, *International Journal of Food Science And Technology*, 37, 515-522.

Pechanek, U., Blaicher, G., Pfannhauser, W. & Woidich, H., 1980, Beitrag zur Untersuchung Biogener Amine in Kase und Fischen, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 171, 420-424.

Rollan, G. C., Coton, E. & Lonvaud-Funel, A., 1995, Histidine Decarboxylase Activity of *Leuconostoc Oenos* 9204, *Food Microbiology*, 12, 455-461.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- 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.
- Sayem-El-Daher, N. and Simard, R. E.,** 1985, *Journal of Food Protection*, 48, 54-58.
- Shakila, R. J., Vasundhara, T. S. & Kumudavally, K. V. ,**2001, A Comparision of the TLC-Densitometry and HPLC Method For the Determination of Biogenic Amines in Fish and Fishery Products, *Food Chemistry*, 75, 255-259.
- Shalaby, A. R.,** 1996, Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health, *Food Research International*, 29 (7), 675-690.
- Shalaby, A. R.,** 1999, Simple, Rapid and Valid Thin Layer Chromatographic Method for Determining Biogenic Amines in Foods, *Food Chemistry*, 65, 117-121.
- Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. H.,** 1995, Biogenic Amines and Microbial Quality of Sprouts, *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung*, 200:261-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Silla Santos, M. H., 1996, Biogenic Amines: Their Importance in Foods, *International Journal Of Food Microbiology*, 29, 213-231.

Soleas, G. J., Carey, M. & Goldberg, D. M., 1999, Method Development and Cultivar Related Differences of Nine Biogenic Amines in Ontario Wines, *Food Chemistry*, 64(1), 49-58.

Soufleros, E., Barrios, M. L. & Bertrand A., 1998, Correlation Between the Content of Biogenic Amines and Other Wine Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3), 266-278.

Stratton, J. E., Hutkins, R. W. & Taylor, S. L., 1991, Biogenic Amines in Cheese and Other Fermented Foods: A Review, *Journal Of Food Protection*, 54 (6), 460-470.

Straub, B. W., Kicherer, M., Schilcher S. M. & Hammes, W. P., 1995, The Formation of Biogenic Amines by Fermentation Organisms, *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 201, 79-82.

Taylor, S. L., Lieber, E. R. & Leatherwood, M., 1978, A Simplified Method for Histamine Analysis of Food, *Journal of Food Science*, 43, 247-250.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. & Huis In't Veld, J. H. J.** 1990, Occurance and Formation of Biologically Active Amines in Foods, *International Journal Of Food Microbiology*, 11, 73-84.
- Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K. & Willems, M. I.,** 1997, Acute And Subacute Toxicity Of Tyramine, Spermidine, Putrescine And Cadaverine In Rat,. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 337-348.
- Üren, A., Yücel, U., Hocalar, B. ve Turantaş, F.,** 2001, Fermente Ürünlerden Peynir, Şarap ve Lahana Turşularında Biyojen Amin Miktarları, 70 s.
- Vale, S. & Gloria, M. B. A.,** 1998, Biogenic Amines in Brazilian Cheeses, *Food Chemistry*, 63 (3), 343-348.
- Vale, S. R. & Gloria, M. B. A.,** 1997, Determination of Biogenic Amines in Cheese, *Journal of AOAC International*, 80 (5), 1006-1012.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A. & Polychroniadou, A.,** 2000, Biogenic Amine Production in Feta Cheese, *Food Chemistry*, 71, 259-266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- 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.
- Veciana-Nogues, M. T., Vidal-Carou, M. C. & Marine-Font, A.,** 1989, Histamine and Tyramine in Preserved and Semipreserved Fish Products, *Journal of Food Science*, 54 (6), 1653-1655.
- Vidal-Carou, M. C., Codony-Salcedo, R. & Marine-Font, A.,** 1990, Histamine and Tyramine in Spanish Wines: Relationships With Total Sulfur Dioxide Level, Volatile Acidity and Malo-Lactic Fermentation Intensity, *Food Chemistry*, 35, 217-227.
- Vinci, G. & Antonelli, M. L.,** 2002, Biogenic Amines: Quality Index Of Freshness in Red And White Meat, *Food Control*, 13, 519-524.
- Zappavigna, R., Brambati, E. & Cerutti, G.,** 1974, Study and Determination of Nonvolatile Amines in Wines, Juices, Beer And Vinegar. *Riviste Di Viticoltura E Di Enologia*, 27 (7), 285-294.
- Zee, J. A., Simard, R. E., Heureux, L. L. & Tremblay, J.,** 1983, Biogenic Amines in Wines, *American Journal Of Enology and Viticulture*, 34, 6-9.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İzmir’de doğmuş, ilk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamlamıştır. 2002 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans öğrenimini bölüm üçüncüsü olarak 4 yılda tamamlayarak, aynı yıl E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Kasım 2002’den beri Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Kimyası Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

