

Biyojen Amin Analiz Yöntemleri

Özgül Özdestandan*, Ali Üren

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü, İzmir

* ozgul.ozdestandan@ege.edu.tr

Özet

Potansiyel toksisitelerinden dolayı çeşitli gıdalarda bulunan biyojen aminlerin analiz edilerek belirlenmesi oldukça önemlidir. Gıdaların matrisi kompleks olduğundan biyojen aminlerin analizi oldukça zordur. Kromatografik analizden önce gıdalardaki biyojen aminlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması gerekir. Biyojen amin analizlerinde en fazla kullanılan kromatografik yöntem yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) dir. Bu yöntemle biyojen amin analizi için, kolon öncesi ya da kolon sonrasında, dansil klorür, ortofitaldialdehit (OPA), benzoil klorür, dabsil klorür, dinitrobenzoil klorür v.b. türevlendirme reaktiflerinden biriyle biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekmektedir. Bu derlemede farklı gıdalardaki biyojen aminlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analiz yöntemleri anlatılmaktadır.

Anahtar kelimeler : Biyojen aminler, histamin, HPLC

Giriş

Biyojen aminler doğal olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan, bazik özellik gösteren, azotlu organik bileşiklerdir ve canlı hücrelerde önemli metabolik işlevleri vardır. Spermin, spermidin gibi poliaminler ve putresin canlıların büyüme ve gelişmesi için zorunludur. Bazı fermente gıdalarda ve bazı bozulmuş veya bayatlamış gıdalarda mikrobiyal aktivite sonucu, amino asitlerin dekarboksilasyonu ile yüksek konsantrasyonlarda biyojen aminler oluşur (1, 2). Balık ve ürünleri, et ve ürünleri, süt ürünleri, şarap, bira, meyve ve sebzeler, çikolata, fermente sebze ürünleri gibi gıdalarda biyojen aminler meydana gelebilmektedir (3). Gıdalarda oluşan başlıca biyojen aminler putresin, kadaverin, histamin, tiramin, triptamin, β -feniletilamin, spermin, spermidin, metilamin, etilamin ve etanolamindir (4).

Biyojen aminlerin gıda açısından önemi bu ürünlerin potansiyel toksisitesinden kaynaklanmaktadır. Baş ağrısı, solunum güçlüğü, kalp çarpıntısı, yüksek veya düşük tansiyon ve daha başka allerjik reaksiyonlara neden olurlar (5).

Normal koşullarda gıdalarla insan vücuduna alınan biyojen aminler vücudun sindirim sisteminde bulunan monoamino oksidaz (MAO), diamino oksidaz (DAO) ve histamin-N-metil transferaz enzimleriyle detoksifiye edilmektedirler.

Böylece çok yüksek miktarda tüketilmedikleri takdirde insan sağlığı üzerine olumsuz bir etki göstermemektedirler (6, 7, 8). Biyojen aminlerin toksikolojik etkileri, sindirim sisteminde bulunan monoamino oksidaz ve diamino oksidaz enzimlerinin genetik olarak eksikliğinde, bu enzimleri inhibe edici ilaçlar kullanıldığında (ağrı kesiciler, stres ve depresyon ilaçları, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar) veya yüksek miktarlarda alkol tüketildiğinde artmaktadır (9).

Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin belirlenmesi yalnızca bu bileşiklerin toksisiteleri açısından değil, kalitenin indikatörleri olması açısından da önem taşımaktadır (10).

Biyojen Amin Analiz Yöntemleri

Histamin ve diğer biyojen aminlerin nitel ve nicel tayinleri için kromatografi, florimetri, kapiler elektroforez v.b. teknikler kullanılmaktadır. Bunların içerisinde kromatografik yöntemler en uygun yöntemlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC) biyojen amin analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılan kromatografik yöntemlerdir (11). Bunlar içinde HPLC en çok kullanılan yöntemdir.

Genelde gıdaların matriksi kompleks olduğundan kromatografik analizden önce ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin uygulanması gerekir. Özellikle nötr ve asidik pH lerde biyojen aminlerin polarlıkları birbirinden oldukça farklıdır. Bu pH lerde biyojen aminler tuzları şeklindedir ve tiramin, triptamin ve β -feniletilaminin polarlığı diğerlerinden daha azdır. pH 11,5 in üzerinde ise biyojen aminler serbest bazları şeklindedir ve polarlıkları birbirine daha yakındır (fakat aynı değildir). Biyojen aminlerin ve biyojen amin tuzlarının polarlıklarının birbirinden az veya çok farklı olması, dikkat edilmediği takdirde, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sırasında biyojen amin kayıplarına neden olur. Katı matriksten biyojen aminlerin ekstraksiyonu su ile oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Bağlı biyojen aminlerin ekstraksiyonu ancak asitlerle gerçekleştirilebilir. Biyojen aminlerin ekstraksiyonu için perklorik asit, trikloroasetik asit (TCA) veya hidroklorik asit kullanılabilir. Bazı araştırmacılar tarafından katı matriksten biyojen aminlerin ekstrakte edilmesinde metanol, aseton, asetonitril-HClO₄ ve diklorometan-HClO₄ gibi kısmen polar olan organik solventler kullanılmıştır. Şarap, bira ve turşu salamurası gibi kompleks olmayan örneklerle çalışılırken ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerine gerek yoktur. Süzme, santrifüjleme v.b. basit işlemlerden sonra, veya girişim yapan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra hemen türevlendirmeye geçilebilir. Kompleks gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonu sonucu elde edilen çözeltilerin saflaştırılarak girişim

yapan maddelerden arındırılması gerekir. Bu amaçla sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), C₁₈ kartuşu kullanılarak katı-faz ekstraksiyonu (SPE) veya alumina veya iyon değiştirici içeren kolon kromatografisi kullanılabilir (12). Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda, genellikle HCl veya TCA içeren ekstraktın saflaştırılması için, bu sulu ekstrakt uygun bir tuz (örneğin NaCl) ile doyurulur, pH si bazik yapılır ve organik bir solventle muamele edilerek biyojen aminlerin organik faza geçmesi sağlanır. Tüm biyojen aminlerin kantitatif bir şekilde sulu fazdan organik faza geçmesi için çeşitli organik çözücüler denenmiştir. Hegzan, dietileter, n-bütanol, kloroform gibi organik çözücülerin veya bunların karışımlarının kullanıldığı yöntemler ileri sürülmüştür (13, 14). Ekstraksiyonda çalışılan pH gıdalardan biyojen aminlerin ekstraksiyonunu ve saflaştırma işlemini etkileyen faktörlerdir. Organik solventle ekstraksiyon sırasında pH nin 11,5 olması genelde uygundur (15). Biyojen aminler organik faza aktarıldıktan sonra, bir kez daha saflaştırmak için organik faz 0,1 M HCl ile çalkalanarak aminlerin sulu faza geçmesi sağlanabilir. Elde edilen HCl li faz türevlendirme işleminde kullanılır. HCl ile yapılan son ekstraksiyon uygulanmayp, biyojen aminleri içeren organik faz doğrudan türevlendirmede kullanılabilir.

Bazı gıdalarla çalışırken ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sadece ekstraksiyon kullanılabilir. Gıdadaki biyojen aminler uygun bir solventle, örneğin 0,1 M HCl veya % 5 lik TCA, ekstrakte edilir ve bu ekstrakt türevlendirmede kullanılabilir.

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra türevlendirme basamağına geçilir. Dansil klorür, ortofitaldialdehit (OPA), benzoil klorür, dabsil klorür, dinitrobenzoil klorür v.b. türevlendirme reaktiflerinden biriyle, kolon öncesi ya da kolon sonrasında biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekmektedir (16).

Sonuç

Gıdalarda biyojen amin analizlerinde çoğunlukla HPLC yöntemi kullanılmaktadır. Peynir, et ve et ürünleri gibi gıdalar çok kompleks gıdalar olduklarından, önce bu gıdalardaki biyojen aminlerin ekstrakte edilmesi ve ardından ekstrakttaki safsızlıkların uzaklaştırılması gerekir. Gıdalardan biyojen aminleri çekmek için en çok 0,1 M HCl veya % 5 lik TCA kullanılmaktadır. Elde edilen asidik ekstraktın saflaştırılması için, ekstrakt organik bir solvent veya solvent karışımı ile çalkalanır. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra biyojen aminlerin türevlendirilmesi gerekir. En çok kullanılan türevlendirme reaktifleri OPA, benzoil klorür ve dansil klorürdür. Türevler çoğunlukla metanol-su veya asetonitril-su karışımından oluşan dereceli elüsyon programı kullanılarak C₁₈ kolonda ayrılır.

Kaynaklar

1. Maijala R, Eerola S. 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, 35(3): 387-395.
2. Ten Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, Huis In't Veld JHJ. 1990. Occurance and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11: 73-84.
3. Silla Santos MH. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 213-231.
4. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7): 675-690.
5. Azim Ö. 2002. Gıdalarda yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile biyojen amin analizleri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 89 s, İzmir.
6. 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.
7. Homero-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.
8. Ordonez AI, Ibanez FC, 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.
9. Lonvaud-Funel A. 2001. Biogenic amines in wines: Role of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 199: 9-13.
10. Alberto MR, Arena ME, Manca De Nadra MC. 2002. A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, 13:125-129.
11. Shakila RJ, Vasundhara TS, Kumudavally KV. 2001. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, 75: 255-259.
12. 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.
13. El-Sayed MM. 1996. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *International Dairy Journal*, 6: 1079-1086.
14. Vale SR, Gloria MBA. 1997. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, 80(5): 1006-1012.
15. Moret S, Conte LS. 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.
16. 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.