



**T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C-12 HİDROKSİ KARMA MOD KOLONU İLE BAZI
BİYOJENİK AMİNLERİN HPLC AYRILMASI, KARMA MOD
AYIRMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ VE
EŞ ZAMANLI KANTİTATİF TAYİNLERİ**

Nazlı Can DAĞ ATİK

Temmuz-2025

BATMAN

**T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C-12 HİDROKSİ KARMA MOD KOLONU İLE BAZI
BİYOJENİK AMİNLERİN HPLC AYRILMASI, KARMA MOD
AYIRMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ VE
EŞ ZAMANLI KANTİTATİF TAYİNLERİ**

Nazlı Can DAĞ ATİK

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL**

Diğer Jüri Üyeleri

**Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL**

Temmuz-2025

BATMAN

TEZ KABUL VE ONAYI

Nazlı Can DAĞ ATİK tarafından hazırlanan “C-12 Hidroksi Karma Mod Kolonu ile Bazı Biyojenik Aminlerin HPLC Ayrılması, Karma Mod Ayırma Mekanizmasının İncelenmesi ve Eş Zamanlı Kantitatif Tayinleri” adlı tez çalışması 07/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL

.....

Üye

Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr.Öğr.Üyesi Ömer Murat ÖTER
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BATÜ-BAP) tarafından BTÜBAP-2024-YL-11 nolu proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği desteklerinden dolayı BATÜ-BAP’a teşekkür ederiz.

ETİK BEYANI

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabullendiğimi bildiririm.

ETHICAL DECLARATION

I declare that all the information in this thesis has been obtained within the framework of ethical behavior and academic rules, and that the source of any statements and information that do not belong to me in this study prepared in accordance with the thesis writing rules has been fully cited, and I declare that I accept all kinds of legal responsibility in case of any contrary situation.

Nazlı Can DAĞ ATİK
Tarih: 07/07/2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

C-12 HİDROKSİ KARMA MOD KOLONU İLE BAZI BİYOJENİK AMİNLERİN HPLC AYRILMASI, KARMA MOD AYIRMA MEKANİZMASININ İNCELENMESİ VE EŞ ZAMANLI KANTİTATİF TAYİNLERİ

Nazlı Can DAĞ ATİK

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Hayriye ARAL

2025, 57 Sayfa

Peynir gibi fermente gıdalarda doğal olarak oluşabilen biyojenik aminlerin güvenilir ve hassas yöntemlerle belirlenmesi, gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, piyasadan temin edilen Tulum peyniri, Kaşar peyniri, Van otlu peyniri, Ezine peyniri, Küp peyniri ve Tam yağlı beyaz peynir örneklerinde bulunan biyojenik aminlerin eş zamanlı tayini, C-12 hidroksi grubu içeren karma mod HPLC kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme yapılmaksızın doğrudan analiz edilen histamin, dopamin, tiramin, serotonin ve triptamin aminleri, UV dedektör ile 254 nm dalga boyunda izlenmiştir. Mobil faz olarak %50 asetonitril ve %50 sodyum asetat tamponu (25 mM, pH 5.5) kullanılmış; pH, sıcaklık, akış hızı ve tampon konsantrasyonu gibi parametrelerin ayırma performansı üzerindeki etkisi sistematik olarak değerlendirilmiştir. Optimum koşullarda tüm aminler yaklaşık 20 dakika içinde başarılı bir şekilde ayrılmıştır.

C-12 hidroksi karma mod kolonun ayırma performansı, klasik ters faz C18 kolonu ile karşılaştırılmış ve daha yüksek seçicilik ile duyarlılık sağladığı gözlemlenmiştir. Analitlerin kolonla etkileşim mekanizması logD, pKa ve polarite gibi kantitatif yapı-alıkonma ilişkisi (QSRR) parametreleriyle değerlendirilmiş; elde edilen bulgular, geliştirilen yöntemin farklı peynir örneklerinde biyojenik aminlerin eş zamanlı ve güvenilir tayininde etkili bir analitik araç olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyojenik aminler, HPLC, karma mod kromatografi, C-12 hidroksi kolon, peynir örnekleri, QSRR

ABSTRACT

MASTER THESIS

HPLC SEPARATION OF BIOGENIC AMINES USING A C-12 HYDROXY MIXED-MODE COLUMN: INVESTIGATION OF THE MIXED-MODE SEPARATION MECHANISM AND SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION

Nazlı Can DAĞ ATİK

Batman University Graduate Education Institute

Chemistry Department of Science

Advisor: Dr. Öğr. Hayriye ARAL

2025, 57 Pages

This study presents the simultaneous quantification of biogenic amines in cheese samples using a C-12 hydroxy mixed-mode HPLC column. Histamine, dopamine, tyramine, serotonin, and tryptamine were analyzed without derivatization and detected with a UV detector at 254 nm. The mobile phase consisted of 50% acetonitrile and 50% sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.5). The effects of pH, temperature, flow rate, and buffer concentration were evaluated. Under optimal conditions, all analytes were separated within 20 minutes. The performance of the C-12 hydroxy column was compared with a conventional C18 column and showed superior selectivity and sensitivity. The separation mechanism was examined using quantitative structure–retention relationship (QSRR) parameters such as logD, pKa, and polarity. The method proved effective for reliable determination of biogenic amines in various cheese samples.

Keywords: Biogenic amines, HPLC, mixed-mode chromatography, C-12 hydroxy column, cheese samples, QSRR, non-derivatized analysis

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, deneyimi ve akademik rehberliğiyle bana yön veren; duruşu, yaklaşımı ve içten desteğiyle yolumu aydınlatan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL'a gönülden teşekkür ederim. Ayrıca, tezimin her aşamasında kıymetli görüşleri ve katkılarıyla destek veren Prof. Dr. Tarık ARAL hocama ve çalışma sürecimde sağladıkları imkânlar dolayısıyla Batman Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının desteklenmesinde katkı sağlayan Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BATÜ-BAP) ve BTÜBAP-2024-YL-11 numaralı proje kapsamında sundukları maddi ve altyapı desteğine ayrıca teşekkür ederim.

Tüm zorlu süreçlerde desteğini esirgemeyip bana her zaman cesaret veren sevgili eşim Sergen ATİK'e; her kararında koşulsuz yanımda olan babam Şenal DAĞ'a; sevgisiyle daima güç veren annem Behiye DAĞ ve desteğini her zaman hissettiren ağabeyim Tolga DAĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecini birlikte deneyimlediğim ve desteğiyle yanımda olan arkadaşım Meryem DOKDEMİR'e teşekkür ederim.

Nazlı Can DAĞ ATİK

BATMAN-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)	2
1.2. Normal Faz Sıvı Kromatografi (Normal Phase Liquid Chromatography; NPLC)3	
1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase Liquid Chromatography;RPLC) 3	
1.4. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi(Hydrophilic Interaction Chromatography;HILIC)	3
1.5. Karma Mod Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (Mixed-Mode High Liquid Chromatography,MHPLC)	7
1.6. Karma Mod Kramotografide Sabit Fazlarla İlgili Mekanizmalar	8
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
2.1. Biyojenik Aminlerin Oluşum Mekanizmaları	13
2.2. Biyojenik Aminlerin Toksikolojik Etkileri.....	14
2.3. Biyojenik Aminlerin Analitik Yöntemlerle Tayini.....	15
2.4. Amaç ve Kapsam	16
3. YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.2. Yöntem.....	19
3.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	19
3.4. Numune Hazırlama (Ekstraksiyon İşlemi)	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Çözücü Optimizasyonu.....	21
4.2. Tampon Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	23
4.3. Akış Hızı Optimizasyonu.....	25
4.4. Sıcaklık Optimizasyonu	27
4.5. pH Optimizasyonu	29
4.6. Biyojenik Aminlerin Ayrılması ve Alıkonması Koşullarının Optimizasyonu	31

4.6.1. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine mobil fazdaki asetonitril (ACN) yüzdesinin etkisi	31
4.6.2. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine tampon derişiminin etkisi.....	32
4.6.3. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine pH'ın etkisi	33
4.6.4. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine akış hızının etkisi	34
4.6.5. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine ve termodinamik parametrelere sıcaklığın etkisi	35
4.7. Kromatografik Bulgular.....	36
4.7.1. Peynir örneklerinden elde edilen kromatogramlar.....	37
4.8. Biyojenik Aminlerin Kantitatif Tayini	38
4.8.1. LOD ,LOQ , tekrarlanabilirlik hesaplamaları	39
4.8.2. Histaminin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması ve örnek uygulama	40
4.8.3. Triptamin kalibrasyonu, LOD–LOQ hesaplaması ve peynir örneklerinde uygulama.....	41
4.8.4. Serotonin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması	43
4.8.5. Tiramin kalibrasyonu, LOD–LOQ hesaplaması ve örnek uygulamalar	44
4.8.6. Serotonin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması	45
4.8.7. Dopamin kalibrasyon sonuçlarının yorumlanması	45
4.8.8. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
5.1 Sonuçlar	48
5.2 Öneriler	49
KAYNAKLAR	51

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. 1 RPLC/HILIC davranışı gösteren karma mod sabit faz örnekleri (Zhang et al., 2016)	10
Çizelge 4. 1 Biyojenik aminlerin farklı ACN yüzdelerinde alıkonma süreleri (dakika)	31
Çizelge 4. 2 Biyojenik aminlerin farklı tampon derişimlerinde alıkonma süreleri (dakika)	32
Çizelge 4. 3 Biyojenik aminlerin farklı pH değerlerinde alıkonma süreleri (dakika)	33
Çizelge 4. 4 Biyojenik aminlerin farklı akış hızlarında alıkonma süreleri (dakika)	34
Çizelge 4. 5 Biyojenik aminlerin sıcaklık değişimine göre alıkonma süreleri ve hesaplanan termodinamik parametreler	35
Çizelge 4. 6 Kromatogramlara ait biyojenik amin bilgileri ve örnek açıklamaları	37
Çizelge 4. 7 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan histamin miktarları (ppm)	38
Çizelge 4. 8 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan triptamin miktarları (ppm)	38
Çizelge 4. 9 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan tiramin miktarları (ppm)	39
Çizelge 4. 10 Histamin için kalibrasyon verileri	40
Çizelge 4.10. A Peynir örneklerinde histamin miktarları	41
Çizelge 4. 11 Triptamin için düşük konsantrasyon kalibrasyon verileri	42
Çizelge 4.11. A Triptamin için yüksek konsantrasyon kalibrasyon verileri	42
Çizelge 4.11. B Peynir örneklerinde triptamin miktarları	42
Çizelge 4. 12 Serotonin için kalibrasyon verileri	43
Çizelge 4.12. A Peynir örneklerinde serotonin miktarları	43
Çizelge 4. 13 Tiramin için düşük konsantrasyon kalibrasyon verileri (0.075–1 ppm) ..	44
Çizelge 4.13. A Tiramin için yüksek konsantrasyon kalibrasyon verileri (10,000–50,000 ppm)	44
Çizelge 4.13. B Peynir örneklerinde tiramin miktarları	44
Çizelge 4. 14 Serotonin için kalibrasyon verileri	45
Çizelge 4.14 A Peynir örneklerinde serotonin miktarları	45
Çizelge 4. 15 Dopamin kalibrasyon verileri	46
Çizelge 4.15. A Peynir örneklerinde dopamin miktarları	46
Çizelge 4. 16 Biyojenik aminler için LOD ve LOQ değerleri	46
Çizelge 4. 17 Biyojenik aminlerin beşli ölçüme dayalı ortalama alıkonma süreleri ve RSD% değerleri	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1 Silika tabanlı polar sabit fazların kimyasal yapı örnekleri	6
Şekil 1. 2 Karma mod ve diğer kromatografiler arasındaki ilişki	8
Şekil 1. 3 Kimya tasarımlarına göre sınıflandırılan karma modlu sabit faz türleri	9
Şekil 2. 1 Biyojenik amin çeşitleri ve kimyasal yapıları (Toy 2010)	14
Şekil 4. 1 Biyojenik aminlerin ACN yüzdesine göre C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri.....	32
Şekil 4. 2 Biyojenik aminlerin farklı tampon derişimlerinde C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri.....	33
Şekil 4. 3 Biyojenik aminlerin farklı pH seviyelerinde C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri.....	34
Şekil 4. 4 Farklı akış hızlarında biyojenik aminlerin C12-hidroksi karma mod kolondaki alıkonma süreleri.....	35
Şekil 4. 5 $1/T$ (K^{-1}) – $\ln k$ grafikleri üzerinden biyojenik aminlerin Van't Hoff analizleri	36
Şekil 4. 6 Biyojenik aminlerin HPLC kromatogramları (A–F).....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ACN:** Asetonitril
C-12: 12 karbonlu düz zincirli alkil grubu (dodesil)
C18: Oktadesil zincirli sabit faz (18 karbonlu)
DAD: Diode Array Detector – Diyot Dizi Dedektörü
Dansil Cl: Dansil Klorür (türevlendirme reaktifi)
HILIC: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Hidrofilik Etkileşimli Sıvı Kromatografisi
HPLC: High Performance Liquid Chromatography – Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IC: Ion Chromatography – İyon Kromatografisi
ICH Q2(R1): International Council for Harmonisation Guideline: Validation of Analytical Procedures
IP-LC: Ion-Pair Liquid Chromatography – İyon Eşleme Sıvı Kromatografisi
LOD: Limit of Detection – Tespit Limiti
LOQ: Limit of Quantification – Kantitatif Tayin Limiti
MAOI: Monoamine Oxidase Inhibitor – Monoamin Oksidaz İnhibitörü
MMC: Mixed-Mode Chromatography – Karma Mod Kromatografi
MS: Mass Spectrometry – Kütle Spektrometresi
NP: Normal Phase
NPLC: Normal Phase Liquid Chromatography – Normal Faz Sıvı Kromatografisi
OPA: o-Phthaldialdehyde – o-ftalaldehit (Türevlendirme ajanı)
PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
QSRR: Quantitative Structure–Retention Relationship – Kantitatif Yapı–Alıkonma İlişkisi
RP: Reversed Phase – Ters Faz Kromatografisi
RP-HPLC: Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography – Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RSD%: Relative Standard Deviation – Göreceli Standart Sapma Yüzdesi
RT: Retention Time – Alıkonma Süresi
UV: Ultraviyole dedeksiyonu
mAU·s: Milli Absorbans Birimi x Saniye (Pik Alanı Birimi)
mL/dk: Mililitre/Dakika (Debimetre Birimi)
ppm: Parts Per Million – Milyonda Bir
µL: Mikrolitre – Hacim Birimi
µg/kg: Mikrogram / kilogram (Konsantrasyon Birimi)

1. GİRİŞ

Ayırma işlemi, farklı bileşenlerin oluşturduğu karışımların analiz edilmesinde temel bir adımdır. Ayırma işlemi gıda ve çevre analizlerinde, klinik ve biyomedikal uygulamalarda, petrol ve kimya endüstrisinde, ilaç ve farmasötik endüstri gibi birçok alanda bileşenlerin tek başına analiz edilebilmesi için zorunludur.

Kromatografik ayırma, karışımda bulunan bileşenlerin sabit ve hareketli fazlarla olan etkileşim farklarına bağlı olarak, sistem içinde farklı hızlarda ilerlemesi prensibine dayanır; Bu farklılık, bileşenlerin ayrılmasına olanak tanıyarak nitel ve nicel analizlerin gerçekleştirilmesini sağlar (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010).

Kromatografinin temel amacı, hedef analitin matristen seçici biçimde ayrılması ve güvenilir şekilde nicel olarak belirlenmesidir. Bu süreç, bileşenlerin sabit fazla gösterdiği etkileşime bağlı olarak hareketli faz içinde farklı hızlarda ilerlemesi prensibine dayanır. Bazı moleküller sabit faza güçlü şekilde bağlanarak sistemde daha uzun süre alıkonurken, diğerleri daha zayıf etkileşim göstererek hızlı bir şekilde taşınır. Böylece analitler, kromatografik sistemde ayrılarak dedektöre farklı zamanlarda ulaşır (Coşkun, 2016).

Kromatografik yöntemler üç farklı ölçüte göre sınıflandırılabilir. Ayırma mekanizmasına göre: adsorpsiyon, partiyon, iyon değişim, boyut dışlama ve afinite kromatografisi gibi türleri vardır. Uygulama şekline göre: kolon kromatografisi, kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi gibi çeşitlere ayrılır. Ayrıca, kullanılan fazların fiziksel hâline göre yapılan sınıflamada, mobil ve sabit fazların sıvı ya da gaz gibi hâllerde bulunmasına göre farklı kromatografi türlerinden söz edilir; örneğin her iki fazın sıvı olduğu sistemler ya da biri gaz biri sıvı olan kombinasyonlar gibi. Bu sınıflandırmalar, analiz edilecek maddenin özelliklerine göre en uygun yöntemin seçilmesini sağlar (Coşkun, 2016; Eser & Ark., 2023).

Sıvı kromatografisi, ilaç analizi, medikal kimya, tarım, gıda kimyası ve biyoanalitik uygulamalar gibi birçok disiplinde yaygın kullanım alanına sahiptir. Sıvı kromatografisi analiz edilecek maddenin kimyasal özelliklerine uygun bir ayırma koşulunun belirlenmesine bağlıdır. Burada önemli noktalardan biri de kromatografik

koşulların seçimidir. Uygun kromatografi modunun seçilmesi ve mobil faz parametrelerinin optimize edilmesi, analitik performansın artmasına etki etmektedir. (Taraji et al., 2018)

1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Geliştirilen analitik tekniklerden biri yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)'dir. Bu teknik geleneksel sıvı kromatografi yöntemlerini geride bırakarak analitik ayırımlar için temel bir yöntem hâline gelmiştir. Bu teknik; amino asitler, monosakkaritler, lipidler, nükleik asitler, proteinler, doğal pigmentler, farmasötik bileşikler gibi biyolojik açıdan aktif çok sayıda maddenin etkili bir şekilde ayrılmasında ve nicel-nitel analizinde kullanılmaktadır (Switzer & Garrity, 1999).

Yüksek basınç altında hareket eden mobil faz, analitleri kromatografik kolona taşır. Kolon içerisinde yer alan katı sabit faz, bileşiklerin farklı fizikokimyasal özelliklerine göre değişen düzeylerde etkileşime girmesini sağlayarak ayrımı mümkün kılar. Analitlerin dedektöre farklı zamanlarda ulaşması ile ayırma gerçekleşir (Coşkun, 2016; Nguyen, 2022)

HPLC sistemlerinin başarısı, tek bir faktöre değil; birden fazla donanım ve malzeme bileşeninin optimize çalışmasına bağlıdır. Bu bileşenlerden biri olan pompa sistemlerinin gelişimi, sabit bir sıvı akışı sağlayarak mobil fazın kolon içinden düzenli geçmesini ve analitlerin etkili şekilde ayrılmasını mümkün kılar. Bununla birlikte, sabit fazın özellikleri de ayırma verimliliğinde belirleyici bir rol oynar. Yüksek basınca dayanıklı, küçük partiküllü ve rijit gözenekli taşıyıcılardan oluşan sabit fazlar, HPLC performansını büyük ölçüde artırır. Bu sabit fazlara kimyasal olarak bağlanan organik ligandlar, kolonun kimyasal stabilitesini ve seçiciliğini güçlendirerek analizlerin güvenilirliğini artırır (Kowalska et al., 2005). Sabit faz yapısının HPLC üzerindeki bu etkisi, son yıllarda geliştirilen yeni nesil kolon teknolojileri ile daha da belirginleşmiş; özellikle biyolojik ve kompleks matrislerde başarılı sonuçlar alınmasını sağlamıştır. Cavazzini (2023) de, HPLC'nin başarısında sabit fazın geliştirilmesini “en kritik aşama” olarak tanımlayarak bu yapısal ilerlemelere dikkat çekmiştir.

1.2. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (Normal Phase Liquid Chromatography; NPLC)

Normal Faz Sıvı Kromatografisinde polar sabit faz, apolar hareketli faz ile düşük polariteli analitlerin ayrılmasında kullanılır. Bu yöntemle lipidlerin ayrılması, yağda ve suda çözünebilen vitaminlerin analizinde kullanılır. Analizi yapılacak analitler, silika ve benzeri polar sabit faz ile etkileşime girer. Öte yandan mobil faz olarak sulu olmayan apolar (Kloroform, n-hekzan, tetrahidrofuran) kullanılır. Analitlerden polar yapıda olanlar, sabit faza daha güçlü şekilde bağlanarak daha uzun süre alıkonur ve kolonu terk etme sürelerindeki fark sayesinde ayırma işlemi gerçekleşmektedir. (Aral, 2013)

1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase Liquid Chromatography;RPLC)

Ters faz sıvı kromatografisi (RPLC), özellikle C18 veya C8 gibi apolar sabit fazların, polar karakterdeki mobil fazlarla birlikte kullanıldığı yaygın bir HPLC tekniğidir (Aral, 2015). Bu yöntemin yaygın olarak tercih edilmesinin temel nedenlerinden biri, hem apolar bileşiklerin hem de zayıf polar veya iyonik bileşiklerin analizine olanak tanımasıdır. RPLC sisteminde, sabit fazla en az etkileşime giren yani en polar analit, kolonu en kısa sürede terk eder. Buna karşılık, daha apolar analitler sabit fazla daha fazla etkileşime girerek sistemde daha uzun süre alıkonurlar (Cavazzini, 2023).

Ters faz sıvı kromatografisinde, analitin kolonda ne kadar süre alıkonacağı; kullanılan sabit fazın yapısı ve yüzey özelliklerinin yanı sıra, analitin sabit fazla ve hareketli fazla olan etkileşimine bağlıdır. Bu faktörlerin kombinasyonu, alıkonma süresini belirleyici temel parametreler arasında yer alır (Aral, 2013).

1.4. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi(Hydrophilic Interaction Chromatography;HILIC)

Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC), polar sabit faz ve yüksek oranda organik çözücü içeren hareketli faz ile yüksek polariteye sahip analitlerin ayrılması amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemle peptitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotidler ve nükleozitler gibi hidrofilik bileşiklerin etkin şekilde ayrılması mümkündür (Aral, Aral, Ziyadanoğulları & Ziyadanoğulları, 2013). HILIC, kokain analizinde (van Nuijs ve ark.,

2011) ve afyon ile amfetamin (MDMA) tayinlerinin yanı sıra insan plazması, serum, hepatosit ekstraktları, idrar ve parmak izi gibi biyolojik örneklerin analizinde başarıyla uygulanmıştır (Kahsay ve ark., 2014; Li ve ark., 2016; Ares & Bernal, 2012).

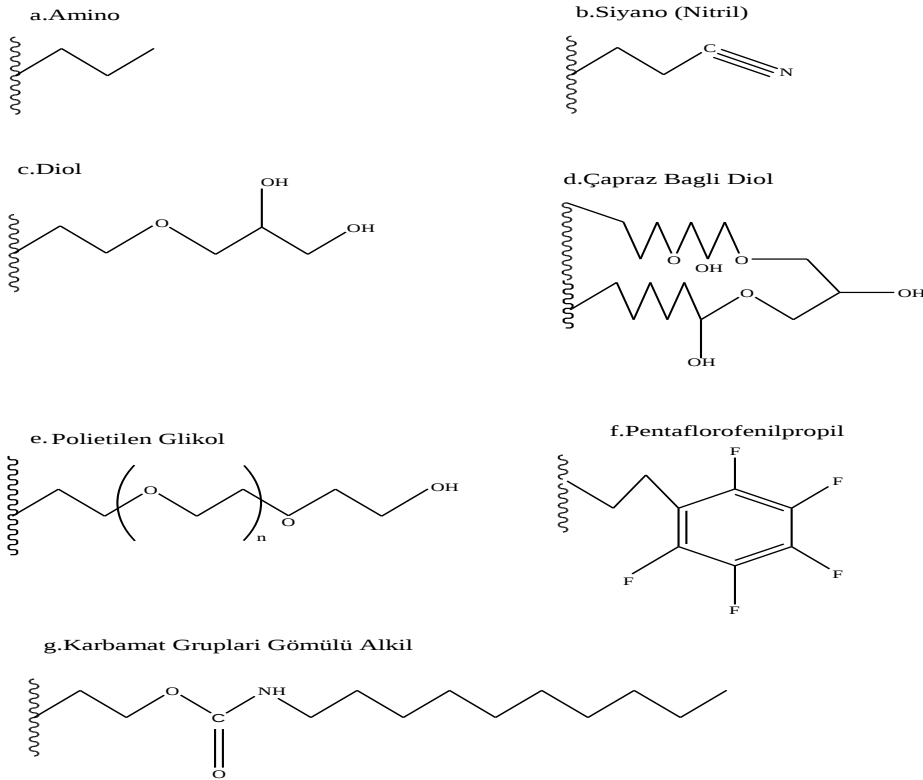
Hidrofilik etkileşimli kromatografi (HILIC) ile Normal faz sıvı kromatografisi (NPLC) bazı yönlerden benzerlik gösterse de önemli farklılıklar da içermektedir. Her iki teknikte de polar sabit fazlar kullanılır; ancak HILIC'in NPLC'den temel farkı, hareketli faz olarak yüksek oranda polar organik çözücüler (genellikle asetonitril) içermesidir. Bu çözücüler, yüksek polariteye sahip bileşiklerin çözünmesini kolaylaştırarak HILIC'i güçlü polar analitlerin ayrımında etkili bir yöntem hâline getirir (Cavazzini, 2023).

HILIC ve ters faz kromatografi (RP-HPLC) karşılaştırıldığında ise, HILIC'in ters faz sistemlerinde yeterince alıkonamayan yüksek polariteye sahip analitleri etkin şekilde ayırabildiği görülmektedir. Ayrıca, elüsyon sıralamasının ters faz kromatografisine göre ters yönlü olması, HILIC'e alternatif bir seçicilik avantajı kazandırmaktadır (Aral et al., 2013). HILIC'ta alıkonmama mekanizmasına baktığımızda ise burada farklı çözücülerin kolondan farklı hızlarla geçmesi aralarındaki hidrojen bağları, dipol- dipol etkileşimler ve elektrostatik etkileşimlerle sağlandığı bilinmektedir.

Hidrofilik etkileşimli kromatografide (HILIC), sabit faz olarak silika jel, aminopropil bağlı silika jel, diol, siyanopropil ve zwitteriyonik yüzey modifikasyonlarına sahip sabit fazlar yaygın şekilde kullanılmaktadır. Silika jel, yüzeyinde bulunan silanol gruplarının belirli pH aralıklarında iyonlaşarak negatif yüklü aktif merkezler oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir. Aminopropil bağlı silika jel özellikle monosakkaritlerin ayrımı için yaygın biçimde kullanılırken, diol ve siyanopropil bağlı sabit fazlar düşük polariteleri ve sınırlı kapasiteleri nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Zwitteriyonik sabit fazlar ise sulfobetain ve fosfocholin gibi su tutma kapasitesi yüksek iyonik gruplar içerdiğinden yaygın kullanım alanına sahiptir. Buna ek olarak, amid grupları içeren sabit fazların kalıcı dipol momentleri sayesinde güçlü hidrojen bağları oluşturduğu ve bu fazların HILIC modunda özellikle bazik analitlerin ayrımında yüksek seçicilik sunduğu bildirilmiştir. Aral (2013) tarafından sentezlenen glutamin ve fenilalanin türevi amid-silika sabit fazlar hem polar hem de aromatik etkileşimleri destekleyerek HILIC modunda nükleotid, nükleozit ve fenolik bileşiklerin başarılı şekilde ayrılmasına olanak sağlamıştır. Bu tür sabit fazlar, geleneksel C18 gibi apolar fazlara göre daha fazla polar etkileşim sağladıkları için karma modlu ayırma mekanizmalarına da katkı sunmaktadır (Aral, 2013; Cavazzini, 2023).

HILIC’te hareketli faz olarak genellikle yüksek oranda asetonitril içeren sulu çözeltiler, metanol-su karışımları veya tamponlanmış tetrahidrofuran çözücü sistemleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan asetonitril, tipik bir polar aprotik çözücü olup yalnızca hidrojen bağı akseptörü (H-bond acceptor) olarak işlev görmektedir. Buna karşın, metanol ve etanol gibi çözücüler polar protik sınıfına dahil olup hem hidrojen bağı donörü (H-bond donor) hem de akseptörü özellikleri göstermektedir. Bu farklılık, çözücülerin sabit faz ve analitler ile kurduğu etkileşimleri etkileyerek ayırma mekanizması üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır (Cavazzini, 2023).

HILIC, farmasötik matrislerde yüksek polariteli analitlerin belirlenmesinde ters faz kromatografisine (RP-HPLC) etkili bir alternatif sunar. Yüksek oranda asetonitril içeren sulu tampon sistemleri, HILIC modunda genellikle tercih edilen hareketli fazlardır. Bu tür sistemlerde, apolar bileşikler sabit fazla zayıf etkileşime girdikleri için daha erken elüe olurken, polar bileşikler sabit faz üzerindeki hidrofilik etkileşimler sayesinde daha uzun alıkonur. Bu durum, HILIC’in polar analitler için yüksek seçicilik ve alıkonma sağlamasına olanak tanır. Öte yandan, metanol gibi polar protik çözücüler HILIC modunda kuvvetli çözücüler olarak kullanılabilir, ancak suya kıyasla daha düşük alıkonma sağlamaları nedeniyle sınırlı avantaj sunarlar (Olsen, 2001; Cavazzini, 2023).

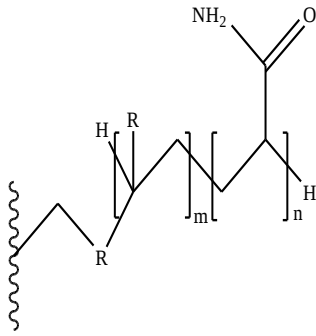


(Devamı bir sonraki sayfada)

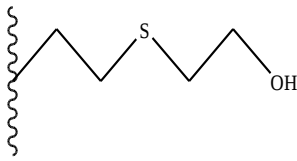
h. Amid Grupları Gömülü Alkil



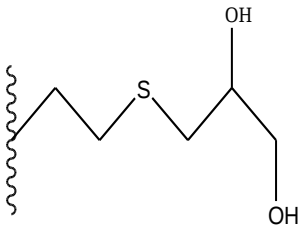
i. TSK-Gel Amid-80



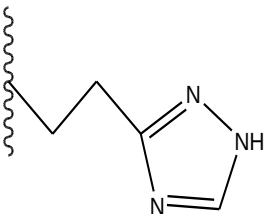
j. Mercaptoethanol-Silica



k. Tiogliserol Silika



l. Triazol



Şekil 1. 1 Silika tabanlı polar sabit fazların kimyasal yapı örnekleri

1.5. Karma Mod Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (Mixed-Mode High Liquid Chromatography, MHPLC)

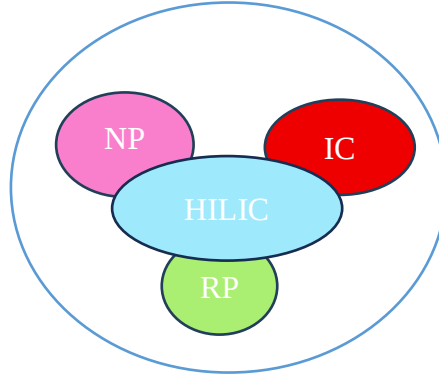
Kromatografik ayırma teknikleri, analit ile sabit faz arasındaki baskın etkileşime göre normal faz, ters faz veya hidrofilik etkileşimli kromatografi gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Bu tekniklerin çoğu, tek bir alıkonma mekanizmasına dayanır ve bu nedenle “tek modlu kromatografi” (single-mode chromatography) olarak adlandırılır (Nguyen, 2022). Her bir yöntemde ayırım, sabit faz ve analit arasındaki özel fizikokimyasal ilişkilerle sağlanır. Örneğin, normal fazda hidrojen bağları ve dipol-dipol etkileşimleri ön plandayken; ters fazda daha çok hidrofobik etkileşimler etkili olur. İyon değişim kromatografisinde ise, sabit fazdaki iyonik gruplar ile yük taşıyan analitler arasında oluşan elektrostatik çekim kuvvetleri ayırımı belirler (Cavazzini, 2023).

Karma modlu kromatografi (Mixed-Mode Chromatography, MMC) ise birden fazla etkileşim türünü aynı sabit faz üzerinde bulundurarak, hem iyonik hem de apolar karakter taşıyan maddelerin aynı koşullarda ayrılmasını mümkün kılar. MMC'nin klasik yöntemlerden farkı, çözünen maddelerin birden fazla fonksiyonel grubuna eş zamanlı olarak etki edebilmesidir (Nguyen, 2022). Sabit fazda yer alan hidrofobik zincirlerle birlikte yerleştirilmiş iyonik gruplar, aynı anda hem elektrostatik hem de van der Waals etkileşimlerine olanak tanır (Wan, 2021). Bu yapı sayesinde, mobil fazın pH, tuz konsantrasyonu ve organik çözücü oranı gibi parametreleri değiştirilerek seçicilik esnek bir biçimde ayarlanabilir (Fukushima et al., 2024).

Bu yöntem özellikle yüksek polariteye sahip biyojenik aminler gibi bileşiklerin analizi için uygundur. Zira klasik ters faz kolonlarında bu tür bileşiklerin alıkonma genellikle yetersizdir. Karma modlu kolonlar ise, analitlerin hem iyonik hem de hidrofobik özelliklerini dikkate alarak daha güçlü bir alıkonma sağlar ve iyon eşleyici kullanılmaksızın kütle spektrometresi ile uyumlu çalışılabilir (Orlovsky & Zelechonok, 2011). Bu bağlamda, bu tez çalışmasında C-12 hidroksi fonksiyonel grubuna sahip bir karma mod sabit faz ile çeşitli biyojenik aminlerin MHPLC (Mixed-Mode High-Performance Liquid Chromatography) sistemiyle ayrılması, ayırma mekanizmasının açıklanması ve kantitatif tayinlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

C-12 hidroksil grubu içeren sabit fazlar, hem hidrojen bağları kurabilen polar yapısı hem de uzun alkil zincirli hidrofobik bölgesi sayesinde hem HILIC hem de RP karakteri gösterir. Bu hibrit yapı, farklı polarite düzeylerine sahip bileşiklerin aynı fazda etkili bir biçimde ayrılmasını sağlar. Jandera (2011), bu fazların çoklu etkileşim potansiyeli

sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik analitler için yüksek performans sunduğunu vurgulamaktadır. Benzer şekilde Alpert (2008), hidroksil gruplarının iyonik analitler için seçiciliği artırdığını ve bu tür fazların geniş uygulama yelpazesi sunduğunu belirtmiştir. C-12 hidroksil içeren fazların biyolojik örneklerde—özellikle peptitler ve metabolitler gibi kompleks bileşiklerde—kullanımının yaygınlaştığı literatürde yer almaktadır (Zhang et al., 2016).



Şekil 1. 2 Karma mod ve diğer kromatografiler arasındaki ilişki

1.6. Karma Mod Kromatografide Sabit Fazlarla İlgili Mekanizmalar

Karma mod kromatografi (mixed-mode chromatography, MMC), sabit faz ile analitler arasındaki etkileşimlerin birden fazla mekanizma aracılığıyla aynı anda gerçekleştiği gelişmiş bir kromatografik tekniktir. MMC’de kullanılan sabit fazlar; hidrofobik (örneğin C18 zincirleri), hidrofilik (örneğin poliamid, diol), ve iyonik (karboksil, sülfat, amin gibi) grupları bir arada içererek, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip analitlerin aynı sistemde ayrımını mümkün kılar. Bu çok modlu yapı sayesinde hem nötr hem de iyonik analitler etkili şekilde alıkonabilir ve elüe edilebilir (Nguyen, 2022; Zhang & Liu, 2016).

Bu sistemin en önemli avantajlarından biri, klasik ters faz kromatografisine göre yüksek polariteye veya iyonik özelliğe sahip bileşiklerin ayrılmasında iyon eşleyici reaktifler kullanmadan etkin alıkonma sağlayabilmesidir. Böylece karma mod kolonlar, kütle spektrometresi (MS) gibi dedeksiyon sistemleriyle daha uyumlu hale gelir. Modern karma mod sabit fazlar genellikle tek bir ligand yapısı içerisinde hem hidrofobik zincirleri hem de anyon/katyon değişim gruplarını içerir; bu da hem nötr hem de yüklü analitlerin aynı koşullarda ayrımını mümkün kılar (Fukushima et al., 2024; Wan, 2021). MMC sabit fazlarının tasarımları Tip I–IV şeklinde sınıflandırılır; bu sınıflandırma, farklı ligandların

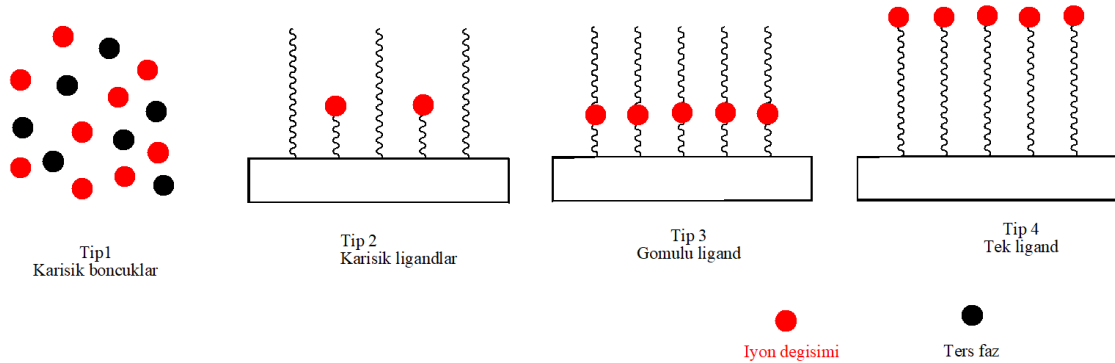
fiziksel karışımı, yüzey modifikasyonu veya gömülü/uçta fonksiyonel grup taşıma biçimlerine göre yapılır (Nguyen, 2022)

Tip I’de tek bir kolonda harmanlanmış iki farklı sabit faz görülmektedir. Burada ters faz siyah ile iyon değişimi ise kırmızı renk ile gösterilmiştir. Bu yaklaşım sabit fazların homojen olmaması ve kolonların partiler arası tekrarlanabilirliğinin düşük olması sebebiyle dezavantajlıdır.

Tip II’de sabit fazın yüzeyinin farklı kimyasal özelliklere sahip ligand karışımı ile modifiye edildiği görülmektedir. Tip I’deki dezavantajlar burada da benzerdir.

Tip III Gömülü ve Tip IV Uçlu ligandlarda sabit faz hem homojenliğini geliştirmiştir hemde tekrarlanabilir durumdadır.

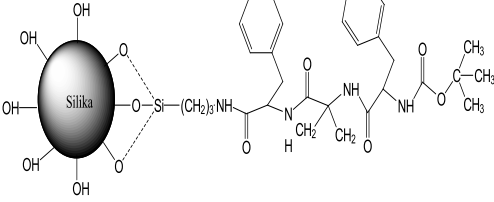
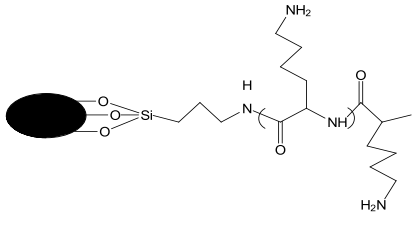
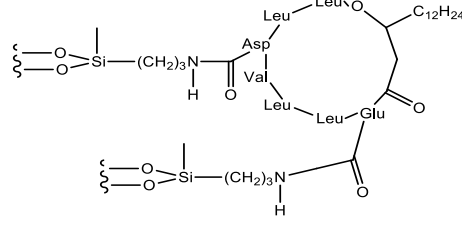
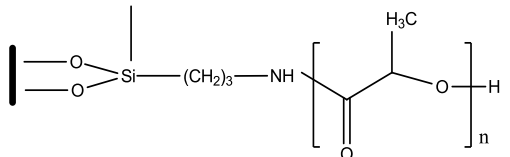
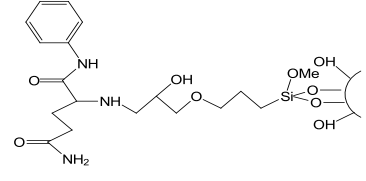
Tip III ve Tip IV’ün Gömülü ligandlarda fonksiyonel gruplar sabit faz yüzeyine yakın yer alırken hidrofobik zincirler dışa uzanır; uçtan fonksiyonlandırılmış ligandlarda ise fonksiyonel gruplar hidrofobik zincirin uç kısmında yer alarak doğrudan hareketli fazla etkileşir. (Nguyen, 2022).



Şekil 1. 3 Kimya tasarımlarına göre sınıflandırılan karma modlu sabit faz türleri

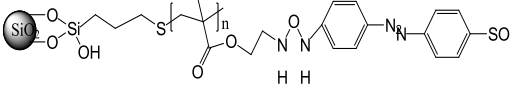
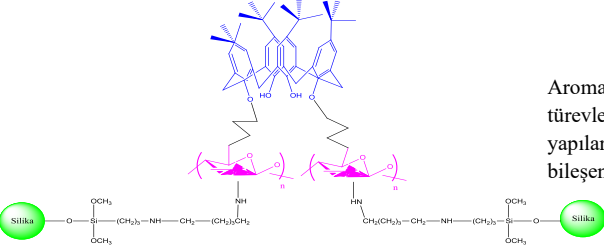
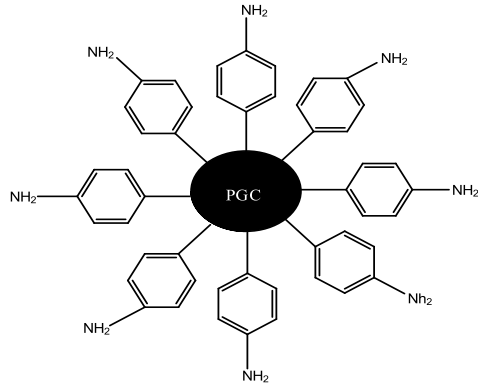
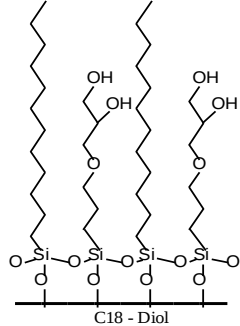
Aral (2013) tarafından geliştirilen amid-silika türevli sabit fazlar da karma mod karakteri taşımaktadır. Bu fazlar, amid gruplarının sağladığı hidrojen bağları ve dipol-dipol etkileşimlerin yanı sıra fenil gruplar ile aromatik etkileşimler oluşturarak hem HILIC hem de ters faz etkisi göstermektedir. Bu yapı, özellikle biyojenik aminler, nükleotidler ve polifenoller gibi zor ayrılan polar bileşiklerin etkin şekilde ayırımına olanak sağlamaktadır (Aral, 2013).

Çizelge 1. 1 RPLC/HILIC davranışı gösteren karma mod sabit faz örnekleri (Zhang et al., 2016)

Sabit faz Tipi	Fonksiyonel Özellikler	Hedef Bileşikler	Teorik Plaka Sayısı (N)	Kaynak
Peptid bağlı silika(Boc- Phe-Aib- Phe-OH)		PAH, kiral bileşikler, nükleotid türevleri, kükürtlü ilaçlar	Yaklaşık 53.000 teorik plaka (adenozin)	□
Poli-L-lisin Modifikasy onlu Sabit Faz		Fenolik türevler, aromatik aminler, polar analitler	-	-
Surfaktin Bağlı Silika Faz		Alkilbenzenler, nükleik asitler, nükleozitler, vitaminler, ksantinler	Polar analitler için 2.300–11.000 teorik plaka	□
Poli-Laktik Asit Fonksiyonlu Sabit Faz		Aromatik hidrokarbonlar, nükleik bileşikler, vitamin türevleri, ksantin yapılar	-	□
Amid silika tabanlı sabit faz		Nükleik bileşikler, bitki hormonları, fenolik yapılar		□

(Devamı bir sonraki sayfada)

Çizelge 1. 1 (Devamı) RPLC/HILIC davranışı gösteren karma mod sabit faz örnekleri (Zhang et al., 2016)

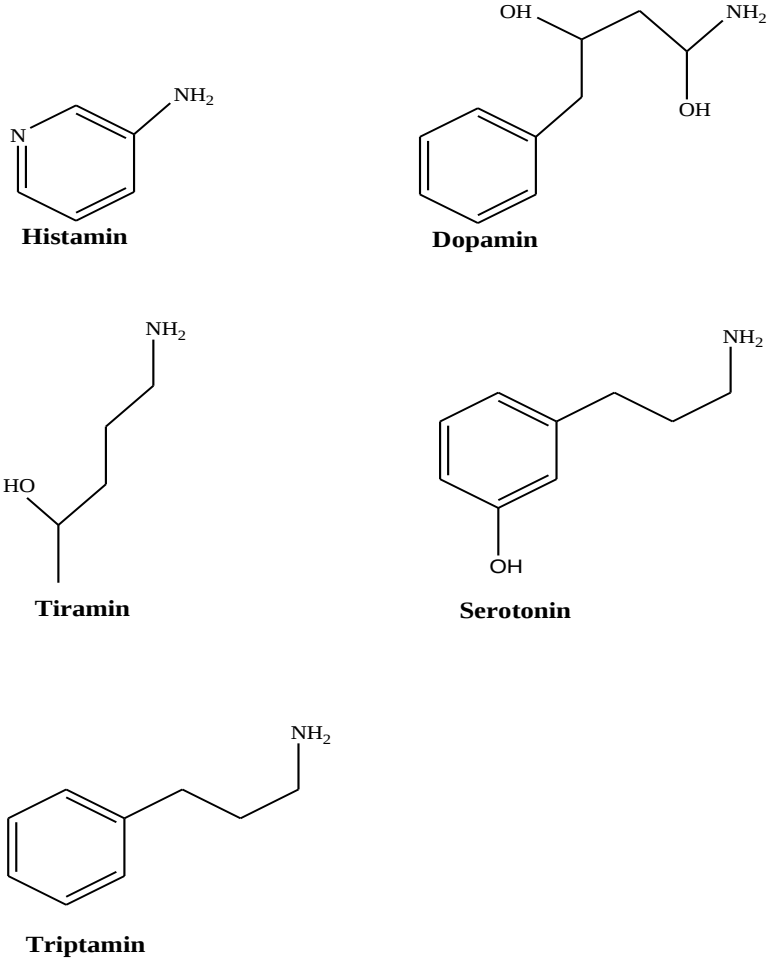
Sabit faz Tipi	Fonksiyonel Özellikler	Hedef Bileşikler	Teorik Plaka Sayısı (N)	Kaynak
Sülfonik Azobenzen Fonksiyonlu Silika Faz		Steroidler, flavonoid yapılar, nükleik türevler, ginsenositler	-	[1]
Calix[4]Aren -Kitosan Kaplı Silika Faz		Aromatik türevler, fenolik yapılar, nükleik bileşenler	-	[2]
Anilin Modifikasyo nlu PGC Faz		Fenoller, nükleobazlar, karboksilik asitler, temel ilaçlar	-	[3]
Cis-Diol Türevli Silika Sabit Faz		Nonsteroidal anti-inflamatuv ar ilaçlar, Tanaka test karışımı, nükleositler, nükleobazlar, temel ilaçlar, <i>L. japonica</i> karışımı	-	[4]

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyojenik Aminlerin Oluşum Mekanizmaları

Biyojenik aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu ya da keton bileşiklerinin aminasyon ve transaminasyonu gibi metabolik yollar sonucunda oluşan azotlu organik bileşiklerdir (Maijala et al., 1993). Örneğin, histidin dekarboksilaz enzimi histidinden histamin üretirken, tirozin dekarboksilaz ise tirozin ve fenilalanini substrat olarak kullanarak tiramin ve feniletilamin sentezler (Linares et al., 2012; Doeun et al., 2017). Bu aminler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal hücrelerde bulunmakta ve nörotransmisyon, hücresel büyüme, bağışıklık yanıtı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Aynı zamanda birçok gıdada, özellikle de fermantasyona uğramış ürünlerde doğal olarak oluşurlar. Putresin gibi bazı aminler ise hem ornitin dekarboksilasyonu hem de lizin ve arginininden türeyen agmatin yoluyla sentezlenebilir (Ladero et al., 2010; Frontiers in Microbiology, 2016).

Biyojenik amin oluşumu, çevresel ve teknolojik faktörlerden büyük ölçüde etkilenir. Düşük pH, 20–37 °C arası sıcaklık, tuz konsantrasyonu, redoks potansiyeli ve starter kültür kullanımı, amin üretimini doğrudan etkileyen parametrelerdir (Linares et al., 2012; NCBI, 2020). Ayrıca mikroorganizmalar, çevresel streslere karşı adaptasyon sağlamak amacıyla dekarboksilasyon mekanizmasını kullanarak amin üretimini artırabilir. Bu tepkimeler, özellikle asidik ortam koşullarında hücre içi pH'ı dengelemek için aktive edilir (Heliyon, 2024).



Şekil 2. 1 Biyojenik amin çeşitleri ve kimyasal yapıları (Toy 2010)

2.2. Biyojenik Aminlerin Toksikolojik Etkileri

Biyojenik aminlerin oluşumu ile ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılması, gıda güvenliği açısından büyük önem taşır. Bazı çalışmalarda biyojenik aminlerin sadece toksik etkilere değil, aynı zamanda raf ömrü ve bozulma göstergesi olarak da değerlendirilebileceği belirtilmiştir (van Nuijs et al., 2011; Aral et al., 2013). Bu yönüyle biyojenik aminlerin izlenmesi yalnızca sağlık açısından değil, kalite kontrol bağlamında da büyük önem taşımaktadır.

Histamin, özellikle skombroid balık zehirlenmesinin başlıca nedeni olarak kabul edilir; bu zehirlenme kızarma, mide bulantısı, baş ağrısı ve bronkokonstriksiyon gibi semptomlarla kendini gösterir (Leuschner et al., 2013; Taylor, 1983). Histaminin toksik dozunun, sağlıklı bireylerde 50 mg'ın üzerinde semptom oluşturabileceği, hassas bireylerde ise bu sınırın 10 mg kadar düşük olabileceği belirtilmiştir (Linares et al., 2012).

Tiramin, sinir uçlarından norepinefrin salınımını artırarak hipertansiyona neden olabilir; özellikle monoamin oksidaz inhibitörü (MAOI) kullanan bireylerde "peynir reaksiyonu" olarak bilinen ani ve tehlikeli kan basıncı yükselmesi riski oluşturur (Doeun et al., 2017).

Triptamin ise serotonin benzeri bir yapıya sahip olup, serotonin reseptörleri üzerinde etkili olarak huzursuzluk, taşikardi ve hipertansiyon gibi semptomlara yol açabilir (Halász et al., 1994). Ayrıca putresin ve kadaverin gibi poliaminlerin, histaminin detoksifikasyonunu engelleyerek toksik etkilerini artırabileceği gösterilmiştir (Silla-Santos, 1996). Biyojenik aminlerin birlikte bulunması durumunda sinerjik toksisite riski artmakta ve bu durum özellikle fermente gıdalarda önemli bir gıda güvenliği sorunu haline gelmektedir (EFSA, 2011; Schirone et al., 2016).

2.3. Biyojenik Aminlerin Analitik Yöntemlerle Tayini

HPLC yöntemi ile peynirde biyojenik amin düzeyleri etkili bir biçimde belirlenebilir. HPLC farklı amin çeşitlerinin ayrılmasında yüksek hassasiyete sahip ve kantitatif analiz yapma fırsatı sunmaktadır. (Silla Santos, 1996; Schirone ve ark., 2016).

Hernández-Jover ve arkadaşlarına (1997) göre, biyojenik aminlerin gıdalardaki tayininde yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile o-ftalaldehit (OPA) kullanılarak yapılan post-kolondan türevlendirme işlemi, aminlerin floresan özellik kazanmasını sağlamakta ve böylece analiz duyarlılığını önemli ölçüde artırmaktadır. OPA türevlendirmesi ise özellikle monoaminlerin hızlı ve kantitatif analizinde tercih edilir; bazen siklodekstrin kompleksleriyle stabil hale getirilerek LOD/LOQ seviyeleri önemli ölçüde düşürülür (Šmělá ve ark., 2004) .

Biyojenik aminlerin türevlendirilmesinde etkili başka bir ajan ise dansil klorürdür. Dansil klorür primer amin gruplarıyla tepkimeye girerek sabit floresan türevler oluşturmaktadır. Yapılan türevlendirme sayesinde biyojenik amin tayini etkili ve hassas şekilde gerçekleşmektedir. (Ahmad & Saad, 2019; Švecová & Janovská, 2021).

Biyojenik aminler, düşük uçuculukları ve doğal kromofor/floresan grubu taşımamaları nedeniyle genellikle ön türevlendirme (örneğin dansil klorür, o-ftalaldehit (OPA), benzoyl klorür) ile ölçülebilir hale getirilir (Linares et al., 2012; Doeun et al., 2017). Ancak bu yöntemler genellikle zaman alıcıdır, reaktif stabilitesi ve ek maliyet gibi dezavantajlar taşır. Bu sınırlamaları aşmak için geliştirilen bazı yöntemlerde türevlendirme yapılmaksızın doğrudan HPLC ayrımı uygulanmıştır. Özellikle iyon

eşleme sıvı kromatografisi (IP-LC) ve iyon kromatografi (IC) sistemleri ile biyojenik aminler doğal halleriyle UV veya iletkenlik dedektörü ile tespit edilebilmektedir.

Örneğin, Yurchenko et al. (2021), süt ve süt ürünlerinde türevlendirme yapılmadan iyon eşleme HPLC ile histamin, tiramin, kadaverin gibi aminleri başarıyla ayırtmış ve yöntem doğrulama sonuçları türevlendirilmiş sistemlerle kıyaslanabilir düzeyde bulunmuştur. Benzer şekilde, Poyraz et al. (2020), peynir örneklerinde derivatizasyon uygulanmaksızın HPLC-UV sistemi ile biyojenik aminlerin doğrudan ayrımını gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalarda, kolonda kullanılan iyon eşleyici maddelerin (örneğin heptan sülfonik asit) ve mobil faz pH'sının aminlerin alıkonmasına etkisi vurgulanmaktadır.

Sonuç olarak, türevlendirme yapılmaksızın biyojenik amin tayini, özellikle hızlı tarama testleri veya yüksek örnek sayısına sahip analizlerde avantaj sağlayabilir; ancak algılama limiti açısından türevlendirme yapılan sistemlerin halen daha hassas olduğu kabul edilmektedir (Santos et al., 2020; Švecová & Janovská, 2021).

2.4. Amaç ve Kapsam

Farklı sabit fazların HPLC uygulamaları çalışılırken her bir analit sınıfı için farklı bir sabit faza ihtiyaç duyulur. Örneğin Normal Faz sabit fazlar polar analit sınıflarının ayrılmasında, ters faz sabit fazlar apolar ve/veya düşük polariteli analit sınıflarının ayrılmasında, HILIC sabit fazları ise yüksek polariteye sahip analit sınıflarının ayrılmasında kullanılır. Oysa karma mod kromatografi, polar, apolar ve orta polarlıktaki analit sınıflarının tek bir kolon ile ayrımına olanak tanır. Karma-mod kromatografik sabit fazların gelişimi henüz çok yeni bir alan olup bu alandaki yeni geliştirilen sabit fazların sayısı hızla artmaktadır. Ancak karma-mod özelliğine sahip ticari olarak satışta olan kolon sayısı oldukça azdır. Bununla beraber literatür bilgimize göre piyasada mevcut ticari karma-mod kolonların çoğunun çeşitli analit sınıflarına karşı davranışının henüz incelenmediği, üretici firma tarafından sadece yapısındaki polar ve apolar gruplara bakarak hangi analit sınıflarını ayırabileceği hakkında öngöründe bulunulduğu görülür. Bu bağlamda ticari olarak mevcut birçok karma-mod kolonun çeşitli analit sınıflarına karşı kromatografik davranışının incelenmeye ihtiyacı vardır. Bu tez kapsamında ticari olarak satışı mevcut olan C12-diol yapısındaki Mixed-Mode HILIC-1 kolonu kullanılarak biyojenik aminlerin ters faz ve HILIC ayrımı yapılarak çeşitli peynir örneklerinden eş

zamanlı kantitatif tayinleri yapılmış ve bu gıdaların kantitatif tayini için etkili ve alternatif bir metot geliştirilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada bazı biyojenik aminlerin kantitatif tayini ve kromatografik ayrımı amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi ile karma mod (mixed-mode) sabit faz kolonu kullanılmıştır.

Kullanılan cihazlar arasında Agilent 1260 Infinity HPLC sistemi, DAD (Diode Array Detector), gradyan ve izokratik pompa sistemi, otomatik numune enjektörü ve ısı kontrollü kolon fırını bulunmaktadır.

Kromatografik ayırmalarda Thermo Scientific firmasının geliştirdiği Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu (4.6 mm iç çap, 150 mm uzunluk ve 5 µm tanecik boyutu) tercih edilmiştir. Bu kolon, C12 zincirli, hidroksil fonksiyonel grup içeren ve hem HILIC hem de ters faz karakteri taşıyan karma mod sabit faz özelliğine sahiptir. Ancak bu çalışmada, HILIC modunda yeterli alıkonma ve ayırım elde edilemediğinden analizler ters faz koşullarında yürütülmüştür.

Kullanılan kimyasallar arasında HPLC derecesinde asetonitril (ACN), metanol, ≥99.0% saflıkta amonyum format, trikloroasetik asit (TCA) ve Milli-Q sisteminden elde edilmiş saf su yer almaktadır. Analizlerde standart olarak histamin dihidroklorür, tiramin hidroklorür, dopamin hidroklorür, serotonin hidroklorür ve triptamin hidroklorür biyojenik aminleri kullanılmıştır. Kantitatif analizler doğrudan kalibrasyon eğrilerine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Numuneler çeşitli ticari markalara ait peynir türlerinden (tulum, kaşar, Van peyniri vb.) oluşmakta olup analiz öncesinde -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Kullanılan cam ve sarf malzemeleri arasında 0.45 µm PVDF şırınga filtreleri, 1.5 mL oto-sampler vial’leri, santrifüj tüpleri, ultrafiltrasyon tüpleri (Amicon Ultra-4, 5 kDa), cam beherler ve manyetik karıştırıcılar yer almaktadır.

Numune hazırlama sürecinde homojenizasyon işlemleri için Waring Commercial marka Laboratory Blender kullanılmıştır. Bu cihaz, örneklerin etkili bir şekilde parçalanmasını ve karıştırılmasını sağlamıştır. Protein ve diğer büyük moleküllerden arındırma işlemleri için ise AWEL MF 20 model yüksek devirli santrifüj cihazı (Max

13800 rpm, 600 W, Made in France) kullanılmıştır. Numuneler 3500 g'de 1 saat santrifüj edilerek ultrafiltrasyon membranlarından geçirilmiştir.

Veri analizi için Agilent ChemStation yazılımı kullanılmış, yapısal parametreler (LogP, LogD, LogS) için SwissADME gibi cheminformatics araçlarından yararlanılmış, kantitatif yapı-alıkonma ilişkisi (QSRR) hesaplamaları ise Microsoft Excel aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada biyojenik aminlerin tayini için literatürde yaygın olarak uygulanan türevlendirme basamağına gerek duyulmamış; analitlerin doğal formda doğrudan enjeksiyon yöntemiyle analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

Çalışmanın ilk aşamasında Agilent 1260 HPLC DAD dedektörlü sistem kullanılarak, kolonun çeşitli biyojenik aminlere karşı ters faz kromatografisi (RP-HPLC) koşullarındaki davranışı incelenmiştir. Bu amaçla pH optimizasyonu için pH 3–7.5 aralığında, asetonitril oranı %2–90 arasında; tampon derişimi 5–25 mM arasında; sıcaklık 10–50 °C aralığında ve akış hızı 0.5–1.5 mL/dk aralığında sistematik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bir parametre için en uygun koşul belirlenmiş ve sonuçlar grafiksel olarak değerlendirilerek kolonun ayırım mekanizması yorumlanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında aynı kolonun HILIC karakteri test edilmiştir. Ancak HILIC koşullarında herhangi bir anlamlı ayırım elde edilemediğinden, optimizasyon çalışmaları yalnızca ters faz karakterli modda sürdürülmüştür. Bu nedenle tüm kromatografik analizler izokratik RP-HPLC koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Son aşamada, farklı peynir örneklerinde bulunan biyojenik aminlerin eş zamanlı kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Numuneler şırınga filtrasyonu ve ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilmiş ve analitlerin doğal formları doğrudan HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Analizlerde türevlendirme yapılmamış, kantitatif veriler doğrudan kalibrasyon eğrilerine dayalı olarak elde edilmiştir.

3.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Analizlerde kullanılmak üzere farklı pH seviyelerinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlanmış, pH değerleri kalibre edilmiş dijital pH metre yardımıyla ayarlanmış ve filtre edilerek kullanıma sunulmuştur.

Hazırlanan tamponlar, hem mobil faz bileşeni olarak hem de pH optimizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

pH 3 – Amonyum Format/Formik Asit Tamponu (10 mM): 0.63 g amonyum format (NH_4COOH), yaklaşık 500 mL ultra saf suda çözülmüş; çözelti %98'lik formik asit kullanılarak pH 3.00 olacak şekilde ayarlanmıştır. Son hacim 1000 mL'ye ultra saf su 1000 mL'ye ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon, mobil faz bileşimi olarak %5 asetonitril ile karıştırılarak kullanılmıştır.

pH 5.5 – Sodyum Asetat Tamponu (25 mM): 2.05 g sodyum asetat trihidrat, 800 mL ultra saf suda çözülerek, pH 5.5'e %10'luk asetik asit çözeltisi ile ayarlanmıştır. Hacim 1000 mL'ye tamamlanmış ve hazır hale getirilmiştir.

pH 6.5 – Fosfat Tamponu (40 mM): 5.44 g KH_2PO_4 ve gerekli miktarda K_2HPO_4 , 800 mL ultra saf suda çözülerek pH 6.5'e ayarlanmış, ardından hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Bu tampon sistemlerinin her biri, sabit faz ile analitler arasındaki iyonik ve polar etkileşimleri modüle ederek, karma mod kromatografide seçicilik ve ayırım gücünü optimize etmek amacıyla kullanılmıştır.

3.4. Numune Hazırlama (Ekstraksiyon İşlemi)

Peynir örneklerinden biyojenik aminlerin ekstraksiyonu amacıyla her bir numuneden 1 gram alınmış ve 10 mL %0.1 M HCl içinde çözülmüş %0.2 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi, yüksek hızlı Ultra-Turrax (OMNI International, USA) cihazı kullanılarak 20.000 rpm'de 2 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

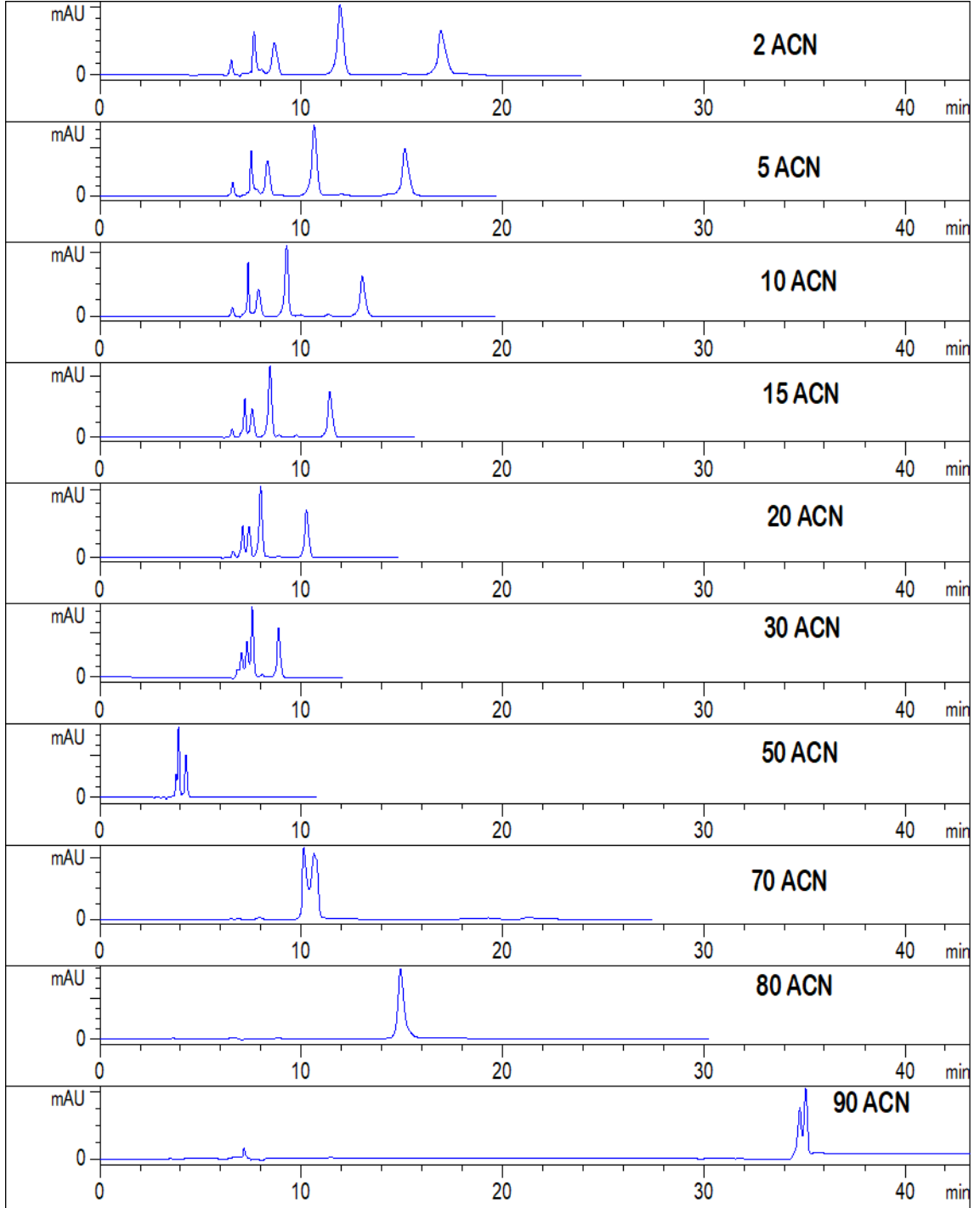
Elde edilen homojen karışım, 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından 5000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan yağ tabakası uzaklaştırılmış ve süpernatant, 0.45 μm por çapına sahip PVDF şırınga filtresi ile süzülmüştür.

Filtrasyondan elde edilen yaklaşık 3 mL'lik örnek, protein içeriğinden arındırılmak amacıyla Amicon Ultra-4 Biomax 5 kDa ultrafiltrasyon tüplerine aktarılmış ve 3500 g'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan örnekler, herhangi bir türevlendirme işlemine tabi tutulmadan doğrudan HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu yöntem sayesinde hem örnek hazırlama süresi kısaltılmış hem de türevlendirme reaktiflerinin kullanımına gerek kalmamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çözücü Optimizasyonu



Şartlar: ACN/TAMPON (pH:3, 10 mM, Amonyumformat Tamponu): 0.5 mL/dk., 10 oC, 5 µL/100 ppm, 230 nm, 1: Histamin, 2: Dopamin, 3: Tiramin, 4: Serotonin, 5: Triptamin

Mobil fazdaki organik çözücü oranı, özellikle asetonitril (ACN) içeriği, analitlerin alıkonma mekanizmasını modüle etmede kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, ACN oranı %2 ile %90 (v/v) arasında sistematik olarak değiştirilmiş ve Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu kullanılarak beş model biyojenik aminin (histamin, dopamin, tiramin, serotonin ve triptamin) ayrılma davranışı üzerindeki etkisi izokratik koşullarda değerlendirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda; mobil faz olarak %ACN ve 10 mM amonyum format (pH 3) karışımı kullanılmış, analizler 0.5 mL/dk akış hızı, 10 °C kolon sıcaklığı ve 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

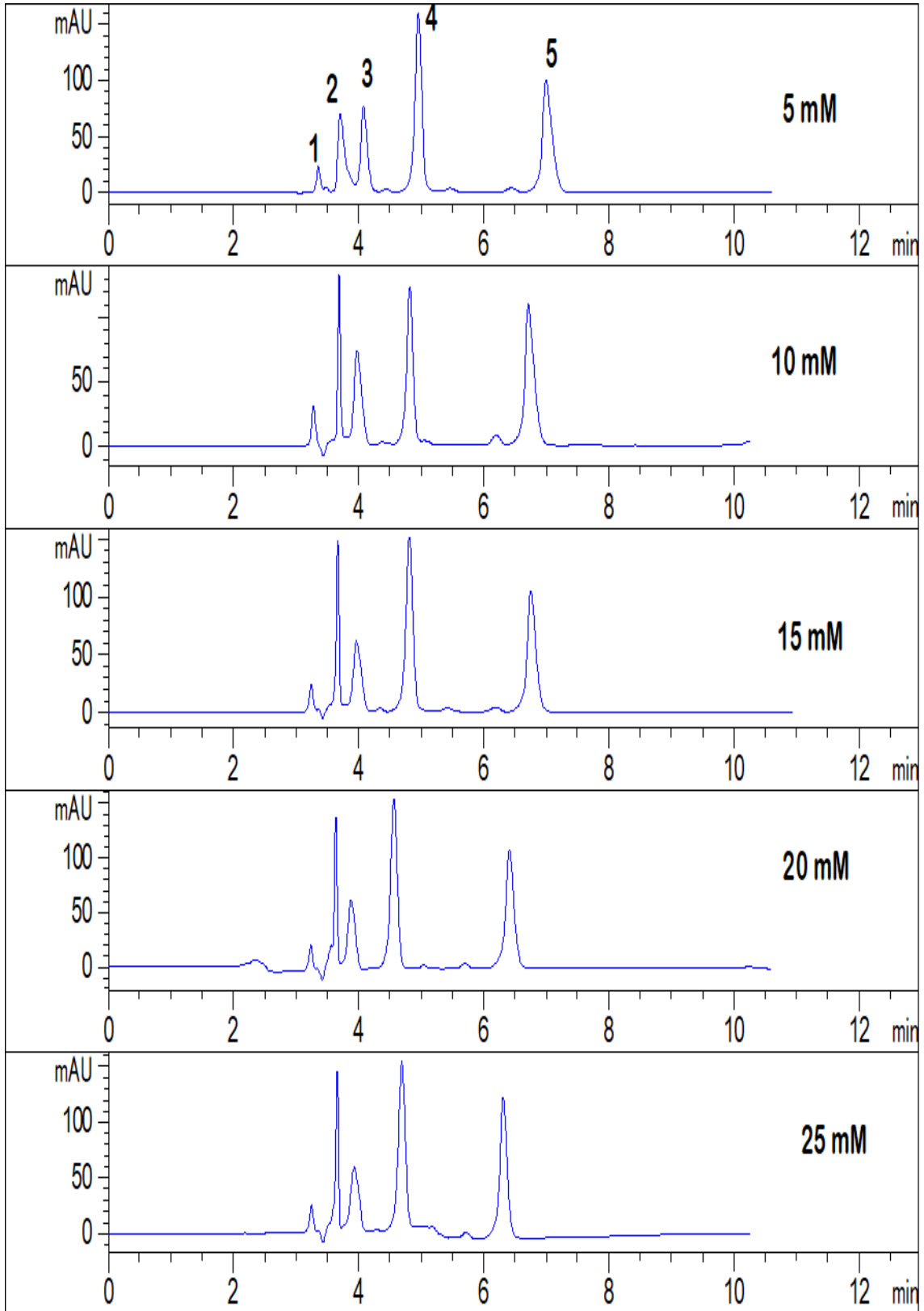
Düşük ACN oranlarında (%2–10), tüm aminlerin baseline ayrımı ile başarıyla ayrılmıştır. Bu durum, analitler ile sabit faz arasındaki hidrofilik ve elektrostatik etkileşimlerin kuvvetlenmesiyle açıklanabilir. Bu koşullarda, sabit faz yüzeyinde yer alan polar hidroksil grupları ve iyonlaşabilir fonksiyonel gruplar, protonlanmış aminlerle güçlü hidrojen bağları ve iyon değişim etkileşimleri kurarak ayrımı desteklemektedir. Bu gözlem, benzer karma mod HILIC sistemleri için daha önce literatürde de bildirilmiştir (Dinh ve ark., 2020; Yu ve ark., 2016).

En iyi kromatografik performans %5–10 ACN oranında elde edilmiş; bu aralıkta optimal alıkonma süreleri ve pik şekilleri gözlenmiştir. ACN oranı %15’in üzerine çıktığında, pik çözünürlüğü kademeli olarak azalmış ve pik örtüşmeleri belirgin hale gelmiştir. Bu eğilim, mobil fazın dielektrik sabitinin azalması ve bunun sonucunda iyonik ve polar etkileşimlerin bastırılması ile açıklanabilir; bu da mekanizmanın ters faz karakterine doğru kaymasına yol açmaktadır (McCalley, 2007).

ACN oranı %30’un üzerine çıktığında, ayırım ciddi şekilde bozulmuş ve yalnızca geniş, örtüşen veya ayrılmamış sinyaller gözlenmiştir. Özellikle %70–90 ACN oranlarında, alıkonma minimum düzeye inmiş ya da tamamen kaybolmuştur. Bu durum, HILIC seçiciliğinin kaybolduğunu ve polar bazik bileşikler için etkisiz olan hidrofobik etkileşimlerin baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu gözlem, özellikle zwitteriyonik veya karma mod sabit fazlar kullanıldığında, HILIC alıkonmanın mobil faz bileşimine son derece bağımlı olduğunu vurgulayan önceki çalışmalara da uygundur (Hemström & Irgum, 2006; Jandera, 2011).

Bu bulgular, orta düzeyde bir ACN içeriğinin (%5–10) HILIC ve iyon değişim mekanizmaları arasında en iyi dengeyi sağladığını ve Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonunun benzersiz çift modlu davranışını desteklediğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu nedenle, sonraki tüm analizlerde bu ACN aralığı optimum koşul olarak seçilmiştir.

4.2. Tampon Konsantrasyonu Optimizasyonu



Şartlar: ACN/TAMPON (pH:3, Amonyumformat Tamponu): 5/95, 1 mL/dk., 10 oC, 5 μ L/100 ppm, 230 nm, 1: Histamin, 2: Dopamin, 3: Tiramın, 4: Serotonin, 5: Triptamin

Mobil fazdaki tampon tuzunun konsantrasyonu, karma mod HILIC sistemlerinde hem elektrostatik etkileşimler hem de pik şekilleri üzerinde önemli etkiler yaratabilmektedir. Bu çalışmada, amonyum format konsantrasyonu 5 ile 25 mM arasında sistematik olarak değiştirilerek histamin, dopamin, tiramin, serotonin ve triptaminin ayrılma performansı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mobil faz ACN/amonyum format tamponu (5:95, v/v, pH 3) içerirken, diğer analiz koşulları 1.0 mL/dk akış hızı, 10 °C sıcaklık ve 230 nm dedeksiyon dalga boyu olarak sabit tutulmuştur.

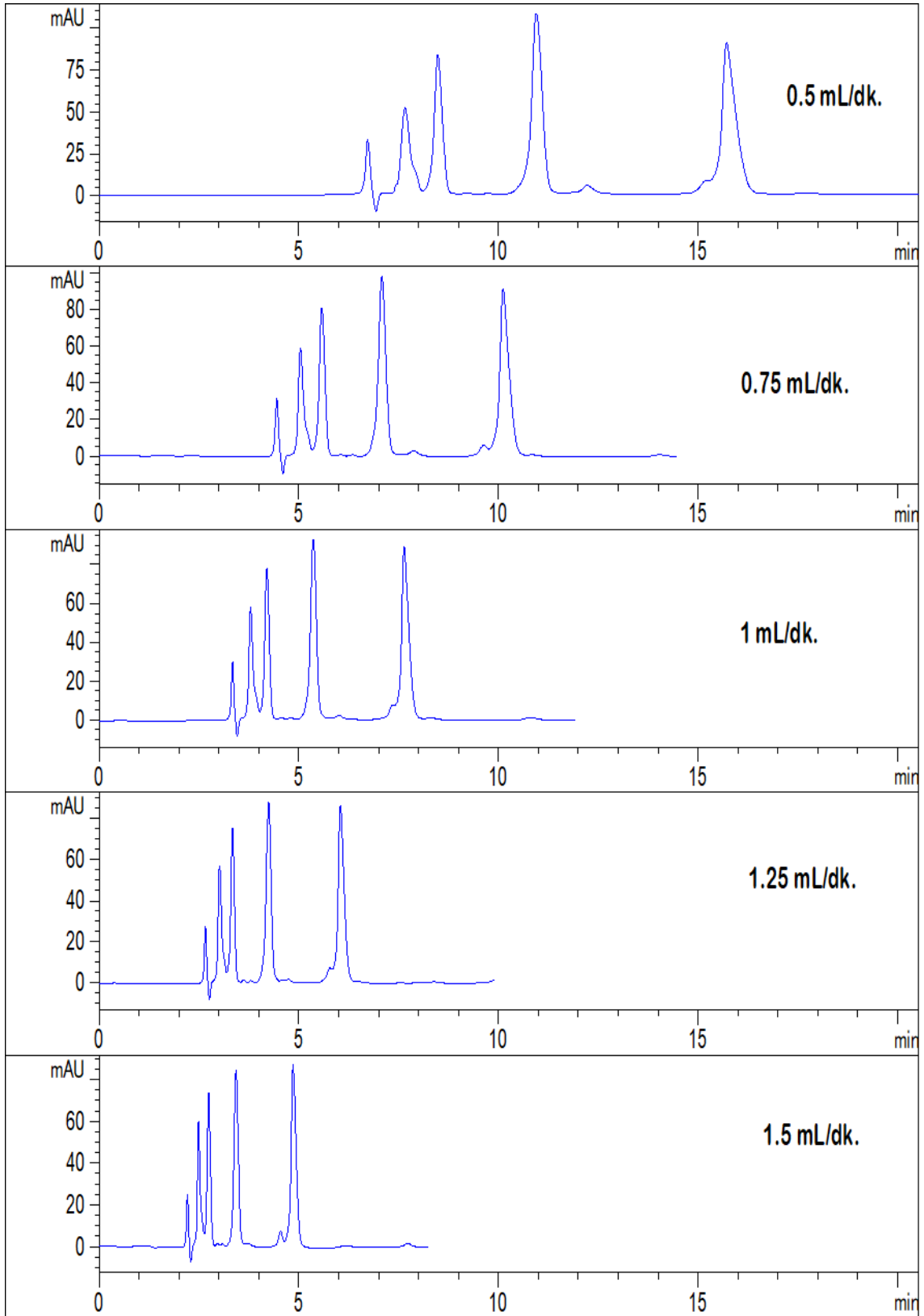
5 mM tampon konsantrasyonunda, tüm analitler başarıyla ayrılmış ve keskin, simetrik pikler gözlemlenmiştir. Bu düşük iyonik güç, protonlanmış aminlerle sabit fazın iyonlaşabilir grupları arasında yeterli elektrostatik etkileşime izin vermektedir. Ancak, histamin ve dopamin piklerinde hafif kuyruklanma görülmesi, iyonik kuvvetin yetersiz kalması durumunda iyon değişim mekanizmasının kararsız hale gelerek seçiciliğin azalabileceğini düşündürmektedir (Hemström & Irgum, 2006).

Tampon konsantrasyonunun 10 mM'ye çıkarılması, genel olarak pik şekli ve çözünürlükte iyileşme sağlamış ve optimum kromatografik koşullar elde edilmiştir. Bu seviyede, elektrostatik etkileşim gücü ile mobil faz iletkenliği arasında bir denge oluşmuştur. Daha iyonik bir ortam, iyon değişim süreçlerinin kararlılığını artırarak alıkonmanın daha tekrarlanabilir olmasını sağlamaktadır; bu durum, amin grubu içeren analitlerle yapılan daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Jandera, 2011).

Daha yüksek konsantrasyonlarda (15–25 mM), alıkonma süreleri bir miktar azalmış olsa da, pik örtüşmeleri artmıştır; özellikle dopamin ve tiramin pikleri ayrılmakta zorlanmıştır. Mobil fazda bulunan fazla miktardaki tampon iyonları, analitlerle sabit faz arasındaki iyon değişim etkileşimlerine rekabet ederek elektrostatik seçiciliği baskılayabilir. Ayrıca, yüksek iyonik kuvvet, sabit faz yüzeyindeki çift katman kalınlığını azaltarak elektrostatik etkileşimlerin zayıflamasına neden olabilir.

Sonuç olarak, 10 mM amonyum format, çözünürlük, pik simetrisi ve alıkonma süresi açısından en uygun dengeyi sağlayarak sonraki analizler için ideal tampon konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

4.3. Akış Hızı Optimizasyonu



Şartlar: ACN/TAMPON (pH:3, 10 mM Amonyumformat Tamponu): 5/95, 10 oC, 5 µL/100 ppm, 230 nm, 1: Histamin, 2: Dopamin, 3: Tiramin, 4: Serotonin, 5: Triptamin

Kromatografik performans üzerindeki akış hızı etkisi, izokratik koşullarda ACN/10 mM amonyum format tamponu %5 ACN / %95 tampon, pH 3 içeren mobil faz eşliğinde gerçekleştirilen analizlerde, Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu ile değerlendirilmiştir. Çalışmada, akış hızı 0.5 ile 1.5 mL/dk arasında değiştirilmiş; sabit sıcaklık 10 °C’de korunmuş ve analizler 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

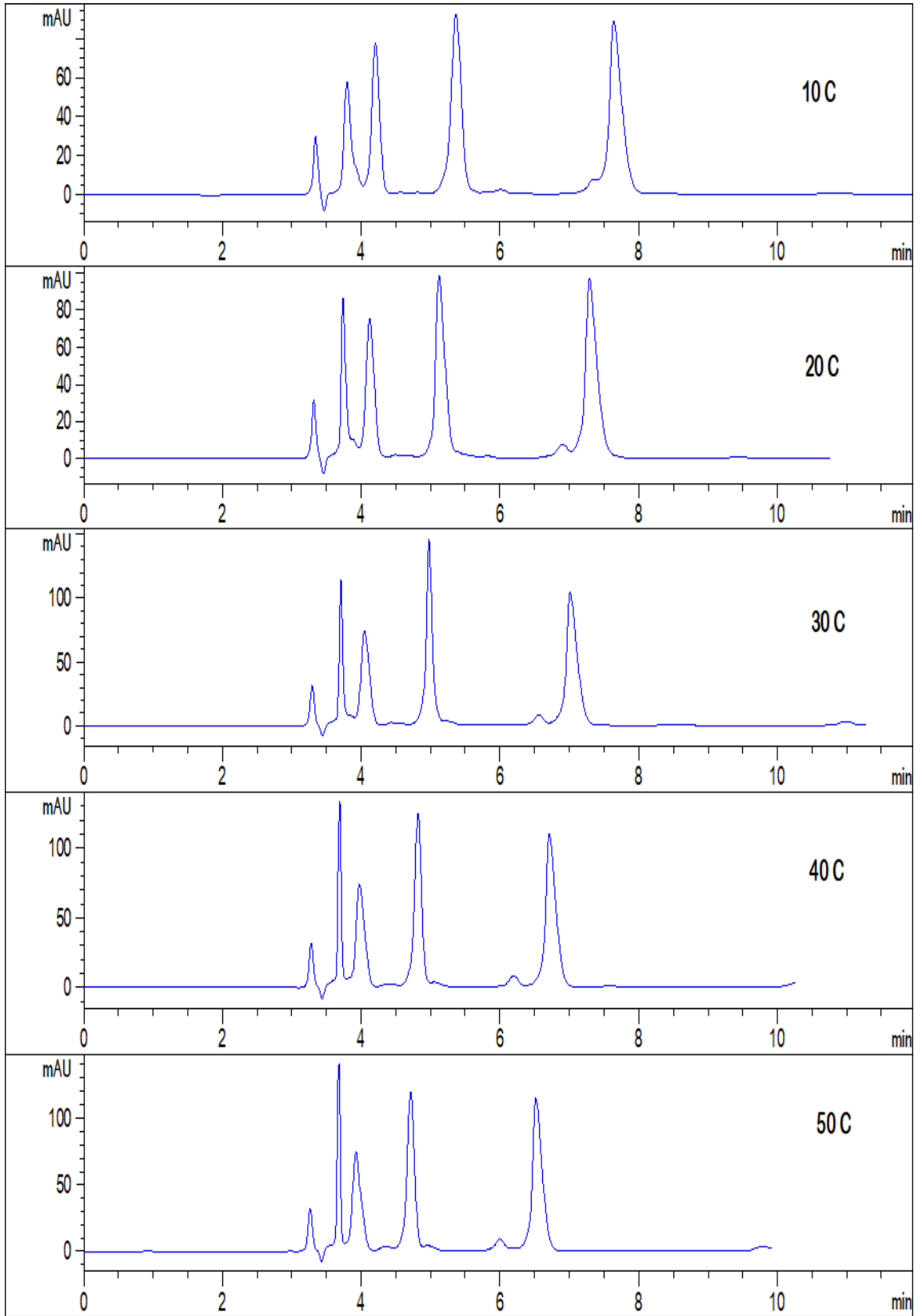
0.5 mL/dk akış hızında, beş biyojenik aminin tamamı başarıyla ayrılmış; ancak alıkonma süreleri görece uzun olmuştur. Bu akış hızında gözlenen yüksek çözünürlük, analitlerin kolondaki kalış süresinin artmasıyla sabit faz ile daha güçlü etkileşimler (hidrojen bağı ve iyonik etkileşimler dahil) kurmasına bağlanmaktadır (Jandera, 2011). Ancak, düşük akış hızında uzunlamasına difüzyonun artması nedeniyle pik genişlemesi gözlenmiştir (Snyder ve ark., 2011).

Akış hızının 0.75 ve 1.0 mL/dk seviyelerine çıkarılması, piklerin daha keskin ve simetrik hale gelmesini sağlamış, çözünürlük ise yeterli düzeyde korunmuştur. Bu değerler arasında, 1.0 mL/dk akış hızı, analiz süresi ile çözünürlük arasında en uygun dengeyi sağlamıştır, analiz süresi ile çözünürlük arasında en uygun dengeyi sağlamıştır. Bu hızda analitlerin sabit faz ve mobil faz arasında etkin bir dengeyle dağılımı sonucunda ideal düzeyde dağılım göstererek seçicilik kaybı olmaksızın ayrılmıştır. Orta düzeydeki bu akış hızı, kinetik olarak elverişli koşullarda kütle transfer direncinin azalmasıyla da ilişkilidir (Zhang ve ark., 2021).

Daha yüksek akış hızlarında, özellikle 1.25 ve 1.5 mL/dk seviyelerinde çözünürlükte belirgin bir azalma gözlenmiştir. Her ne kadar analiz süresi önemli ölçüde kısalmış olsa da, kritik pik çiftlerinin ayrımı bozulmuştur. Bu durum, analitlerin sabit fazla yeterli süre etkileşim kuramadan elüe olması nedeniyle denge koşullarının sağlanamaması ve seçiciliğin zayıflaması ile açıklanabilir. Bu tür davranış, özellikle etkileşim kinetiğinin alıkonmada belirleyici olduğu HILIC ve karma mod sistemlerde tipiktir (Hemström & Irgum, 2006).

Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, 1.0 mL/dk akış hızı, histamin, dopamin, tiramin, serotonin ve triptaminin eşzamanlı ayrımı için en uygun koşul olarak belirlenmiştir. Bu hız, analiz süresini minimumda tutarken yüksek kromatografik çözünürlük sağlayarak yöntemin gerçek örnek analizlerinde etkinliğini artırmaktadır.

4.4. Sıcaklık Optimizasyonu



Şartlar: ACN/TAMPON (pH:3, 10 mM, Amonyumformat Tamponu): 5/95, 1 mL/dk, 5 µL/100 ppm, 230 nm, 1: Histamin, 2: Dopamin, 3: Tiramin, 4: Serotonin, 5: Triptamin

Kolon sıcaklığının biyojenik aminlerin kromatografik davranışı üzerindeki etkisi, Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu kullanılarak 10–50 °C aralığında değerlendirilmiştir. Mobil faz olarak ACN/10 mM amonyum format (5:95, v/v, pH 3) sabit tutulmuş, diğer çalışma koşulları 1.0 mL/dk akış hızı, 5 µL enjeksiyon hacmi (100 ppm) ve 230 nm dedeksiyon dalga boyu olarak belirlenmiştir.

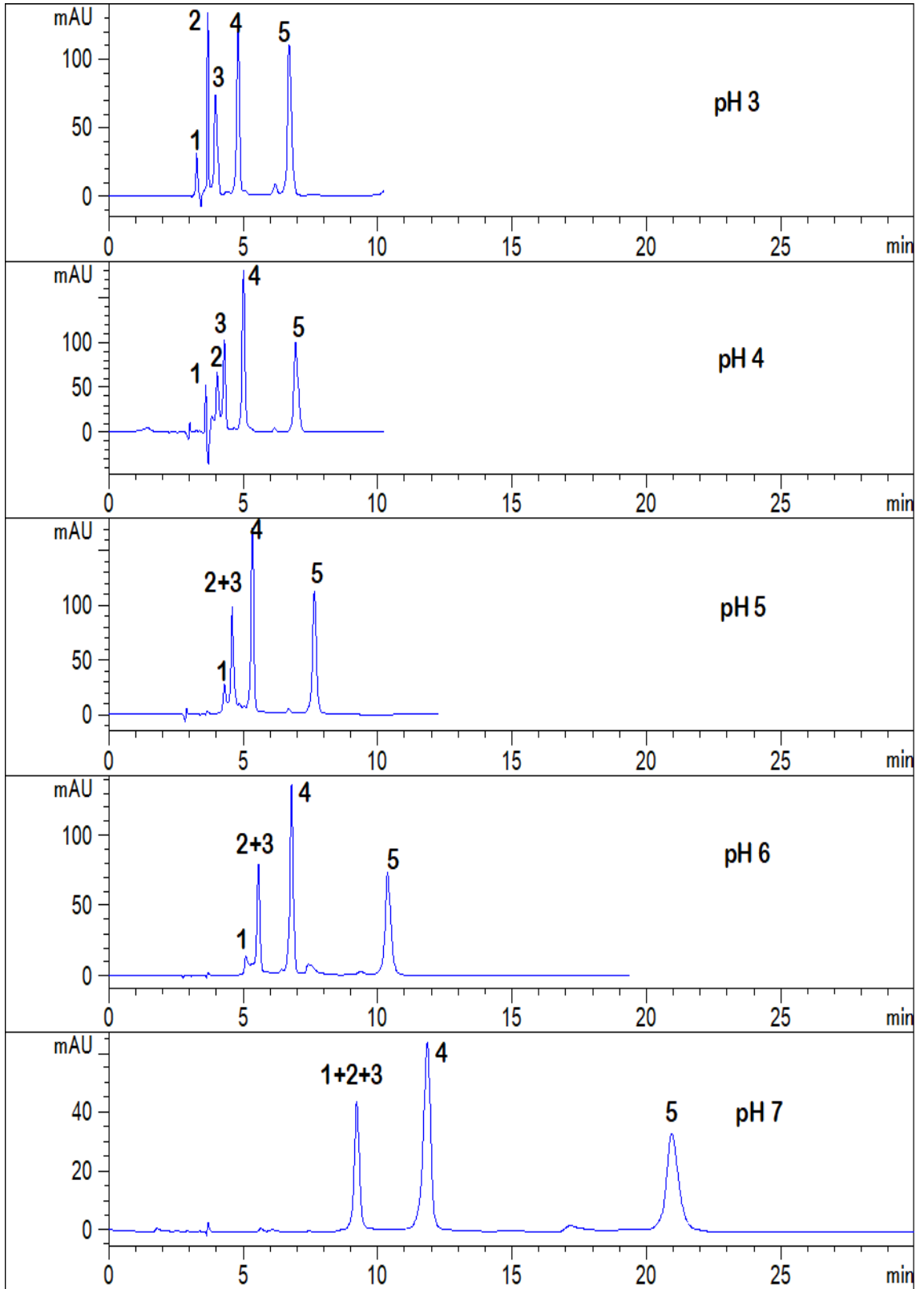
10 °C sıcaklıkta, beş biyojenik aminin tamamı yüksek çözünürlükle ve keskin piklerle ayrılmıştır. Düşük sıcaklık, özellikle protonlanmış analitler ile sabit fazın polar ya da iyonlaşabilir grupları arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimleri artırarak alıkonmayı desteklemiştir. Bu davranış, HILIC mekanizmasının sabit faz ile analit arasındaki etkileşimlere yüksek oranda bağlı olması ile uyumludur (Hemström & Irgum, 2006).

Sıcaklığın 20–30 °C aralığına yükseltilmesiyle birlikte alıkonma süreleri kademeli olarak azalmış, pikler arasındaki mesafe daralmıştır. Bununla birlikte, dopamin/tiramin ve serotonin/triptamin gibi kritik çiftler arasında çözünürlük yeterli düzeyde korunmuştur. Bu sıcaklık aralığında kütle transferi hızlanır ve çözücü viskozitesi azalır; bu da pik şeklini iyileştirebilir ancak etkileşim süresi kısaldığı için seçiciliği düşürebilir (Jandera, 2011).

40–50 °C gibi yüksek sıcaklıklarda, erken elüsyon gösteren bileşiklerin alıkonması belirgin şekilde azalmış ve pikler arasında örtüşme artmıştır. Özellikle polar etkileşimlerin etkinliğinin azalması, yüksek kinetik enerjiye bağlı olarak hidrojen bağlarının zayıflamasıyla açıklanabilir. Ayrıca bu sıcaklıklar, iyon değişim etkileşimlerinin denge durumunu bozarak karma mod sistemlerdeki elektrostatik seçiciliği zayıflatabilir.

Sonuç olarak, 10 °C sıcaklık, tüm biyojenik aminlerin yüksek çözünürlükle ayrılmasını sağlayarak optimum kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

4.5. pH Optimizasyonu



Şartlar: ACN/TAMPON (pH:3, 10 mM, Amonyumformat Tamponu): 5/95, 1 mL/dk., 40 oC, 5 µL/100 ppm, 230 nm, 1: Histamin, 2: Dopamin, 3: Tiramin, 4: Serotonin, 5: Triptamin

Biyojenik aminlerin alıkonma davranışı ve çözünürlüğü, özellikle elektrostatik etkileşimlerin seçicilikte önemli rol oynadığı karma mod HILIC sistemlerinde mobil faz pH'ına büyük ölçüde bağlıdır. Bu çalışmada mobil fazın pH değeri 3.0 ile 7.0 arasında değiştirilmiş, amonyum format tampon konsantrasyonu ise 10 mM düzeyinde sabit tutulmuştur (ACN/tampon = 5:95, v/v). Analizler 10 °C sıcaklıkta, 1.0 mL/dk akış hızı ve 230 nm dedeksiyon dalga boyu ile gerçekleştirilmiştir.

pH 3 koşullarında, beş biyojenik aminin tamamı net şekilde ve baseline ayrımı sağlanacak biçimde elüe olmuştur. Bu asidik ortam, primer ve sekonder amin gruplarının tamamen protonlanmasını sağlayarak bileşiklerin katyonik karakterini artırmakta ve sabit fazın anyonik grupları ile güçlü iyonik etkileşimler kurmalarına olanak tanımaktadır. Ayrıca bu pH seviyesinde hidrojen bağı etkileşimleri de artmakta, bu da yüksek alıkonma ve çözünürlük sağlamaktadır.

pH 4 seviyesinde çözünürlük hâlâ kabul edilebilir düzeyde kalmış ancak alıkonma sürelerinde hafif kaymalar gözlenmiştir. Analitlerin büyük çoğunluğu hâlâ protonlanmış olsa da iyonik etkileşimlerin gücü azalmaya başlamıştır. pH 5 ve 6 seviyelerinde ise çözünürlükte belirgin düşüşler ortaya çıkmış; histamin, dopamin ve tiramin (pik 1–3) birlikte elüe olmaya başlamıştır. Özellikle pH 6'da dopamin ve tiramin pikleri tamamen birleşmiştir. Bu durum, amin gruplarının kademeli olarak deprotonlanmasıyla sabit fazla olan elektrostatik etkileşimlerin zayıflamasına bağlanabilir.

pH 7 seviyesinde yalnızca üç belirgin pik gözlenmiş; histamin, dopamin ve tiramin aynı anda geniş bir pik olarak elüe olmuştur. Aynı zamanda genel alıkonma süresi ciddi ölçüde azalmıştır. Bu sonuç, fizyolojik pH seviyelerinde amin gruplarının nötrleşmesi ve elektrostatik alıkonmanın büyük ölçüde ortadan kalkmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, pH 3, Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu ile biyojenik aminlerin etkili bir şekilde ayrılması için en uygun pH değeri olarak belirlenmiştir. Bu pH koşulunda, analitlerin protonlanmış formda olması, sabit fazla iyon değişimi ve hidrojen bağı etkileşimlerinin maksimum düzeyde gerçekleşmesini sağlamış ve yüksek seçicilik ile çözünürlük elde edilmiştir.

4.6. Biyojenik Aminlerin Ayrılması ve Alıkonması Koşullarının Optimizasyonu

4.6.1. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine mobil fazdaki asetonitril (ACN) yüzdesinin etkisi

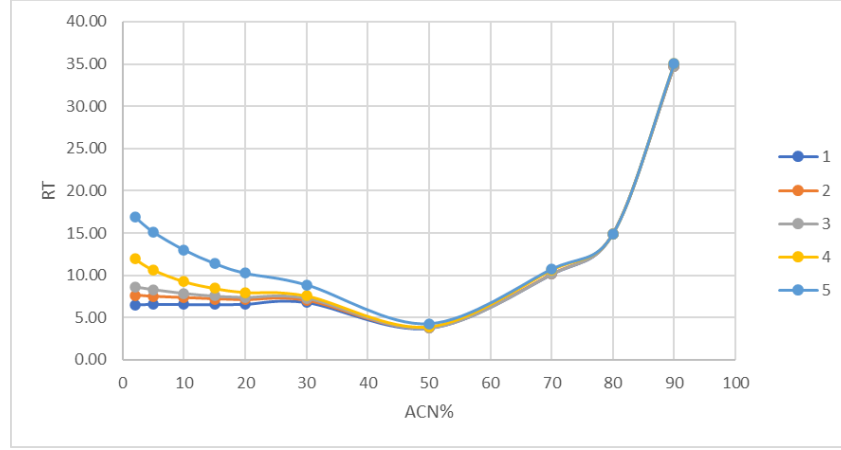
Aşağıda Tablo 4.1’de farklı ACN yüzdelerinde biyojenik aminlerin alıkonma süreleri (dakika cinsinden) gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan mobil fazdaki ACN oranı %2 ila %90 arasında değiştirilerek, C12-hidroksi karma mod kolonun çözücü kompozisyonuna karşı duyarlılığı incelenmiştir.

Çizelge 4. 1 Biyojenik aminlerin farklı ACN yüzdelerinde alıkonma süreleri (dakika)

Biyojenik Aminler	Alıkonma Sırası	ACN %									
		2	5	10	15	20	30	50	70	80	90
Histamin	1	6,54	6,61	6,59	6,57	6,62	6,83	3,78	10,13	14,94	34,77
Dopamin	2	7,66	7,51	7,36	7,21	7,11	7,04	3,78	10,13	14,94	34,77
Tyramin	3	8,66	8,33	7,88	7,56	7,41	7,31	3,78	10,13	14,94	34,77
Serotonin	4	11,93	10,64	9,27	8,45	7,98	7,57	3,92	10,64	14,94	35,06
Tryptamin	5	16,94	15,15	13,03	11,42	10,26	8,88	4,27	10,75	14,94	35,06

Çözücü oranı olarak kullanılan ACN yüzdesi, alıkonma süreleri üzerinde çift yönlü bir etki göstermiştir. Düşük ACN oranlarında (özellikle %2–10), aminler sabit fazda daha uzun süre kalırken, orta oranlarda (%30–50) daha kısa sürede elüe olmuşlardır. Yüksek ACN yüzdelerinde (%70–90), aminlerin tekrar daha uzun süre sabit fazda alıkonduğu gözlemlenmiştir.

Özellikle triptamin, %40 ACN oranında minimum alıkonma süresine (4.27 dk) ulaşmış, ardından %90 ACN’de 35 dakikaya varan alıkonma süresi göstermiştir. Bu eğilim, C12-hidroksi karma mod kolonun çok yönlü etkileşim mekanizmasını ve çözücü bileşiminin ayırım verimliliği üzerindeki kritik rolünü doğrulamaktadır.



Şekil 4. 1 Biyojenik aminlerin ACN yüzdesine göre C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri

4.6.2. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine tampon derişiminin etkisi

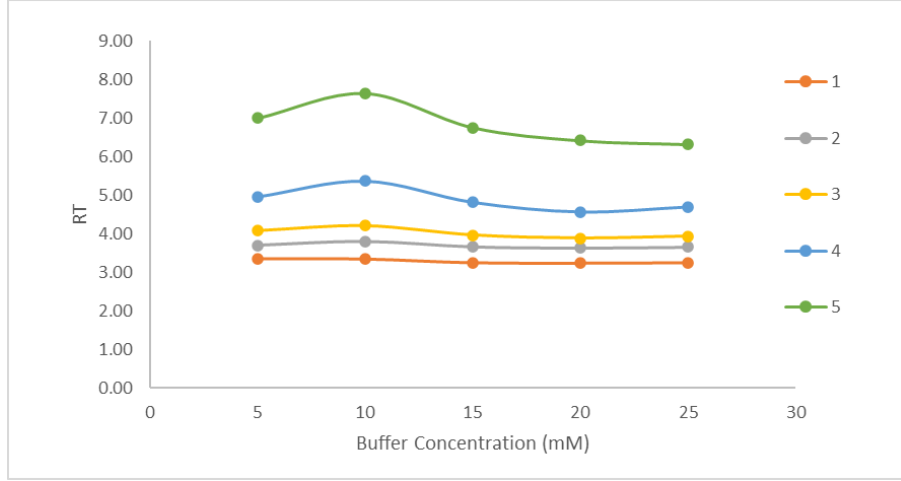
Aşağıda Tablo 4.2’de biyojenik aminlerin farklı tampon derişimlerinde (5–25 mM) ölçülen alıkonma süreleri verilmiştir. Tampon sisteminin iyonik gücü, kolon-sabit faz etkileşimlerini ve özellikle elektrostatik bileşeni etkileyerek ayırım mekanizmasını değiştirmektedir.

Çizelge 4. 2 Biyojenik aminlerin farklı tampon derişimlerinde alıkonma süreleri (dakika)

Amin	Sıra	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM	25 mM
Histamin	1	3.35	3.34	3.24	3.23	3.24
Dopamin	2	3.70	3.79	3.66	3.63	3.65
Tyramin	3	4.07	4.20	3.96	3.88	3.93
Serotonin	4	4.95	5.36	4.81	4.56	4.69
Tryptamin	5	6.99	7.64	6.75	6.41	6.31

Tampon derişimi arttıkça biyojenik aminlerin alıkonma süreleri genel olarak azalma eğilimindedir. Bu durum, sistemde artan iyonik gücün sabit faz ile analitler arasındaki iyonik etkileşimleri baskılamasından kaynaklanmaktadır. Özellikle triptamin ve serotonin gibi bazik karaktere sahip bileşikler bu değişime daha duyarlı davranmıştır.

Karma mod kolonun iyonik ve polar etkileşimleri dengeleme özelliği sayesinde, tampon derişimi analitik performansı doğrudan etkileyen bir parametre olmuştur.



Şekil 4. 2 Biyojenik aminlerin farklı tampon derişimlerinde C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri

4.6.3. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine pH'ın etkisi

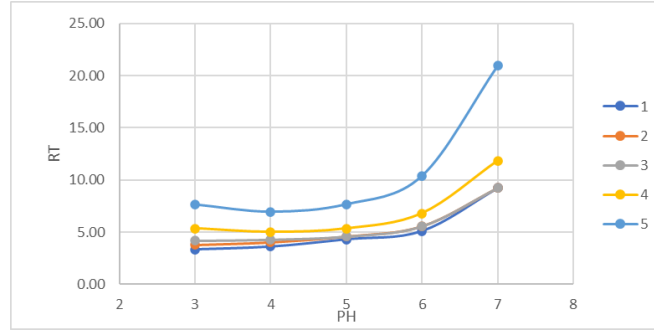
Aşağıda Tablo 4.3'te, C12-hidroksi karma mod kolonda analiz edilen beş biyojenik aminin pH 3 ile pH 7 arasındaki alıkonma süreleri yer almaktadır. Elde edilen veriler, aminlerin sabit faz ile etkileşimlerinin pH'ya bağlı olarak anlamlı şekilde değiştiğini göstermektedir.

Çizelge 4. 3 Biyojenik aminlerin farklı pH değerlerinde alıkonma süreleri (dakika)

Amin	Sıralama	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Histamin	1	3.34	3.61	4.31	5.10	9.22
Dopamin	2	3.79	4.04	4.60	5.57	9.22
Tyramin	3	4.20	4.30	4.60	5.57	9.22
Serotonin	4	5.36	5.01	5.34	6.80	11.85
Tryptamin	5	7.64	6.94	7.65	10.37	20.93

pH'nın artışıyla birlikte biyojenik aminlerin alıkonma süreleri genel olarak artış göstermiştir. Bu durum, analitlerin iyonlaşma derecelerinin azalması ve buna bağlı olarak sabit fazla daha güçlü hidrofobik ve polar etkileşimlere girmeleri ile açıklanabilir. pH 3'te daha kısa sürede elüe olan aminler, pH 7'de daha uzun süre sabit fazda alıkonmuştur. Özellikle triptamin ve serotonin, yüksek pH koşullarında en yüksek alıkonma sürelerini göstermiştir.

Bu eğilim, karma mod sabit fazların çok yönlü (iyonik, hidrojen bağları ve hidrofobik) etkileşimleri desteklediğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, pH optimizasyonu karma mod kolon kullanılarak yapılan biyojenik amin ayrırımlarında kritik rol oynamaktadır.



Şekil 4. 3 Biyojenik aminlerin farklı pH seviyelerinde C12-hidroksi karma mod kolonda alıkonma süreleri

4.6.4. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine akış hızının etkisi

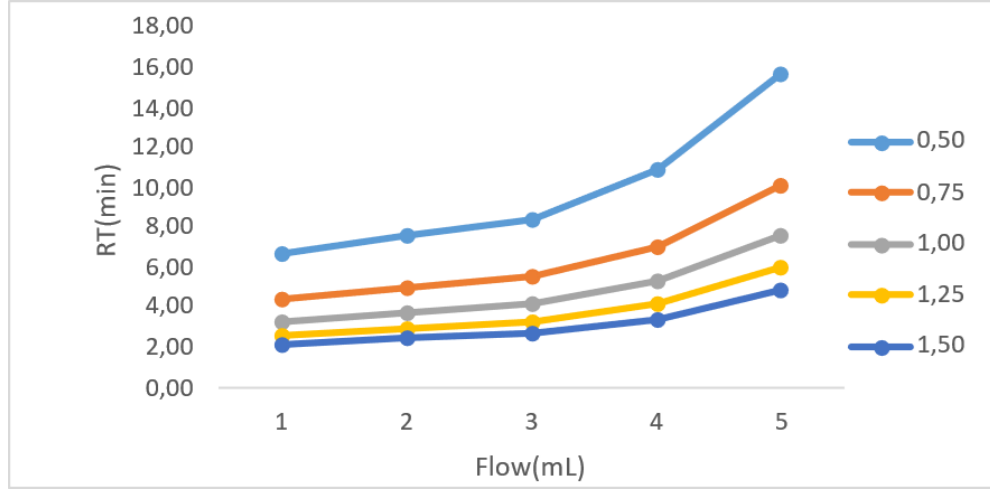
Aşağıda Tablo 4.4'te biyojenik aminlerin farklı akış hızlarındaki (0.50–1.50 mL/dk) alıkonma süreleri gösterilmektedir. Akış hızı, mobil fazın kolon içerisindeki ilerleme süresini doğrudan etkileyen önemli bir parametredir ve dolayısıyla analitlerin sabit faz ile etkileşim süresini kısaltır ya da uzatır.

Çizelge 4. 4 Biyojenik aminlerin farklı akış hızlarında alıkonma süreleri (dakika)

Amin	Sıra	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
Histamin	1	6.72	4.45	3.34	2.66	2.21
Dopamin	2	7.66	5.04	3.79	3.02	2.49
Tyramin	3	8.48	5.58	4.20	3.34	2.75
Serotonin	4	10.95	7.08	5.36	4.24	3.43
Tryptamin	5	15.71	10.11	7.64	6.04	4.86

Akış hızı arttıkça, tüm aminlerin alıkonma süreleri azalmıştır. Bu durum, mobil fazın sabit fazla daha kısa sürede etkileşime girmesine neden olduğu için beklenen bir kromatografik davranıştır. Özellikle triptamin ve serotonin gibi yüksek alıkonma gösteren aminlerde bu düşüş daha belirgindir.

Optimum ayırma verimliliği açısından akış hızının çok düşük veya çok yüksek olmaması gerekir. Bu çalışmada, 1.00 mL/dk civarında akış hızları, hem analiz süresini makul tutmuş hem de iyi ayırım sağlamıştır.



Şekil 4. 4 Farklı akış hızlarında biyojenik aminlerin C12-hidroksi karma mod kolondaki alıkonma süreleri

4.6.5. Biyojenik aminlerin ayrılması ve alıkonması üzerine ve termodinamik parametrelere sıcaklığın etkisi

Aşağıda Tablo 4.5’te biyojenik aminlerin farklı sıcaklıklarda (10–50 °C) alıkonma süreleri ve bunlara ait termodinamik parametreler (entalpi değişimi ΔH° , entropi değişimi ΔS°) verilmiştir. Sıcaklık, analitlerin sabit fazla etkileşim süresini ve şiddetini etkileyerek alıkonma davranışlarını değiştirmektedir.

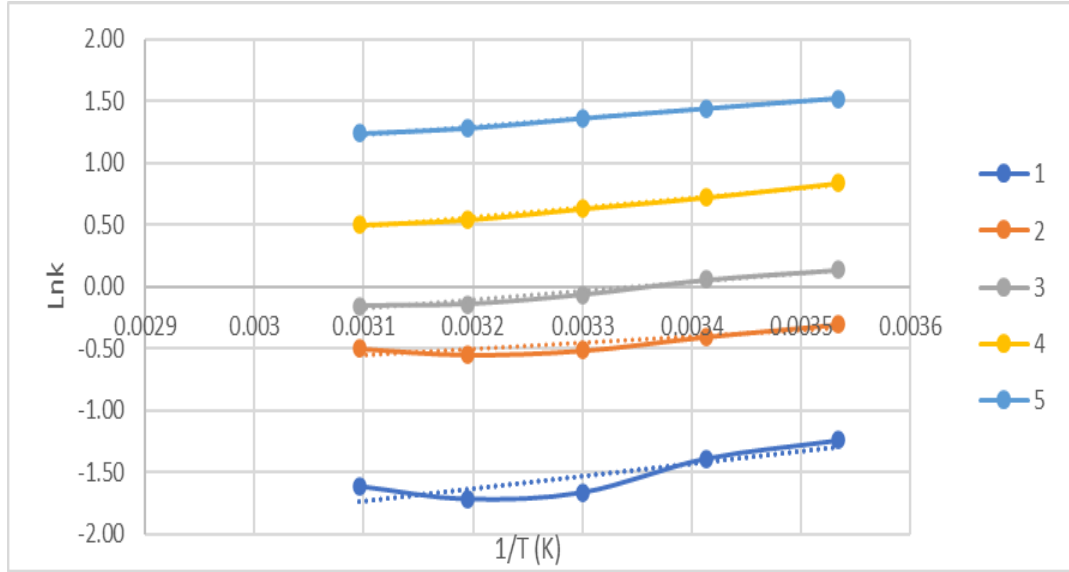
Çizelge 4. 5 Biyojenik aminlerin sıcaklık değişimine göre alıkonma süreleri ve hesaplanan termodinamik parametreler

Amin	Sıra	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol·K)
Histamin	1	3.34	3.31	3.29	3.28	3.26	–65.83	–0.24
Dopamin	2	3.79	3.73	3.70	3.68	3.67	–66.61	–0.21
Tyramin	3	4.20	4.12	4.03	3.94	3.92	–88.26	–0.22
Serotonin	4	5.36	5.12	4.94	4.82	4.71	–67.54	–0.14
Tryptamin	5	7.64	7.29	7.10	6.57	6.52	–98.13	–0.21

Sıcaklığın artışıyla birlikte tüm biyojenik aminlerin alıkonma sürelerinde azalma gözlenmiştir. Bu durum, sabit faz ile analit arasındaki etkileşimin ekzotermik karakterde

olduğunu ve yüksek sıcaklıklarda bu etkileşimin zayıfladığını göstermektedir. Van't Hoff grafikleri kullanılarak hesaplanan ΔH° değerleri negatif olup bu sonucu desteklemektedir.

Ayrıca, ΔS° değerlerinin düşük veya negatif çıkması, alıkonma sırasında sistemin düzensizliğinin azaldığını ya da çok değişmediğini göstermektedir. Karma mod kolonun hem polar hem de apolar etkileşimleri destekleyen yapısı sayesinde, bu sıcaklık değişimlerine karşı ayırım gücü büyük oranda korunmuştur.



Şekil 4. 5 $1/T$ (K^{-1}) – $\ln k$ grafikleri üzerinden biyojenik aminlerin Van't Hoff analizleri

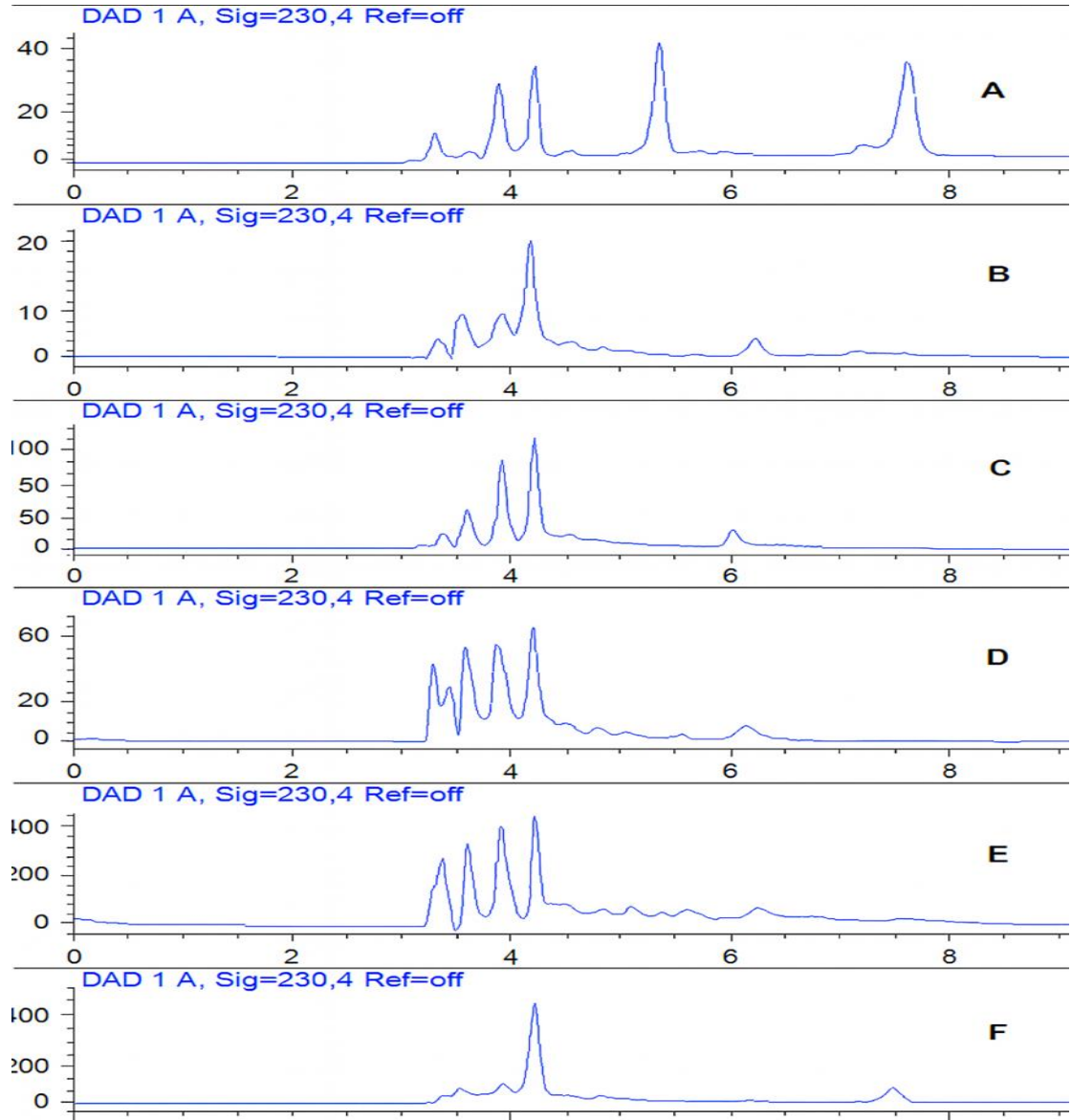
4.7. Kromatografik Bulgular

Bu çalışmada analiz edilen örneklere ait HPLC kromatogramları aşağıda özetlenmiştir. Şekil 4.6.A–F’de sunulan kromatogramlara karşılık gelen biyojenik amin isimleri ve örnek açıklamaları tablo halinde verilmiştir. Analizler DAD dedektörü ile 230 nm UV dalga boyunda gerçekleştirilmiş olup, histamin, dopamin, tiramin, serotonin ve triptamin aminlerinin kantitatif tayini hedeflenmiştir. Tablo 4.6’da sunulan bilgiler, örneklerin hangi kromatograma karşılık geldiğini göstermesi bakımından analiz sonuçlarının bütünlüğünü desteklemektedir.

Çizelge 4. 6 Kromatogramlara ait biyojenik amin bilgileri ve örnek açıklamaları

Şekil No	Biyojenik Amin(ler)	Örnek Açıklaması
A	Histamin, Dopamin, Tiramin, Serotonin, Triptamin	Standart karışım (referans)
B	Histamin, Tiramin	Van beyaz peyniri
C	Histamin, Dopamin, Serotonin	Eski kaşar peyniri
D	Tiramin, Triptamin	Tam yağlı beyaz peynir
E	Histamin, Dopamin, Tiramin	Tulum peyniri
F	Dopamin, Serotonin, Triptamin	Küp peyniri

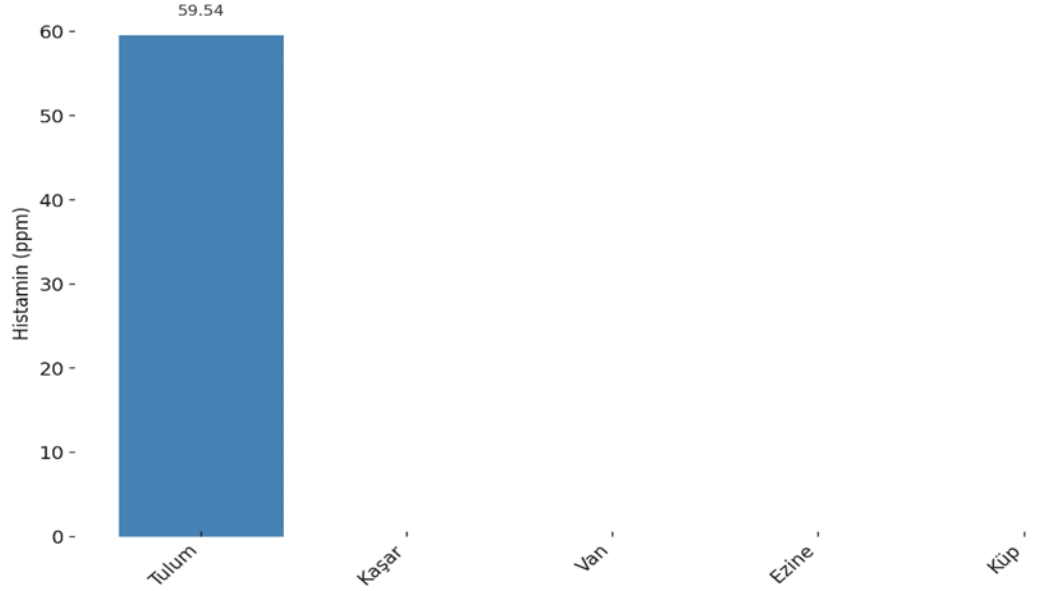
4.7.1. Peynir örneklerinden elde edilen kromatogramlar



Şekil 4. 6 Biyojenik aminlerin HPLC kromatogramları (A–F)

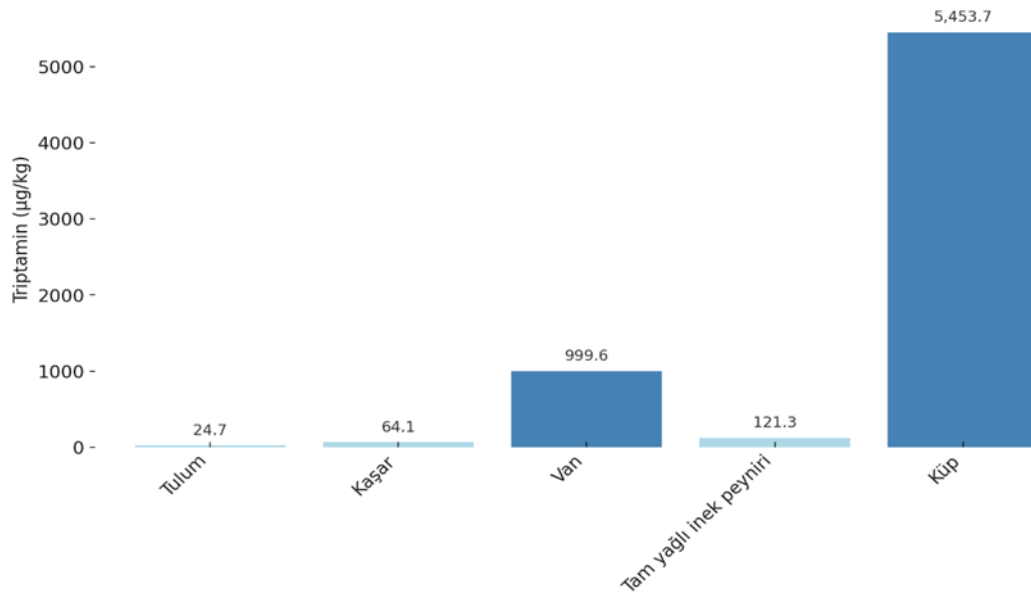
4.8. Biyojenik Aminlerin Kantitatif Tayini

Çizelge 4. 7 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan histamin miktarları (ppm)



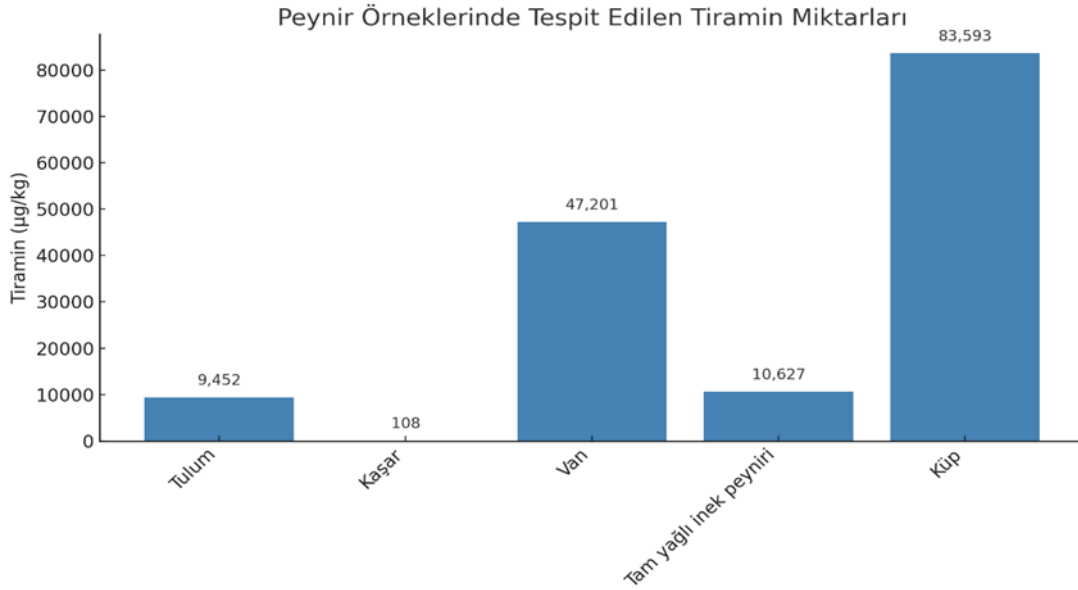
Yalnızca tulum peynirinde histamin başarıyla tespit edilebilmiştir. Diğer örneklerde ise analit pikleri, matriks kaynaklı ekstrakt kirliliği altında kalmıştır. Bu nedenle güvenilir bir tayin gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4. 8 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan triptamin miktarları (ppm)



Grafikte farklı peynir örneklerinde tespit edilen triptamin düzeyleri ($\mu\text{g/kg}$) sade ve anlaşılır bir şekilde sunulmaktadır. Açık mavi renkli çubuklar <1 ppm kalibrasyon aralığında analiz edilen örnekleri temsil ederken, koyu mavi çubuklar >1 ppm aralığına aittir.

Çizelge 4. 9 Farklı peynir örneklerinde tayin edilmeye çalışılan tiramin miktarları (ppm)



Grafikte, her bir peynir örneğinde tespit edilen tiramin miktarları ($\mu\text{g/kg}$) gösterilmektedir. Kaşar peyniri, düşük konsantrasyon nedeniyle ayrı bir kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilmiş ve $108 \mu\text{g/kg}$ seviyesinde tiramin içermektedir. Diğer tüm örnekler daha yüksek kalibrasyon aralığına dayalı olarak analiz edilmiş ve özellikle küp peyniri ile Van peyniri yüksek tiramin düzeyleriyle öne çıkmıştır.

4.8.1. LOD ,LOQ , tekrarlanabilirlik hesaplamaları

Analitik yöntemlerin performans değerlendirmesinde, ölçüm sınırlarının belirlenmesi önemli bir adımdır. Tespit limiti (LOD), bir analitin cihaz tarafından algılanabildiği ancak kantitatif olarak güvenilir biçimde ölçülemediği en düşük seviyeyi tanımlar. Buna karşılık, kantitatif tayin limiti (LOQ), analitin istatistiksel olarak güvenilir biçimde sayısal olarak belirlenebildiği en düşük düzeydir (Shrivastava & Gupta, 2011).

Bu limitlerin hesaplamasında sıklıkla sinyal/gürültü oranı esas alınmakla birlikte, bu çalışmada analitlerin kantitatif yapısal parametreleri ile kolon üzerindeki etkileşimleri arasında istatistiksel bir ilişki kurularak değerlendirme yapılmıştır. QSRR (Quantitative Structure–Retention Relationship) yaklaşımı çerçevesinde, LOD ve LOQ hesaplamalarında kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim (m) ve düşük yoğunluklu standartların standart sapması (σ) kullanılmıştır.

$$\text{LOD} = (3.3 \times \sigma) / m \quad \text{LOQ} = (10 \times \sigma) / m \quad (4.1.)$$

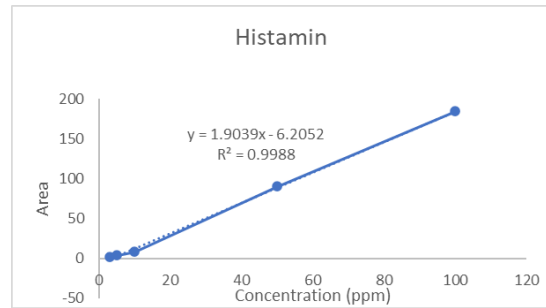
Burada σ , sinyalin istatistiksel varyasyonunu; m ise kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu hesaplamalar, yöntemin hassasiyetinin ve ölçüm kapasitesinin sayısal olarak ifade edilmesini sağlar.

4.8.2. Histaminin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması ve örnek uygulama

Histaminin kantitatif tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi, 2–100 ppm aralığında yüksek doğrusallık göstermiştir. Kalibrasyon için belirlenen beş farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı (mAU·s) değerleri aşağıda tablo hâlinde verilmiştir.

Çizelge 4. 10 Histamin için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
2	1.7
3	2.4
5	4.01
10	8.42
50	90
100	184.0



$$\text{Kalibrasyon denklemi: } y = 1.9039x - 6.2052 \quad (4.2.)$$

Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9988

LOD: 2.00 ppm, LOQ: 6.66 ppm

RSD (%): 1.35

Çizelge 4.10. A Peynir örneklerinde histamin miktarları

Numune	Pik Alanı (y) (mAU·s)	x (ppm)	µg/kg	Kullanılan Eğri
Tulum	50.330	29.693	2969.3	Yüksek seviye
Kaşar	4.29	6.18	618.0	Düşük seviye
Van	8.29	7.59	759.0	Düşük seviye
Ezine	8.5	7.66	766.0	Düşük seviye
Küp	184.0	100.0	10000.0	Yüksek seviye

Tulum peyniri örneğinden elde edilen sinyal 248 birim olarak ölçülmüştür. Bu değer regresyon denkleminde uygulanarak histamin miktarı hesaplanmıştır:

$$x = (248 + 5.2028) / 1.8879 \approx 133 \text{ ppm} \quad (4.3.)$$

Bu sonuç, 100 ppm'nin üzerindedir ve sağlık açısından risk oluşturabilecek düzeyde histamin içerdiğini göstermektedir (Durlu-Özkaya & Tunail, 2003).

4.8.3. Triptamin kalibrasyonu, LOD–LOQ hesaplaması ve peynir örneklerinde uygulama

Triptaminin HPLC ile kantitatif tayininde, geniş bir dinamik konsantrasyon aralığına sahip örneklerin analizi söz konusu olduğundan, tek bir kalibrasyon eğrisi yerine iki ayrı doğrusal kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

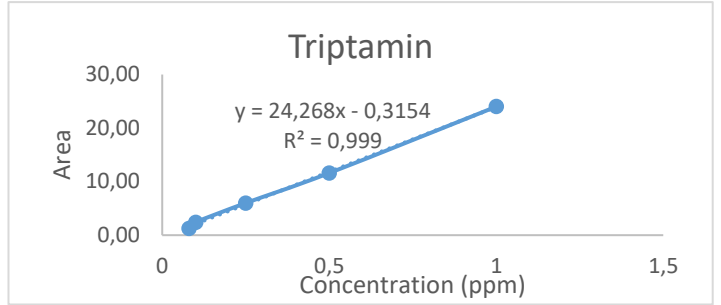
Triptamin analiti için düşük ve yüksek konsantrasyon aralıklarında iki farklı kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Düşük seviyeli analit konsantrasyonlarında (0.25–1 ppm), ölçüm hassasiyetini artırmak ve düşük sinyal değerlerini daha doğru modelleyebilmek amacıyla birinci kalibrasyon eğrisi ($y = 24.268x - 0.3154$, $R^2 = 0.999$) tercih edilmiştir. Bu eğri, özellikle Tulum ve Kaşar gibi düşük düzeyde triptamin içeren örneklerin analizi için uygun bulunmuştur.

Öte yandan, yüksek konsantrasyonlu örneklerde (örneğin Van ve Küp peyniri), düşük aralıkta oluşturulmuş kalibrasyon eğrisinin yeterli duyarlılık sağlamaması nedeniyle 1–10 ppm aralığına özgü ikinci bir kalibrasyon eğrisi ($y = 26.69x - 3.2988$, $R^2 = 0.9978$) hazırlanmıştır. Bu eğri, daha geniş sinyal aralığına sahip verilerin kantitatif analizinde doğruluğu artırmak amacıyla kullanılmıştır.

Her iki kalibrasyon eğrisi de kendi konsantrasyon aralıklarında yüksek doğrusal uyum göstermiştir ve örneklerin analit düzeylerine göre uygun eğri seçilerek hesaplamalar yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

Çizelge 4. 11 Triptamin için düşük konsantrasyon kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU)
0.08	1.26
0.1	2.4
0.25	6.0
0.5	11.6
1.0	24.0



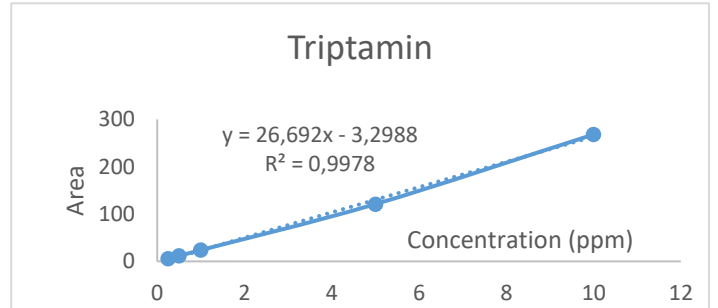
Kalibrasyon denklemi: $y = 24.268x - 0.3154$

(4.4.)

Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.999

Çizelge 4.11. A Triptamin için yüksek konsantrasyon kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU)
1	26.69
2	55.0
4	110.0
6	160.0
10	260.0



Kalibrasyon denklemi: $y = 26.69x - 3.2988$

(4.5.)

Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9978

Çizelge 4.11. B Peynir örneklerinde triptamin miktarları

Numune	Pik Alanı (mAU·s)	x (ppm)	µg/kg ($x \times 200$)	Kullanılan Eğri
Tulum	0.013	0.0135	2.7	Düşük seviye
Kaşar	7.46	0.320	64.1	Düşük seviye
Van	130.1	4.998	999.6	Yüksek seviye
Tayip	140.4	6.065	1213.1	Yüksek seviye
Küp	724.5	27.269	5453.7	Yüksek seviye

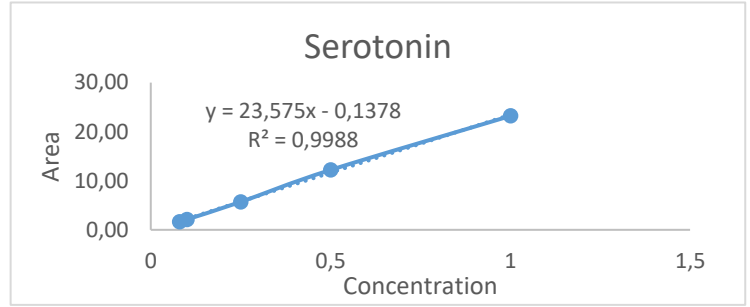
Her bir örnek için uygun kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Küp peyniri örneğinde bulunan triptamin miktarı oldukça yüksek olup gıda güvenliği açısından risk oluşturabilecek düzeydedir.

4.8.4. Serotonin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması

Serotonin için 0.08–1.00 ppm aralığında hazırlanan standart çözeltiler ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi, doğrusal regresyon katsayısı $R^2 = 0.9988$ ile oldukça yüksek doğruluk göstermiştir. Elde edilen kalibrasyon verileri ve eğrisi aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 4. 12 Serotonin için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
0.08	1.61
0.10	2.11
0.25	5.69
0.50	12.20
1.00	23.20



Kalibrasyon denklemini: $y = 23.575x - 0.1378$

(4.6.)

Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9988

Çizelge 4.12. A Peynir örneklerinde serotonin miktarları

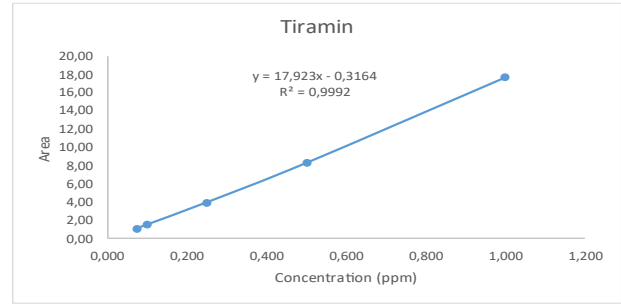
Numune	Pik Alanı (mAU·s)	x (ppm)	µg/kg	Kullanılan Eğri
Tulum	0.61	0.0317	31.7	Düşük seviye
Kaşar	7.46	0.3216	321.6	Düşük seviye
Van	130.1	5.523	5523.0	Yüksek seviye (*)
Tayip	140.4	5.959	5959.3	Yüksek seviye (*)
Küp	724.5	30.74	30740	Yüksek seviye (*)

4.8.5. Tiramin kalibrasyonu, LOD–LOQ hesaplaması ve örnek uygulamalar

Tiraminin kantitatif tayini için hem düşük hem de yüksek konsantrasyon aralıklarında iki ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yaklaşım, geniş analit konsantrasyonu aralığında doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır.

Çizelge 4. 13 Tiramin için düşük konsantrasyon kalibrasyon verileri (0.075–1 ppm)

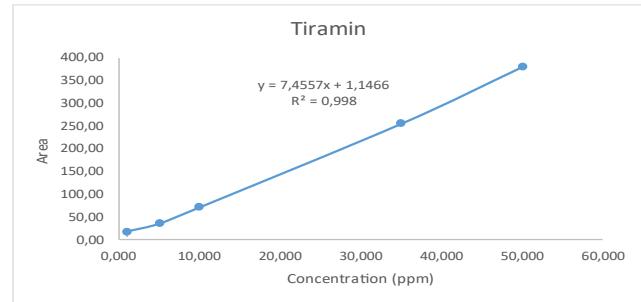
Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
0.075	1.18
0.100	1.59
0.250	4.03
0.500	8.56
1.000	17.76



Kalibrasyon denklemi: $y = 17.923x - 0.3164$ (4.7.)
Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9992

Çizelge 4.13. A Tiramin için yüksek konsantrasyon kalibrasyon verileri (10,000–50,000 ppm)

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
5000	71.00
10000	133.5
20000	260.00
35000	475.00
50000	680.00



Kalibrasyon denklemi: $y = 7.4567x + 1.1466$ (4.8.)
Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9938

Çizelge 4.13. B Peynir örneklerinde tiramin miktarları

Numune	Alan (y)	x (ppm)	$\mu\text{g/kg}$	Kullanılan Eğri
Tulum	353.22	47.26	9451.5	Yüksek seviye
Kaşar	1759.4	23.06	4720.3	Yüksek seviye
Van	397	5.33	1066.8	Düşük Seviye
Tayip	3115	41.79	8359	Yüksek seviye
Küp	8.47	0.54	108.1	Düşük Seviye

Her bir peynir örneği için uygun kalibrasyon eğrisi (düşük veya yüksek seviye) kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre küp, van ve tayip

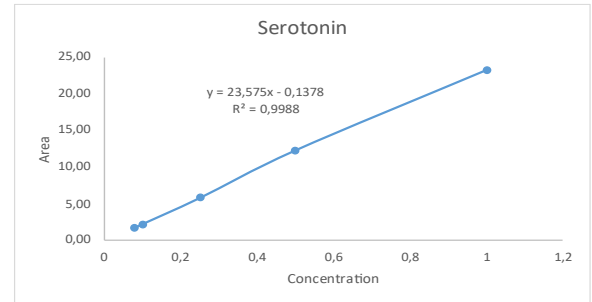
peynirlerinde tiramin miktarının oldukça yüksek olduğu, gıda güvenliği açısından potansiyel bir risk teşkil edebileceği belirlenmiştir. Özellikle küp peyniri örneğinde tespit edilen 83593.3 µg/kg tiramin düzeyi, tolerans sınırlarının oldukça üzerindedir.

4.8.6. Serotonin kalibrasyon eğrisi, LOD–LOQ hesaplaması

Serotonin için 0.08–1.00 ppm aralığında hazırlanan standart çözeltiler ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi, doğrusal regresyon katsayısı $R^2 = 0.9988$ ile oldukça yüksek doğruluk göstermiştir. Elde edilen kalibrasyon verileri ve eğrisi aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 4. 14 Serotonin için kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
0.08	1.61
0.1	2.11
0.25	5.69
0.5	12.2
1.0	23.2



Kalibrasyon Denklemi: $y = 23.575x - 0.1378$ (4.9.)
Regresyon Katsayısı (R^2): 0.9988

Çizelge 4.14 A Peynir örneklerinde serotonin miktarları

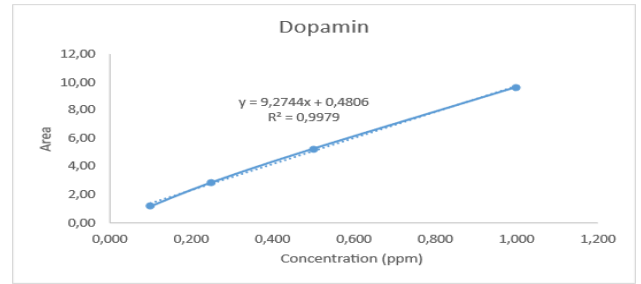
Numune	Pik Alanı (y)	x (ppm)	µg/kg	Kullanılan Eğri
Tulum	0	0.124	24.7	Düşük seviye
Kaşar	7.46	0.32	64.1	Düşük seviye
Van	130.1	4.998	999.6	Yüksek seviye
Tayip	14.4	0.607	121.3	Düşük seviye
Küp	724.5	27.269	5453.7	Yüksek seviye

4.8.7. Dopamin kalibrasyon sonuçlarının yorumlanması

Bu bölümde, dopamin analiti için geliştirilen kalibrasyon eğrisi ve elde edilen LOD–LOQ değerleri detaylı şekilde yorumlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0.1–1.0 ppm aralığında hazırlanmış olup, yüksek doğrusal uyum göstermektedir.

Çizelge 4. 15 Dopamin kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (ppm)	Pik Alanı (mAU·s)
0.10	1.22
0.25	2.91
0.50	5.29
1.00	9.66



Kalibrasyon Denklemi: $y = 9.2744x + 0.4806$

(4.10.)

Doğrusal regresyon katsayısı (R^2): 0.9979

Çizelge 4.15. A Peynir örneklerinde dopamin miktarları

Numune	Pik Alanı (y)	x (ppm)	$\mu\text{g/kg}$	Kullanılan Eğri
Tulum	0	0,05	16,0	Düşük seviye
Kaşar	1,55	0,12	40,0	Düşük seviye
Van	35,0	3,70	1232,6	Yüksek seviye
Tayyip	3,20	0,29	96,6	Düşük seviye
Küp	226,0	23,35	7773,0	Yüksek seviye

Çizelge 4. 16 Biyojenik aminler için LOD ve LOQ değerleri

MADDE	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Histamin	2.000	6.660
Triptamin	0.060	0.200
Serotonin	0.080	0.266
Tiramin	0.080	0.250
Dopamin	0.100	0.333

4.8.8. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi

Analitik yöntemlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu göstermek için yapılan temel değerlendirmelerden biri de tekrarlanabilirlik (repeatability) analizidir. Bu çalışmada, her bir biyojenik amin için aynı analitik koşullar altında beş tekrar ölçümü yapılmış; alıkonma süreleri (RT) kaydedilmiştir. Ölçümler A, B, C, D ve E olarak adlandırılmıştır. Her bir analit için elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması alınarak ortalama alıkonma süresi hesaplanmış, ardından göreceli standart sapma (RSD%) ile yöntem tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4. 17 Biyojenik aminlerin beşli ölçüme dayalı ortalama alıkonma süreleri ve RSD% değerleri

Biyojenik Amin	1.Analiz	2.Analiz	3.Analiz	4.Analiz	5.Analiz	Ort. RT (dk)	RSD%
Histamin	3.30	3.30	3.29	3.29	3.30	3.298	0.0606
Triptamin	3.89	3.89	3.88	3.89	3.89	3.888	0.0514
Serotonin	4.21	4.21	4.21	4.21	4.21	4.210	0.0000
Tiramin	5.36	5.35	5.35	5.36	5.35	5.354	0.1121
Dopamin	7.63	7.62	7.62	7.63	7.61	7.622	0.1050

Çizelge 4.8’da kromatografik analizler sırasıyla Kaşar, Tulum, Küp, Van beyaz, Van beyaz (tekrar) ve Eski Kaşar peynir örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiş olup, her bir örneğe ait sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, tüm biyojenik aminler için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının ($R^2 \geq 0,998$) yüksek olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin ise yöntemin duyarlılığını ortaya koyduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, her bir analit için yapılan beş tekrarlı enjeksiyon sonucu elde edilen %RSD değerlerinin %2’nin altında olması, kullanılan HPLC yönteminin yüksek düzeyde tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada, C-12 hidroksi grubu içeren karma mod (mixed-mode) HPLC kolonu ve Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolon kullanılarak, peynir örneklerindeki bazı biyojenik aminlerin (histamin, tiramin, dopamin, serotonin ve triptamin) eş zamanlı tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme yapılmaksızın doğrudan analiz yapılabilmesi, yöntemin hem pratik hem de ekonomik olduğunu göstermektedir. Bu özellik, gıda analizlerinde zaman ve kaynak tasarrufu sağlayan önemli bir avantaj olarak değerlendirilebilir.

Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu, yüzeyinde bulunan hidroksil grupları ve iyon değişim özellikleri sayesinde, polar ve bazik karakterdeki biyojenik aminlerin etkili şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Mobil faz bileşimi, pH, kolon sıcaklığı, akış hızı ve tampon konsantrasyonu gibi kromatografik performansı etkileyen parametreler sistematik olarak optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, tüm hedef aminler yüksek çözünürlükle ve kısa sürede ayrılmıştır. Bu da yöntemin hızlı analiz gerektiren rutin laboratuvar uygulamaları için uygun olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntem, yalnızca sentetik karışımlar değil, aynı zamanda piyasadan temin edilen farklı türlerdeki ticari peynir örneklerinin analizinde de başarıyla uygulanmıştır. Farklı peynir örneklerinde, özellikle tiramin ve triptamin aminlerinin tayini gerçekleştirilmiş; yalnızca bir örnekte histamin saptanmıştır. Küp peyniri ve Van otlu peyniri, biyojenik amin birikimi açısından en yüksek değerlere sahip örnekler olmuştur. Özellikle Küp peyniri, bazı kaynaklarda güvenli eşik olarak belirtilen 100 mg/kg tiramin sınırına oldukça yaklaşmış ya da bu sınırı aşmıştır. Bu durum, potansiyel toksikolojik risk açısından dikkatle değerlendirilmelidir.

Triptamin ve histamin için saptanan düzeyler düşük olmasına rağmen, anlamlıdır. Bu bileşiklerin özellikle MAO inhibitörü ilaç kullanan bireylerde ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, fermente süt ürünlerinde biyojenik amin izleme çalışmaları yalnızca akademik araştırmalarla sınırlı kalmamalı; gıda güvenliği politikaları çerçevesinde düzenli izleme programlarına entegre edilmelidir.

pH parametresi, analitlerin iyonlaşma durumunu ve kolonla olan etkileşimlerini belirleyerek ayırım performansı üzerinde doğrudan etkili olmuştur. Bu çalışmada

kullanılan pH 5.5'lik asetat tamponu, aminlerin katyonik formda bulunmalarını sağlayarak kolondaki anyonik fonksiyonel gruplarla etkili iyonik etkileşim kurmasına olanak tanımıştır. Bu durum, alıkonma sürelerinin ve pik simetrisinin iyileşmesine katkı sağlamıştır.

Sıcaklık ve akış hızı gibi diğer parametreler de ayırım performansını doğrudan etkilemiş; optimum koşullar altında elde edilen kromatogramlar net, ayrık ve analitik olarak tatmin edici bulunmuştur. Özellikle sıcaklığın artırılmasıyla çözünürlükte bir miktar azalma, ancak analiz süresinde anlamlı bir kısalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular, sıcaklık değişiminin analitik amaçlara göre optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Yöntemin duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği de yüksek bulunmuştur. Kalibrasyon eğrileri doğrusal olup, korelasyon katsayıları istatistiksel olarak anlamlı ve %RSD değerleri düşük düzeyde kalmıştır. Bu durum, yöntemin kantitatif analizlerde güvenilir olduğunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında geliştirilen HPLC yöntemi, biyojenik aminlerin türevlendirme yapılmadan, hızlı ve yüksek çözünürlükle analiz edilmesine olanak sağlayan etkili ve uygulanabilir bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Gerek laboratuvar düzeyinde gerekse endüstriyel kalite kontrol amaçlı uygulamalarda kullanılmaya elverişli olan bu yöntem, gıda güvenliği açısından önemli katkılar sunmaktadır.

5.2 Öneriler

Çalışma sonucunda, bazı peynir örneklerinde özellikle tiramin ve triptamin düzeylerinin dikkat çekici seviyelere ulaştığı gözlemlenmiştir. Küp peyniri gibi bazı örneklerde, tiramin düzeyi 100 mg/kg eşiğine oldukça yaklaşmakta ya da bu sınırı aşabilmektedir. Bu durum, özellikle monoamin oksidaz inhibitörü (MAOI) tedavisi gören bireyler açısından ciddi sağlık riskleri doğurabilir. Bu nedenle, biyojenik amin düzeylerinin düzenli olarak izlenmesi, fermente süt ürünlerinde gıda güvenliğini sağlamak açısından önemlidir. Geliştirilen analitik yöntemin, HACCP (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) sistemi çerçevesinde, potansiyel kimyasal risklerin kontrolü amacıyla kullanılabilecek etkili bir araç olduğu düşünülmektedir.

Biyojenik amin içeriği gıdalarda toksisite riski oluşturabileceğinden, özellikle yüksek risk grubuna giren fermente ürünlerde bu içeriğe dair bilgi etiketlemeye dâhil edilmelidir. Etiketlerde “biyojenik amin içerir” veya “yüksek tiramin potansiyeli taşır”

gibi uyarılar yer alması, özellikle hassas bireylerin bilinçli tüketim yapmalarını sağlayacaktır.

Geliştirilen HPLC yöntemi; hızlı, güvenilir ve türevlendirme gerektirmeyen yapısıyla, peynir üreticilerinin kalite kontrol laboratuvarlarında doğrudan uygulanabilecek niteliktedir. Özellikle küçük ve orta ölçekli işletmelere, bu yöntemin validasyon süreçleri konusunda teknik destek sağlanarak yaygın kullanımı teşvik edilmelidir.

Bu çalışma peynir örnekleriyle sınırlı kalmış olsa da, benzer biyojenik amin oluşum riski taşıyan sucuk, şarap, turşu ve balık gibi diğer fermente ürünlerde de yöntemin uyarlanarak kullanılması önerilmektedir. Özellikle farklı matrislerdeki matriks etkisi, pH tamponlama kapasitesi ve iyonik etkileşimlerin yeniden değerlendirilerek metoda özel optimizasyonlar yapılmalıdır.

C-12 hidroksi grubu içeren Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 kolonu, hem hidrofilik hem de iyon değişim özellikleriyle etkili bir ayırma sağlamıştır. Bu başarı, karma mod kolonların sadece biyojenik amin değil; aynı zamanda bazik ve polar yapıları diğer farmasötik veya gıda analizleri için de potansiyel taşıdığını göstermektedir. Bu bağlamda, ileri çalışmaların farklı karma mod sabit fazların karşılaştırmalı analizine odaklanması önerilir.

Geliştirilen bu yöntem, laboratuvar temelli gıda analiz eğitimlerinde örnek uygulama olarak kullanılabilir. Üniversitelerde gıda kimyası, analitik kimya ve kromatografi derslerinde gerçek örnek analiziyle öğrenci eğitime katkı sunabilecek bir model olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, Tarım ve Orman Bakanlığı'nın analitik izleme standartları arasında yer alması için pilot uygulamalara geçilmesi önerilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, C. B., & Saad, B. (2019). Derivatization strategies for the determination of biogenic amines: Dansyl chloride is the most commonly used reagent due to its efficiency and stability. In B. Saad & R. Tofalo (Eds.), *Biogenic amines in food: Analysis, occurrence and toxicity* (pp. 239–267). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788015813-00239>
- Alpert, A. J. (2008). Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 80(1), 62–76. <https://doi.org/10.1021/ac701839f>
- Aral, H. (2013). Farklı polaritelere sahip amid-silika kolon dolgu materyallerinin sentezi ve HPLC ile çeşitli polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılması (Doktora tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Aral, H., Aral, T., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2013). Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different phytohormone classes. *Talanta*, 116, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.007>
- Aral, S., Aral, N., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2013). Gıda analizlerinde HILIC kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(2), 30–38.
- Ares, A. M., & Bernal, J. (2012). Hydrophilic interaction chromatography in drug analysis. *Central European Journal of Chemistry*, 10(2), 534–553. [https://doi.org/10.2478/s11532-011-0156-7:contentReference\[oaicite:0\]{index=0}](https://doi.org/10.2478/s11532-011-0156-7:contentReference[oaicite:0]{index=0})
- Ares, A. M., & Bernal, J. L. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1270, 94–110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.049>
- Cavazzini, A. (2023). Advanced stationary phases in HILIC: Retention mechanisms and practical insights. *Journal of Chromatography A*.
- Cavazzini, A. (2023). Understanding retention mechanisms in HPLC. *Journal of Chromatography A*, 1700, 463267. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463267>
- Cavazzini, A., & Wan, Q.-H. (2023). Mixed-mode chromatography: Principles, methods and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(29–30), 7033–7034. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-05001-1>
- Chirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Biogenic amines in Italian cheeses: A review. *Foods*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/foods5020015>
- Coşkun, Ö. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

- Doeun, D., Davaatseren, M., & Chung, M. S. (2017). Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1463–1474.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Eser, B., & Sepici Dinçel, A. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51–57. <https://doi.org/10.26567/JOHSE.2018250150>
- Feier, U., & Goetsch, P. H. (1993). Inter-laboratory studies on precision characteristics of analytical methods: Determination of biogenic amines in fish and fish products – HPLC method. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44, 134–135.
- Fukushima, T., Koishi, M., Sakamoto, T., & Onozato, M. (2014). Applications of mixed-mode stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 100, 20–40. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.07.020>
- Fukushima, T., Koishi, M., Sakamoto, T., & Onozato, M. (2024). Use of commercial mixed-mode stationary phases and sorbents in the high-performance liquid chromatography analysis and solid-phase extraction of ionized and hydrophilic bioactive compounds. *Molecules*, 29(10), 2341. <https://doi.org/10.3390/molecules29102341>
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42–49. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90240-2)
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in foods using a post-column derivatization with o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography A*, 778(1–2), 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00385-6)
- International Council for Harmonisation. (2005). *ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- interaction chromatography with mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Analytical Chemistry*, 82(4), 123–131. <https://doi.org/10.1021/ac9025608>
- Jandera, P. (2011a). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.045>
- Jandera, P. (2011b). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1–2), 15–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.042>

- Kahsay, R. Y., Gebremariam, F., Wiese, S., & Neubert, R. H. H. (2014). Hydrophilic interaction chromatography: A powerful tool for metabolomic analysis. *Bioanalysis*, 6(3), 349–364. <https://doi.org/10.4155/bio.13.329>
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Álvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145–156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Lehtonen, P., Saarinen, M., Vesanto, M., & Riekkola, M. L. (1992). Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatisation with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 194, 434–437. <https://doi.org/10.1007/BF01202668>
- Leuschner, R. G. K., Kurihara, T., Hammes, W. P., & Sutherland, J. P. (2013). Histamine and other biogenic amines in food. *EFSA Supporting Publications*, 10(3), EN-450. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-450>
- Li, J., & Carr, P. W. (2016). Retention mechanisms in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1460, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.003>
- Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., & Martín, M. C. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>
- Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2012). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 503–518. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500245>
- Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>
- Liu, X., & Pohl, C. A. (2010). HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column. *Journal of Separation Science*, 33, 779–786. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900645>
- Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amine in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(Suppl. 3), S95–S100. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.218>
- Luten, J. B., ten Brink, B., Weenk, G. H., & Jansen, W. A. (1992). Biogenic amines in fishery products: Standardization methods within E.C. In H. H. Huss, M. Jacobsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 427–439). Elsevier.
- Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho, M. A., & Hirn, J. A. (1993). The effect of GDL induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56(2), 125–129. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.2.125>

- Maijala, R., Eerola, S., & Haahtela, K. (1993). Biogenic amines in dry sausages during shelf life storage. *Journal of Food Protection*, 56(6), 547–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.6.547>
- National Center for Biotechnology Information. (2020). Biogenic amines in foods. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6351943/>
- Nguyen, N.-V. T. (2022). Mixed-mode chromatography. In *Analytical liquid chromatography – New perspectives* (pp. 1–25). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104545>
- Nguyen, N.-V. T. (2022). Perspective chapter: Mixed-mode chromatography. In S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Analytical liquid chromatography – New perspectives* (pp. [sayfa numarası eksik]). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104545>
- Olsen, B. A. (2001). Aminopropyl and silica hydrophilic interaction chromatography columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, 913(1–2), 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01228-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01228-3)
- Olsen, B. A. (2001). Hydrophilic interaction chromatography: Application to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00430-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00430-2)
- Orlovsky, V., & Zelechonok, Y. (2011). Evolution of mixed-mode chromatography. *Chromatography Today*, August/September, 20–24.
- Öztürk, E., & Yaman, H. (2024). A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects. *Heliyon*, 10, e24501. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24501>
- Poyraz, N., Gökmen, V., & Şenyuva, H. Z. (2020). Direct analysis of biogenic amines in cheese using ion-pairing HPLC with UV detection. *Food Analytical Methods*, 13, 1201–1209. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01668-1>
- Rice, S. L., Taylor, S. L., & Bush, R. K. (1976). Food biogenic amines and allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 57(4), 433–438. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(76\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(76)90005-2)
- Rusli, H., Putri, R. M., & Alni, A. (2022). Recent developments of liquid chromatography stationary phases for compound separation: From proteins to small organic compounds. *Molecules*, 27(3), 907. <https://doi.org/10.3390/molecules27030907>
- Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2–3), 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- Santos, M. H. S., Silva, C. M. D., & Gloria, M. B. A. (2020). Comparison of derivatized and non-derivatized methods for biogenic amine detection in fermented foods.

- Journal of Chromatography A, 1613, 460731.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460731>
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Biogenic amines in Italian cheeses: A review. *Foods*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/foods5020015>
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Histamine food poisoning. In Y. Hattori & R. Seifert (Eds.), *Histamine and histamine receptors in health and disease* (Vol. 241, pp. 217–235). Springer. https://doi.org/10.1007/164_2016_54
- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists*, 2*(1), 21–25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. H. (1994). Determination of biogenic amines in leafy vegetables by amino acid analyser. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 198, 230–233. <https://doi.org/10.1007/BF01193166>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118210341>
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., López, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., Trip, H., & Johansen, E. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(S3), S95–S100. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.218>
- Straub, B., Schollenberger, M., Kicherer, M., Luckaa, B., & Hammes, W. P. (1993). Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat products using reversed-phase HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 197, 230–232. <https://doi.org/10.1007/BF01197858>
- Švecová, B., & Janovská, D. (2021). Determination of biogenic amines in cheese using HPLC with and without derivatization: Method comparison. *Food Analytical Methods*, 14, 223–233. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01918-5>
- Švecová, B., & Janovská, M. (2021). Biogenic amines in wine and cheese determined by HPLC UV MS after dansyl chloride derivatization. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A: Faculty of Chemical Technology*, 27, 49–60. <https://doi.org/10.46585/sp28021334>
- Switzer, R. L., & Garrity, L. F. (1999). *Experimental biochemistry* (3rd ed.). W. H. Freeman and Company.
- Taraji, M., Haddad, P. R., Amos, R. I., Talebi, M., Szucs, R., & Dolan, J. W. (2018). Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1000, 20–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.062>

- Taylor, S. L. (1983). Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, 12(4), 297–304. <https://doi.org/10.3109/10408448309029317>
- Taylor, S. L. (1983). Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 927–936.
- Taylor, S. L., & Sumner, S. S. (1986). Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In D. T. Kramer & J. Liston (Eds.), *Seafood quality determination* (pp. 235–245). Elsevier.
- Taylor, T. (2014, March 1). Mixed-mode HPLC separations: What, why, and how. *LCGC North America*, 32(3), 226. <https://www.chromatographyonline.com/view/mixed-mode-hplc-separations-what-why-and-how>
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biogenic amines in food. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73–84. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90040-C](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90040-C)
- Toy, N. (2010). Laktik asit bakterileri serbest hücre ekstraktlarının patojenik bakterilerin gelişimine ve biyojenik amin üretimine etkisinin araştırılması [Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi]. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- van Nuijs, A. L. N., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., & Covaci, A. (2011). Analytical challenges and solutions in drug testing of biological matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.007>
- Wan, Q.-H. (2021). *Mixed-mode chromatography: Principles, methods, and applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-5485-5>
- Yurchenko, S., Molder, U., & Paalme, T. (2021). Direct determination of biogenic amines in dairy products using ion-pair chromatography and conductivity detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 98, 103835. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103835>
- Zhang, K., & Liu, X. (2016a). Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *Journal of Chromatography A*, 1440, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.060>
- Zhang, K., & Liu, X. (2016b). Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>
- Zhang, L., Dai, Q., Qiao, X., Yu, C., Qin, X., & Yan, H. (2016). Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent developments and applications for high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.012>

Zhang, T., Creek, D. J., Barrett, M. P., Blackburn, G., & Watson, D. G. (2016). Evaluation of coupling reversed-phase, aqueous normal phase, and hydrophilic