

Balık ve balık ürünlerinde histamin düzeylerinin tespiti için o-fitaldialdehit ve benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması*

Deniz TURAN¹, Ulvi Reha FİDANCI²

¹ Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Çalışmada histamin düzeylerinin hassas ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak Antoine ve ark. (1999) tarafından önerilen floresans dedektör (FLD) ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan yöntem ile Özdehan ve Üren (2009) tarafından geliştirilen fotodiyot array dedektörü (DAD) ve benzoil klorür türevlendirmesinin kullanıldığı yöntem validasyon parametreleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Teşhis limiti çalışmaları için İstanbul'da Küçükçekmece sahilinden tutulan canlı istavrit balığı, geri kazanım, doğruluk, kesinlik parametreleri ve yöntemler arası karşılaştırma için ise sertifikalı referans materyal olan FAPAS T2775QC kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda FLD ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi ile elde edilen ölçüm limiti (LOQ) 1.38 ppm, geri kazanım %100; benzoil klorür yönteminde bu parametreler 10.66 ppm ve % 88'dir. Her iki yöntemde de yapılan t-testi hesaplamalarına göre iki yöntem arasındaki fark anlamlıdır (p<0.5). Horrat Değeri hesaplamalarına göre o-fitaldialdehit yönteminde tekrar üretilebilirlik normal bulunurken, benzoil klorür yöntemi için tekrar üretilebilirlik beklenenden daha yüksektir. Sonuç olarak balık ve balık ürünlerinde histamin düzeylerinin tespiti için FLD ve o-fitaldialdehit yönteminin hassasiyetinin ve güvenilirliğinin uygun olduğu ve rutin analizlerde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Balık, balık ürünleri, histamin, metot, validasyon.

Comparison of high pressure liquid chromatography methods in fish and fish products by using o-phthalaldehyde and benzoyl chloride derivatization for the determination of histamine levels

Summary: In this study, by the parameters of validation a comparison of two high pressure liquid chromatography (HPLC) methods one of which utilizes coupled the FLD and the o-phthalaldehyde derivatization method of Antoine et al. (1999) versus DAD coupled, benzoyl chloride derivatization method with a modification of Özdehan and Üren (2009) were made for the selection of sensitive and safe assay for the determination of histamine. Alive horse mackerels caught from the sea of Marmara in Küçükçekmece Istanbul were used for the limit of detection studies. For the other validation parameters, recovery, accuracy, precision and comparison of methods a certified reference material; FAPAS T2775QC were used. Results of the analyses indicated that the FLD coupled; o-phthalaldehyde derivatization method the limit of quantification (LOQ) and recovery were 1.38 ppm and 100% respectively; and for DAD coupled; benzoyl chloride derivatization modified method these values were 10.66 ppm and 88% respectively. There was a significant difference between for both methods in t-test (p<0.5). According to the calculations of Horrat value; the reproducibility was normal for o-phthalaldehyde method but found to be higher than the accepted limits in benzoyl chloride method. In conclusion, it is advised to choose FLD coupled o-phthalaldehyde derivatization method for the safe and sensitive determination of histamine in fish and fish products.

Key words: Fish, fish products, histamine, methods, validation.

Giriş

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen eksojen amino asitleri içermesi, vitamin ve mineral madde içeriğince zengin olması bakımından hayvansal kaynaklı gıda maddelerinin içerisinde su hayvanları önemli bir yere sahiptir (18, 27, 30, 35, 37).

Bağ doku yönünden fakir olması, doymamış yağ asitlerini fazla miktarda içermesi, pH ve nem değerlerinin yüksek olması, solungaçlardan mikroorganizma geçişinin

çok kolay olması ve mide-bağırsak florasındaki patojen mikroorganizmaların ölüm sonrası ete geçiş süresinin çok hızlı olması gibi nedenlerle, su hayvanlarında mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal bozulma olayları, kasaplık hayvan etlerine göre daha hızlı olduğundan, avlanmalarından itibaren işlenmesi ve tüketiciye ulaştırılincaya kadar soğuk zincir içinde tutulmaları büyük önem taşımaktadır (10, 14, 38, 39).

* Aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

Gıdalarda mikrobiyolojik aktivite sonucu amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ya da ketonların transaminasyonu ile oluşan organik bazlı düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşikler olan biyojen aminler, canlı organizmada hormonların, alkaloidlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezinde azot kaynağı olarak rol oynamaktadır. Biyojen aminler ayrıca gıda maddelerinin aromasını oluşturmaları, mide hacminin ve pH'sının ayarlanması, vücut ısısının kontrolü ve merkezi sinir sisteminin aktivitesi yönünden de son derece önemli maddelerdir (1, 4).

Ancak su hayvanlarında, avlandığı andan itibaren, çevre sıcaklığı, hijyen ve zamana bağlı olarak oluşan biyojen aminler, belirli bir düzeyi aştığında insan ve hayvanlar için toksik olabilmektedir (17, 19). Bu nedenle balık ürünlerinin içerdiği gıda güvenliği risklerinin başında biyojenik bir amin olan histamin gelmektedir (12, 15).

Histamin, balık, peynir ve et ürünleri gibi gıdalarda tespit edilmiş en toksik amin olup, yüksek düzeylerde histamin içeren balık ve balık ürünlerini tüketen insanlarda ve hayvanlarda 'histamin zehirlenmesi'ne neden olmaktadır. Histaminin kalp-damar sistemi ve çeşitli salgı bezlerindeki hücre zarı reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterdiği, böbrek üstü bezlerindeki etkisinin bir sonucu olarak kalbi etkileyip, uterus, bağırsak ve solunum bölgelerindeki düz kasları, duyu ve motor sistemini harekete geçirdiği ve mide asidini kontrol altına aldığı bildirilmiştir. Bu nedenle balık ve balık ürünlerindeki histamin düzeylerinin tespiti insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır (22, 23).

Biyojen aminler içerisinde sadece histamin için yasal kriterler mevcuttur. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tüketilebilir balıklarda maksimum histamin düzeyinin 5 mg/100 gramı (50 ppm) geçmemesi gerektiğini bildirmiştir (9). Avrupa Birliği *Scorbridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* (*Coryphaenidae*), *Pomatomidae*, *Scorbrerosidae* familyalarına ait balık türlerinden 9 örnekleme yapılmasını zorunlu kılmaktadır (6).

29 Aralık 2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde yer alan bilgilere göre de taze soğutulmuş balıklar ve dondurulmuş balıklarda kabul edilebilir en yüksek değer 100 ppm (mg/kg) iken bu değer konserve balık ürünleri ve işlenmiş çift kabuklu yumuşakçalar (kara midye, kıllı midye, akivades, kidonya istiridye, kum midyesi vb.), kabuklular (kerevit, karides, istakoz, yengeç vb.), karından bacaklılar (deniz salyangozu vb.), kafadan bacaklılar (ahtapot, mürekkep balığı, kalamar vb.), için 200 ppm (mg/kg)'dir. Yukarıda belirtilen balık ve balık ürünlerinden (konserve balıkçılık ürünleri hariç) alınan 9 adet numunenin histamin düzeylerinin ortalaması 100 ppm'i geçmemelidir. İki örnekte 100 ppm'den fazla 200 ppm'den az olabilir. Ancak hiçbir numunede 200 ppm'i geçmeme koşulu vardır (36).

Balık ve balık ürünlerinde histamin analizi üzerine etkili olan çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerden çoğunun deniz toksinlerine yönelik olmasına karşın, balıklardaki yüksek histamin düzeylerini saptamak adına basit ve pahalı olmayan kolorimetrik yöntemlerden, LC-MS yöntemlerine kadar çeşitli yöntemler bulunmaktadır (17, 34).

Balık ve balık ürünlerinde histamin analizlerinde sıklıkla kullanılan ve en bilinen yöntemler, güçlü kromoforlar ya da floresans ürünlerin üretilmesi esasına dayanan ön kolon türevlendirmesi veya kolon sonrası türevlendirme temelinde kullanılan yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleridir (5, 11, 20).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, histaminin hassas ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için, Özdestand ve Üren (29) tarafından geliştirilen DAD ve türevlendirme ajanı olarak benzoil klorürün (kullanıldığı modifiye yöntem, diğerinde ise Antoine ve ark. (2) tarafından önerilen FLD ve o-fitaldialdehit (OPA) türevlendirme ajanı ile ön kolon türevlendirmesinin kullanıldığı HPLC yöntemi karşılaştırılmış, validasyon parametreleri (8, 28) hesaplanıp balık ve balık ürünlerinde histamin düzeylerinin tespiti için en hassas, güvenilirliği ve uygulanabilirliği en iyi olan HPLC yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmalar Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nde gerçekleştirilmiştir. Materyal olarak; teşhis ve ölçüm limitlerini belirleme çalışmalarında İstanbul Küçükçekmece sahilinden tutulan istavrit balığı; doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve yöntemler arası karşılaştırma gibi parametrelerin belirlenmesinde ise, sertifikalı histamin referans materyali (FAPAS T2775QC) kullanılmıştır. Histamin düzeylerinin tespiti ve validasyon çalışmalarında Antoine ve ark. (2) tarafından önerilen floresans dedektör (FLD) ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemi ile Özdestand ve Üren (29) tarafından modifiye edilen fotodiyot array dedektörü (DAD) kullanılan yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemi seçilmiştir.

Çalışmada, o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan yöntemde sertifikalı saf kristalize histamin standardı ile hazırlanan ana stok çözeltisi dilüe edilerek ara düzey çözeltisi hazırlanmış ve ara düzey çözeltiden 0,3 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 200 ppm düzeylerinde 5 farklı histamin çalışma standardı hazırlanmıştır. Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan yöntemde ise, hazırlanan ana stok çözeltisi dilüe edilerek ara düzey standardı hazırlanmıştır. Hazırlanan ara düzey standardını ile 8,33 ppm, 16,65 ppm, 83,3 ppm, 166,65 ppm düzeylerinde 4 farklı histamin çalışma standardı hazırlanmıştır. Türevlendirme kontrolü için yöntemde belirtildiği gibi iç standart (1,7 diaminoheptan) hazırlanmıştır. Dört farklı düzeyde hazırlanan çalışma standartlarının türevlendirme sonrası

HPLC'ye paralel enjeksiyon ile belirlenen analiz sonuçları, Microsoft Excel (2007) programından yararlanılarak kalibrasyon eğrisi çizdirilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

İstatistiksel analizler Excel 2007 programında ANOVA hesaplamalarına göre yapılmıştır. Yöntem validasyon parametrelerinden linearite için ANOVA regresyon hesaplamaları kullanılmış ve F testi yapılmıştır. Yöntemler arası karşılaştırma için EURACHEM (8) ve NMKL (28) rehberlerinde belirtildiği gibi t-testi yapılmıştır. Doğruluk parametresi için her yöntemde sapan verilerin kontrolü ISO 5725-2'de (21) ve Grubbs ve Beck (13)'de bildirilen Grubbs Testi ile sağlanmış ve Winer (42)'e göre yöntemlerin analiz sonucu değerlerinin sertifikalı referans maddenin sertifika değeriyle arasında önemli bir fark bulunup bulunmadığını belirlemek için t-testi yapılmıştır. Kesinlik parametresi içerisinde yer alan

tekrar edilebilirlik için her yöntemde sapan verilerin kontrolü ISO 5725-2'de (21) belirtildiği gibi Grubbs Testi kullanılarak yapılmış ve analizin paralel çalışmaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı her yöntem için ANOVA F-testi kullanılarak yapılmıştır. Yılmaz (43) ve Horwitz ve Albert (16)'a göre kesinlik parametreleri içerisinde yöntemlerin kabul edilebilirliğini saptamak için Horrat Değeri hesaplanmıştır.

Bulgular

FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi HPLC yöntemlerinde tespit (LOD) ve ölçüm (LOQ) limitleri Tablo 1'de görülmektedir. FAPAS T2775QC numunesi ile yapılan geri kazanım çalışması sonuçları Tablo 2'de, gerçeklik (sistemik hata ve Grubbs Testi) sonuçları Tablo 3'de, yöntemler arası karşılaştırma (t-testi) sonuçları Tablo 4'de,

Tablo 1. FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi HPLC yöntemlerinde tespit (LOD) ve ölçüm (LOQ) limiti.

Table 1. Detection and Quantition of limits of the respective HPLC methods utilizing FLD+o- phtaldialdehit and DAD+benzoil chloride derivatization.

	FLD+ o-Fitaldialdehit türevlendirmesi (ppm)			DAD+Benzoil klorür türevlendirmesi (ppm)		
	X1	X2	Ortalama	X1	X2	Ortalama
1	0,756	0,938	0,847	8,117	9,471	8,794
2	0,771	0,950	0,860	8,189	9,409	8,799
3	0,786	1,005	0,895	8,207	9,404	8,805
4	0,809	1,103	0,956	8,297	8,528	8,413
5	0,816	0,972	0,894	8,793	8,803	8,798
6	0,796	1,028	0,912	8,874	9,344	9,109
7	0,787	0,853	0,820	8,886	9,132	9,009
8	0,798	0,853	0,825	8,978	8,498	8,738
9	0,803	0,862	0,832	8,978	8,388	8,683
10	0,819	1,085	0,952	9,068	8,295	8,681
Ortalama			0,879			8,783
Standart Sapma			0,050			0,187
LOD			1,030			9,347
LOQ			1,382			10,660

X1=1. paralel analiz sonucu

X2=2. paralel analiz sonucu

X1=Result of the first parallel analysis

X2=Result of the second parallel analysis

Tablo 2. FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile FAPAS T2775QC numunesi geri kazanım çalışması.

Table 2. Table 2. FAPAS T2775QC samples recovery results with the respective HPLC methods utilizing FLD+o- phtaldialdehit and DAD+benzoil chloride derivatization.

Tekrar	FLD+ o-Fitaldialdehit türevlendirmesi		DAD+ Benzoil klorür türevlendirmesi		Değerlendirme (% 80-110)
	FAPAS (ppm)	Geri Kazanım (%)	FAPAS (ppm)	Geri Kazanım (%)	
1	232,622	92	221,723	88	Olumlu
2	235,862	93	219,518	87	Olumlu
3	259,756	103	229,936	91	Olumlu
4	259,783	103	223,196	88	Olumlu
5	262,578	104	222,055	88	Olumlu
6	268,099	106	224,326	89	Olumlu
Ortalama		100		88	

Tablo 3. FLD+o-fitaldialdehit ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemleri ile FAPAS T2775QC numunesi gerçeklik (Sistematik hata ve Grubbs Testi).

Table 3. FAPAS T2775QC sample reality test (Systematic Error and Grubbs Test) with the HPLC methods utilizing FLD+o-phtaldialdehit and DAD+benzoil chloride derivatization.

Tekrar Sayısı	FLD+o-Fitaldialdehit türevlendirmesi (ppm)	DAD+ Benzoil klorür türevlendirmesi (ppm)
1	232,621	221,335
2	235,862	221,453
3	259,756	221,723
4	259,783	222,055
5	262,578	222,290
6	264,370	223,196
7	267,672	224,326
8	268,099	228,849
9	270,970	229,936
10	273,006	231,351
Ortalama	259,47	224,65
Sistematik Hata (Hs)	6,47	-28,35
Bağlı Hata (Hr)	0,026	0,112
% Bağlı Hata	2,558	-11,205
Standart Sapma	14,02	3,87
Grubbs düşük (10)	1,915	0,587
Grubbs yüksek (10)	0,965	1,731
Değerlendirme (Grubbs Tablo=2,290)	Uygun	Uygun

Tablo 4. FLD+o-fitaldialdehit ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemleri ile FAPAS T2775QC numunesi yöntemler arası karşılaştırma (t-testi).

Table 4. Comparison of HPLC methods utilizing FLD+o-phtaldialdehit and DAD+benzoil chloride derivatization by the FAPAS T2775QC sample.

Tekrar Sayısı	FLD+o-Fitaldialdehit türevlendirmesi (ppm)	DAD+ Benzoil klorür türevlendirmesi (ppm)
1	222,150	221,723
2	227,869	219,518
3	232,622	229,936
4	235,862	223,196
5	259,756	222,055
6	259,783	224,326
7	262,578	221,092
8	264,370	221,335
9	267,672	228,849
10	268,099	221,453
11	270,970	231,351
12	273,006	222,290
Ortalama	253,728	223,927
Standart Sapma	18,507	3,902
t tablo (22) (p=0,05)		2,074
t bulunan		5,459
Gerçek değer		253
Değerlendirme	t bulunan \geq t tablo İki yöntem arasında önemli bir fark var	

tekrar edilebilirlik çalışması sonuçları Tablo 5'de, FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi HPLC yöntemlerinde kesinlik kontrolü (Horrat Değeri) Tablo 6'da ve Tablo 7'de verilmiştir. Tablo 8'de ise yöntemlerin validasyon parametreleri yönünden karşılaştırılmasına ait veriler topluca görülmektedir. FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve

DAD+benzoil klorür türevlendirmesi HPLC yöntemleri arasında uygulanan karşılaştırma testinde önemli fark bulunmuştur ($p < 0.5$). DAD+benzoil klorür türevlendirmesinde tekrar üretilebilirlik beklenenden yüksektir. İstatistik analiz sonuçlarına göre her iki yöntemde de kalibrasyon eğrisi doğrusaldır.

Tablo 5. FLD+o-fitaldialdehit ve DAD+benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemleri ile FAPAS T2775QC numunesi tekrar edilebilirlik çalışması.

Table 5. Reproducibility studies of the HPLC methods utilizing FLD+o-phtaldialdehit and DAD+benzoil chloride derivatization by the FAPAS T2775QC sample.

Tekrar Sayısı	FLD+o-Fitaldialdehit türevlendirmesi (ppm)	Ortalama (ppm)	DAD+ Benzoil klorür türevlendirmesi (ppm)	Ortalama (ppm)
1	222,150 227,869	225,01	219,518 222,290	220,90
2	232,622 235,862	234,24	221,092 229,936	225,51
3	264,000 262,578	263,29	221,335 228,849	225,09
4	259,783 264,370	262,08	221,453 224,326	222,89
5	267,672 270,970	269,32	221,723 223,196	222,46
6	268,099 273,006	270,55	222,055 231,351	226,70
Ortalama	254,08		223,93	
Standart Sapma	18,67		3,90	
RSD	0,07		0,02	
% RSD	7,35		1,74	
Grubbs düşük (12)	1,711		1,130	
Grubbs yüksek (12)	1,014		1,902	
Değerlendirme				
Grubbs Tablo (12)=2,412	Uygun		Uygun	

Tablo 6. FLD+o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile FAPAS T2775QC numunesi kesinlik kontrolü (Horrat Değeri).

Table 6. Precision control of the HPLC method utilizing FLD+o- phtaldialdehit derivatization by FAPAS T2775QC sample (Horrat Value).

Tekrar Sayısı	X1(ppm)	X2(ppm)	W = X1-X2	(X1-X2) ²	[X1-X2]≤R	Değerlendirme
1	222,150	220,111	2,04	4,156	2,04	Olumlu
2	227,868	222,123	5,75	33,015	5,75	Olumlu
3	232,621	237,212	-4,59	21,070	4,59	Olumlu
4	235,862	234,932	0,93	0,865	0,93	Olumlu
5	259,756	241,298	18,46	340,673	18,46	Olumlu
6	259,783	256,144	3,64	13,242	3,64	Olumlu
Ortalama			237,49			
Standart Sapma			14,32			
R=Ss*2,83			40,51			
% RSD			1,74677			
Horrat r<2			0,87339			
R Öngörülen			2,00			
∑W ²			413,02			
∑W ² /2n			17,21			
N			12			
SR:√∑W ² /2n			4,15			
Değerlendirme:						
					R Öngörülen > Horrat r, Yöntemin tekrar üretilebilirliği normaldir	

Horrat r= Bulunan Horrat Değeri, R Öngörülen= Öngörülen Horrat Değeri, X1= 1. Cihaz analiz sonucu, X2= 2. Cihaz analiz sonucu, ∑W²= Farkların karelerinin toplamı, N= Toplam analiz sayısı, SR= Tekrar üretilebilirlik standart sapması.

Horrat r= Measured Horrat Value, R predicted= Predicted Horrat Value, X1= Analyse results of the first equipment, X2= Analyse results of the second equipment, ∑W²= The sum of squares of differences, N = Total analyse number, SR= Standart deviation of the reproducibility

Tablo 7. DAD+Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile FAPAS T2775QC numunesi kesinlik kontrolü (Horrat Değeri).

Table 7. Precision control of the HPLC method utilizing DAD+benzoil chloride derivatization by FAPAS T2775QC sample (Horrat Value).

Tekrar Sayısı	X1 (ppm)	X2 (ppm)	W = X1-X2	(X1-X2) ²	[X1-X2]≤R	Değerlendirme
1	219,52	229,14	-9,62	92,50	9,62	Olumlu
2	221,09	231,57	-10,48	109,84	10,48	Olumlu
3	221,34	232,29	-10,96	120,07	10,96	Olumlu
4	221,45	239,26	-17,81	317,09	17,81	Olumlu
5	221,72	241,87	-20,15	405,98	20,15	Olumlu
6	222,06	242,34	-20,29	411,64	20,29	Olumlu
	Ortalama		228,64			
	Standart Sapma		8,71			
	R=Ss*2,83		24,65			
	% RSD		3,41			
	Horrat r<2		1,70			
	R Öngörülen		2,00			
	∑W ²		1457,1			
	∑W ² /2n		60,71			
	N		12			
	SR:√∑W ² /2n		7,79			

Değerlendirme:

Horrat > 1,5

Yöntemin tekrar üretilebilirliği beklenenden yüksektir

Horrat r= Bulunan Horrat Değeri, R Öngörülen= Öngörülen Horrat Değeri, X1= 1. Cihaz analiz sonucu, X2= 2. Cihaz analiz sonucu, ∑W²= Farkların karelerinin toplamı, N= Toplam analiz sayısı, SR= Tekrar üretilebilirlik standart sapması.

Horrat r= Measured Horrat value, R predicted= Predicted Horrat Value, X1= Analyse results of the first equipment, X2= Analyse results of the second equipment, ∑W²= The sum of squares of differences, N= Total analyse number, SR= Standart deviation of the reproducibility.

Tablo 8. Yöntemlerin validasyon parametreleri yönünden karşılaştırılması.

Table 8. Comparison of methods in terms of validation parameters.

Validasyon Parametreleri	FLD + o-Fitaldialdehit türevlendirmesi	DAD + Benzoil klorür türevlendirmesi
Analiz süresi	40 dakika	32 dakika
Histamin Çıkış Zamanı	18-19. dakika	20. dakika
Linearite	Doğrusal	Doğrusal
LOD	1,03 ppm	9,34 ppm
LOQ	1,38 ppm	10,66 ppm
Korelasyon Katsayısı (R)	0,9997	0,9744
Geri Kazanım (%)	% 100	% 88
Gerçeklik (T-testi)	Önemli Fark Yok	Önemli Fark Var
Grubbs Testi	Uygun	Uygun
Yöntemler Arası Karşılaştırma (t-testi)	İki Yöntem Arası Önemli Fark Var	İki Yöntem Arası Önemli Fark Var
Tekrar edilebilirlik	Uygun	Uygun
Tekrar üretilebilirlik (Horrat)	Normal	Beklenenden Yüksek

Tartışma ve Sonuç

Histamin düzeyleri için belirlenen uluslararası kriterler su ürünlerinin pazarlanmasını kısıtlamaktadır. Bu bakımdan balık ve diğer deniz hayvanlarında histamin düzeylerinin resmi ve özel kurumlar tarafından izlenmesi ve kontrolü için hızlı tarama tekniklerinin (test kiti vb.) yanında hassas sonuçlar verebilen doğruluğu kanıtlanmış

güvenilir referans analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması gerekmektedir.

Çalışmada, histaminin tespiti için Özdehan ve Üren (29) tarafından yapılmış DAD dedektör ve türevlendirme ajanı olarak benzoil klorürün kullanıldığı modifiye yöntem ile Antoine ve ark. (2) tarafından yapılmış FLD dedektör ve o-fitaldialdehit türevlendirme ajanı ile ön

kolon türevlendirmesi yapılan HPLC yöntemi kullanılmış ve validasyon parametreleri yönünden karşılaştırılmıştır. Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi için 8,33ppm, 16,65 ppm, 83,3 ppm, 166,65 ppm'lik, o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi için 0,3 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 200 ppm'lik çalışma standartları hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlardan HPLC'de yapılan enjeksiyonlar sonucu standartın çıkış zamanı belirlenmiş ve kromatografik profil ortaya konmuş ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi 18-19 dakika içerisinde pik verirken ve kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının 0,999 olduğu saptanırken, benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminin piki 20 dakikada verdiği gözlenmiş ve korelasyon katsayısı 0,974 olarak bulunmuştur. Her iki yöntemde de kalibrasyon eğrisinin linearitesini belirlemek amacıyla yapılan F testi sonucuna göre kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Smele ve ark. (32), Malle ve ark. (26), Veciana-Nogues ve ark. (40), Eerola ve ark.(7), Luten ve ark. (25) tarafından biyojen aminler üzerine ön kolon türevlendirmesi ve kolon sonrası türevlendirmesi kullanılarak yapılan çalışmalarda analiz sürelerinin 30-60 dakika arasında sonlandığı bildirilmiştir. Çalışmada her iki yöntem için de toplam analiz süresinin ve histamin çıkış süresinin yöntemlerle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tespit ve ölçüm limiti çalışmaları için her iki yöntemde de istavrit balığı numuneleri kullanılmıştır. Teşhis çalışmaları için istavrit balığından homojenize edilerek alınan örnek numune dilue edilmiş standartın görülebildiği son değerde 10 kez paralel olarak HPLC'ye enjeksiyon yapılmış ve dilüsyon faktörleri göz önünde bulundularak mevcut olan LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Buna göre o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde tespit edilen ölçüm limiti (LOQ) 1,38 ppm ve benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde 10,66 ppm olarak tespit edilmiştir. Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile elde edilen LOQ değeri, Vosikis ve ark. (41) tarafından benzer türevlendirme ajanı ve DAD dedektörü kullanılarak yapılan çalışma sonucunda elde edilen 9 ppm'lik değere, Tahmouzi ve ark. (33) tarafından yapılan ve UV-vis dedektör, FLD dedektör ve benzoil klorür ve OPA türevlendirmeleri kullanılmasını konu alan literatürde elde edilen 4,5 ppm'lik LOQ değeri, tez çalışmasında o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile elde edilen değere yakınlık göstermektedir.

Her iki yöntemde de doğruluk çalışmalarında sertifika gerçek değeri 253 ppm olan FAPAS T2775QC (Konserve balık) numunesi kullanılmıştır. Yapılan geri kazanım çalışmaları sonrasında elde edilen sonuçlarda o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminin geri kazanım değeri % 100, benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde ise % 88 olduğu bulunmuştur. Değerlendirme yönünden uygunluk kontro-

lü, AOAC (3)'e göre yapılmıştır. Buna göre ppm düzeyinde konsantrasyonlarda geri kazanım değeri % 80-110 arasında olmalıdır. Bu kriterler çerçevesinde her iki yöntemin de geri kazanım oranı uygun olarak tespit edilmiştir. İki farklı FLD dedektör ve OPA türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminin karşılaştırıldığı Simat ve Dalgaard (31) tarafından ton ve ringa balığı ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri % 99-103 arasındadır. Köse ve ark. (24) tarafından değişik balık türlerinde ELISA ve tez çalışmasına benzer bir HPLC-DAD yönteminin kullanıldığı çalışmadan elde edilen geri kazanım değerleri % 87.7 - % 98 arasındadır. Bu çalışmada o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ve benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile elde edilen tez geri kazanım çalışmalarından sağlanan sonuçlar literatürle örtüşmektedir.

FAPAS T2775QC (Konserve balık) numunesi kullanılarak elde edilen sonuçların değerlendirme yönünden uygunluk kontrolünde, ISO 5725-2'de belirtildiği üzere, her iki yöntem için yapılan paralel çalışmalar da dahil olmak üzere tüm çalışmalarda normal dağılımda sapan verilerin tespit edilmesi için Grubbs Testi, iki yöntemin karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır (21). Sistematik hata (bias), t-testi ve Grubbs Testi hesaplamalarında Microsoft Excel (2007) programı kullanılmıştır. Grubbs Testi değerlendirmesine göre iki yöntemde de verilerin kendi aralarında normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. T-testi değerlendirmesinde o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde saptanan değerlerin sertifikalı referans materyalin gerçek değerine yakın olduğu ve gerçek değerle analiz sonuçları arasında önemli bir fark bulunmadığı, benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde ise, analiz sonuçları ve sertifikalı referans maddenin gerçek değeri arasında önemli bir fark olduğu bulunmuştur. T-testi ile iki yöntem arası farkın ortaya konulması için yapılan çalışmada fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.5$).

Sertifika gerçek değeri 253 ppm olan FAPAS T2775QC (Konserve balık) numunesi her iki yöntem için tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında da kullanılmıştır. Yöntemlere uygun olarak ekstraksiyon sonrası yapılan HPLC'ye enjeksiyonları sonrasında bulunan sonuçlarda değerlendirme yönünden uygunluk kontrolünde ISO 5725-2'de belirtildiği üzere her iki yöntem için yapılan paralel çalışmalar da dahil olmak üzere tekrar edilebilirlik için yapılan tüm çalışmalarda normal dağılımda sapan verilerin tespit edilmesi için Grubbs Testi yapılmıştır. Grubbs Testi sonuçlarına göre, her iki yöntem için elde edilen verilerin dağılımı normaldir. Tekrar edilebilirlik limiti için NMKL (28) rehberine göre kesinlik parametreleri içerisinde, kısa zaman aralığında bir personelin bir analizinin paralel çalışmaları arasındaki farkın önemli olup olmadığının belirlenmesinde F testi kullanılmıştır. F testi sonuçlarına göre her iki yöntemde

de yapılan paralel çalışmalar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Tekrar üretilebilirlik için FLD dedektörlü iki farklı HPLC cihazı ve DAD dedektörlü iki farklı HPLC cihazında o-fitaldialdehit türevlendirmesi ve benzoil klorür türevlendirmesinin kullanıldığı HPLC yöntemleri kullanılarak bir dizi analiz yapılmış ve Horrat Değeri hesaplanmıştır. Yılmaz (43)'a göre yapılan değerlendirme sonucunda benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi için elde edilen sonuçlara göre yöntem tekrar üretilebilirliği beklenenden daha yüksektir. Buna karşılık o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde ise tekrar üretilebilirlik normaldir.

Çalışmalar sonucunda, FLD dedektör ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminin, DAD dedektör ve benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan modifiye HPLC yöntemine göre daha uzun analiz süresine sahip olmasına karşın daha kısa zamanda histamin piki verdiği bulunmuştur. O-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile elde edilen ölçüm limiti değeri benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi ile bulunan değerden daha düşüktür. Yapılan validasyon çalışmalarına bağlı olarak o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde elde edilen geri kazanım oranı diğer yöntemlere göre daha iyidir. İçerisinde bilinen düzeyde histamin bulunan sertifikalı referans materyal ile her iki yöntemde de elde edilen analiz sonuçlarında uygulanan t-testi hesaplamaları iki yöntem arasındaki farkın anlamlı olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0.5$).

Her iki yöntemde de elde edilen verilerle sertifikalı referans materyalin gerçek değeri arasında önemli bir farkın olup olmadığının belirlenmesinde uygulanan t-testi sonucuna göre benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde elde edilen verilerin sertifika değeri ile arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.5$).

O-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde elde edilen veriler sertifika değeri ile uyumludur. Tekrar üretilebilirlik parametresi için FLD dedektörlü iki farklı HPLC cihazı ve DAD dedektörlü iki farklı HPLC cihazında o-fitaldialdehit ve benzoil klorürün kullanıldığı HPLC yöntemleri kullanılarak bir dizi analiz yapılmış Horrat Değeri hesaplanmıştır. Yılmaz (43)'a göre yapılan değerlendirme sonucunda o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde tekrar üretilebilirlik normaldir. Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yöntemi için elde edilen sonuçlara göre yöntem tekrar üretilebilirliği beklenenden daha yüksektir. Benzoil klorür türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminde tekrar üretilebilirlik için ortaya çıkan bu farkın, HPLC cihazlarının rutinde kullanımının fazla olması sonucunda zamana bağlı olarak cihaz hassasiyetinde bir azalma olduğu şekilde yorumlanabilir.

Sonuç olarak, balık ve balık ürünlerinde histamin düzeylerinin tespiti için analiz süresi, uygulanabilirliği, hassasiyeti ve güvenilirliği bakımından rutin analizlerde

FLD dedektör ve o-fitaldialdehit türevlendirmesi kullanılan HPLC yönteminin daha uygun olduğu görülmektedir. Ancak son yıllarda ilerleyen teknoloji ile birlikte türevlendirmeye ihtiyaç duymaksızın, daha düşük limitlerde ölçüm yapmaya imkan tanıyan, daha iyi pik ayrımı sağlayan, hızlı, güvenilirliği % 99 olabilen LC/MS-MS yöntemleri gıda analizlerinde yerini almaya başlamıştır. Bu bakımdan ülkemizde histamin kontrolü yapan kamu ve özel gıda kontrol laboratuvarlarında mevcut olan LC/MS-MS cihazları ile validasyon çalışmaları yapılarak daha hızlı, güvenilir ve hassas yöntemlerin geliştirileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. **Allen DG Jr** (2004): *Regulatory control of histamine production in north carolina harvested mahi-mahi (Coryphaena Hippurus) and yellowfish tuna (Thunnus Albacares): a HACCP-based industry survey*, Thesis submitted to the graduate faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science department of food science, 91.
2. **Antoine FR, Wei CI, Littell RC, Marshall MR** (1999): *HPLC method for analysis of free amino acids in fish using O-Phthaldialdehyde precolumn derivatization*, J Agric Food Chem, **47**, 5100-5107.
3. **AOAC** (1993): *Peer verified methods program, manual on policies and procedures*, Arlington, VA.
4. **Askar A, Treptow H**. (1986): *Biogene amine in lebensmittein vorkommen*, Bedeutung and Bestimmung, Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart, Germany.
5. **Brillantes S, Samosorn W** (2001): *Determination of histamine in fish sauce from Tailand using a solid phase extraction and high performance liquid chromatograph*. Fish Sci, **67**, 1163-1168.
6. **EC Directive** (2007): *L 322/12 EN Official Journal of the European Union*, COMMISSION REGULATION (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 on microbiological criteria for foodstuffs.
7. **Eerola S, Hinkkanen R, Lindfors E, Hirvi T** (1993): *Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages*, JAOAC Int, **76**, 575-577.
8. **EURACHEM** (1998): *The fitness for purpose of analytical methods*, EURACHEM Guide.
9. **FDA** (2001): *Fish and Fisheries Product Hazards and Controls Guidance*, 3rd Edition. Food&Drug Administration, Center for Food Safety&Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC, USA.
10. **Fraizer, W. C, Westhoff, D. C.** (1978): *Contamination, preservation and spoilage of fish and other seafoods*. Food Microbiology, McGraw Hill Book Company. 244-254.
11. **Gloria MBA, Daeschel MA, Craven C, Hilderbrand Jr KS** (1999): *Histamine and other biogenic amines in albacore tuna*, J Aquatic Food Prod Technol, **8**, 55-69.
12. **Gökoğlu N, Varlık C** (1995): *Sardalya konservelerinin histamin biyojen amini yönünden incelenmesi*, Gıda, **5**, 273-279.
13. **Grubbs FE, Beck G** (1972): *Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations*, Technometrics, **14**, 847-854.

14. **Gün H, Varlık C, Gökoğlu N** (1992): *Su ürünlerinde kalite kontrolü*, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Seminer Tebliği, İstanbul Beyoğlu Rotary Kulübü Yayınları, 90-96.
 15. **Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W** (1994): *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*. Trends Food Sci Tech, **5**, 42-49.
 16. **Horwitz W, Albert R** (2006): *The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision*. JAOAC, **89**, 1095-1109.
 17. **Hungerford JM** (2010): *Scombroid poisoning; a review*. Toxicol, **56**, 231-243.
 18. **Huss HH, Reilly A, Embarek P** (2000): *Prevention and control of hazard in seafood*. Food Control, **11**, 149-156.
 19. **Huss HH, Ababouch L, Gram L** (2003): *Assessment and management of seafood safety and quality*. FAO Fisheries Technical Paper, 444.
 20. **Hwang DF, Chang SH, Shiau CY, Chai T** (1997): *High performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning*. Journal of Chromatography B, **693**, 23-30.
 21. **ISO 5725-2** (1994): *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- part 2. basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.
 22. **Joosten HMLJ** (1988): *The biogenic amine contents of dutch cheese and their toxicological significance*. Neth Milk Dairy, **41**, 25-42.
 23. **Köse S, Boran M, Yaylı N, Tufan B** (2011): *Geleneksel balık ürünlerinde amin ve nitrozaminlerin kontrol ve izleme sistemleri*, TÜBİTAK Proje No: 107O327.
 24. **Köse S, Kakhkaya N, Koral S, Tufan B, Buruk KC, Aydın F** (2011): *Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method*. Food Chemistry, **125**, 1490-1497.
 25. **Luten JB, Bouquet W, Seuren LAJ, Burggraaf MM, Reikwel-Booy G, Durand P** (1992): *Biogenic amines in fishery products: standardization methods within EC*. In Huss, H. H, Jacobsen, M, Liston J. (Eds.), Quality Assurance in Fishery Industry. 427-439.
 26. **Malle P, Valle M, Bouquelet S** (1996): *Assay of biogenic amines involved in fish decomposition*, JAOAC Int, **79**, 43-49
 27. **Metin S, Varlık C** (1997): *Taze ve soğukta depolanan gökkuşağı alabalığı'nın (Oncorhynchus mykiss) fiziksel ve kimyasal parametrelerinin incelenmesi, II. soğukta depolanan gökkuşağı alabalığının fiziksel ve kimyasal parametrelerinin belirlenmesi*. Gıda ve Teknoloji, **1**, 5-12.
 28. **NMKL** (2009): *Validation of chemical analytical methods*, NMKL Procedure No:4.
 29. **Özdestan Ö, Üren A** (2009): *A method for benzoyl derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography*. Talanta, **78**, 1321-1326.
 30. **Pala M, Karakuş M** (1991): *Gıda sanayinin gelişme perspektifinde Yeni Yönelimler*, Bursa II. Uluslararası Gıda Sempozyumu, 1-3 Ekim 199,1 Bursa, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 1-14.
 31. **Simat V, Dalgaard P** (2011): *Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood*. LWT-Food Science and Technology, **44**, 399-406.
 32. **Smela D, Pechova P, Komprada T, Klejdus B, Keban V** (2003): *Liquid chromatography determination of biogenic amines in meat and meat product during fermentation and long-term storage*. Czech Journal of Food Science, **21**, 167-175.
 33. **Tahmouzi S, Khaksar R, Ghasemlou M** (2011): *Development and validation an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (Katsuwonus pelamis)*. Food Chemistry, **126**, 756-761.
 34. **Tao Z, Sato M, Han Y, Tan Z, Yamaguchi, T, Nakano T** (2011): *A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination*. Food Control, **22**, 1154-1157.
 35. **Türker S** (1997): *Hayvansal gıdalarda kalite kontrolü*, Tamer Matbaacılık, Ankara, 103-111.
 36. **Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği** (2011): Resmi Gazete. 29 Aralık 2011, Sayı: 28157 (3. Mükerrer)
 37. **Uğur M, Nazlı B, Bostan K** (1996): *Genel besin hijyeni ders notları*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul. 2-45.
 38. **Varlık C, Heperkan D** (1990): *Hamsinin buzda muhafazası*. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, **4**, 53-58.
 39. **Varlık C, Uğur M, Gökoğlu N, Gün H** (1993): *Su ürünlerinde kalite kontrol, ilke ve yöntemleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, İstanbul, IX.
 40. **Veciana-Nogues MT, Hernandez-Jover T, Marine-Font A, Vidal-Carou MC** (1995): *Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products*. JAOAC Int, **78**, 1045-1050.
 41. **Vosikis V, Papageorgopoulou A, Economou V, Frillingos S, Papadopoulou C** (2008): *Survey of histamine content in fish samples randomly selected from greek retail market*. Food Additives and Contaminants, Part B, **1**, 122-129.
 42. **Winer BJ** (1962): *Statistical principles in experimental design*, McGraw –Hill.
 43. **Yılmaz A** (2012): *Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu*. TURKLAB Rehber No 01.
- Geliş tarihi: 15.12.2014 / Kabul tarihi: 14.04.2015
- Yazışma adresi:**
Dr. Deniz Turan
Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı,
Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü,
İzmir / Türkiye.
e-mail: denizdemirkiran@yahoo.com