

BÓKA BEÁTA* – NAGY ANNAMÁRIA* – KISS ATTILA*

ÉLELMISZEREK BIOGÉN AMIN TARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA HPLC TECHNIKÁVAL

Abstract

Biogenic amines are important nitrogen-containing compounds of high biological importance in vegetable, microbial and animal cells. Although they are essential to living organisms, consumption of food containing high amounts of them may have toxicological effects. High amounts of certain amines may be found in food as a consequence of poor quality raw materials, contamination and inappropriate conditions during food processing and storage. Therefore biogenic amine, especially putrescine, cadaverine and histamine content in food can be considered as a freshness marker and could be used as an indicator of microbial spoilage.

The aim of our work is to develop an HPLC method for quantitative determination of biogenic amines in food products. The chromatographic separation was carried out on a C₁₈ column using a water-acetonitrile elution gradient. UV-detection at 254 nm could be used after pre-column derivatisation with dansylchloride. In case of wines and beers determination can be done without any other sample pre-treatment, while the amine content of solid food samples need to be extracted with acid aqueous solution. 0.4 M HClO₄, 5% trichloroacetic acid (TCA), 0.1 M HCl solutions and phosphate buffer pH=7 were tested as extraction solution, and then 0.4 M HClO₄ was selected. The method was applied for analysis of different wine, beer, cheese, meat, sausages and fish samples. The detected levels of biogenic amines are below the amounts considered to have an adverse effect on human health.

Bevezetés és célkitűzés

A biogén aminok kis molekulatömegű szerves bázisok, amelyeknek biológiai aktivitásuk van. Némelyüket csak a mikroorganizmusok képesek előállítani. Bár a szervezetnek is szükségesek, nagy mennyiségben azonban toxikus hatásúak, allergia

* Eszterházy Károly Főiskola, EGERFOOD Regionális Tudásközpont, Eger Leányka út 6.

giás reakciókat okozhatnak. A legismertebb a hisztamin mérgezés, amelyet romlott hal, vagy túlérett sajt fogyasztásakor tapasztaltak. Egyéb biogén aminok, mint például a putreszcin jelenlétében, a hisztamin humán toxicitása fokozódik, mivel ezek a potenciátoroknak nevezett anyagok gátolják a hisztamin lebontásában szerepet játszó enzimeket, a diamin oxidázt és a hisztamin metil-transzferázt. A biogén amin tartalmat meghatározva a potenciális egészségkárosító hatás mellett az élelmiszer minőségéről, frissességéről, higiéniai állapotáról is információ nyerhető. A biogén aminok egyes élelmiszerek, például erjesztéssel előállított, illetve savanyítással tartósított tejtermékek és húskészítmények kis mennyiségben előforduló, természetes összetevői; nagyobb mennyiségben azonban az élelmiszer nem megfelelő tárolása, feldolgozása során képződnek különféle mikrobák hatására a fehérjék és aminosavak degradációja következtében (Silla Santos, 1996).

Élelmiszerek biogén amin tartalmának meghatározása sokféle módszerrel lehetséges, melyekről nemrégiben egy összefoglaló is megjelent (Önal, 2007). Az analízishez a különféle kromatográfiai technikák (TLC, GC, CE, HPLC) közül a legelterjedtebb a HPLC módszer alkalmazása. A biogén aminok detektálása során a kromofórok hiánya miatt UV-spektrofotometriás detektor közvetlenül nem használható. Gyakori a kromatográfiai elválasztás előtti, vagy utáni származékképzést követő fluorimetriás detektálás. Danzil- vagy dabzil-klorid származékképző alkalmazásával spektrofotometriás detektálás is megvalósítható. A danzil-származékokat számos szerző C₁₈ töltetű oszlopon, különféle gradiens elúció segítségével választott el: Jeya Shakila és munkatársai (2001) metanol-víz gradienst alkalmaztak, de ennél sokkal elterjedtebb az acetonitril és víz (Innocente et al. 2007; Yongmei et al. 2007, mo Dugo et al. 2006; Vallé et al. 1997, Moret et Conte 1996; Moret et al. 2005) illetve az acetonitril és 0,1M koncentrációjú ammónium-acetát oldat használata (Alberto et al. 2002, Mah et al. 2002; Vinci et Antonelli 2002).

Célunk élelmiszerek biogén amin tartalmának meghatározására alkalmas módszer kidolgozása volt. Vizsgálataink során Moret és munkatársai által közölt módszerből (Innocente et al. 2007; Moret et Conte 1996; Moret et al. 2005) indultunk ki, amit számos lépésnél jelentősen módosítottunk. Módszerünket végül különféle folyékony és szilárd élelmiszerminták analízisére használtuk.

Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek

Felhasznált anyagok és vegyszerek

A kísérletekhez felhasznált analitikai tisztaságú vegyszereket (triptamin, putreszcin, kadaverin, hisztamin, tiramin, spermidin, spermin, 1,7 diaminohéptán) és a HPLC analízishez használt HPLC gradiens tisztaságú acetonitrilt, valamint a danzil-kloridot (DCI) a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. A vizsgálata-

tok során Milli-Q-készülékkel (Millipore, Badford, MA, USA) ioncserélt, desztillált vizet használtunk.

Standard minták előkészítése

A kereskedelmi forgalomból beszerzett aminokból ismert koncentrációjú (0,1 mg/ml) standard oldatot készítettünk, melyhez - a valós mintákhoz hasonlóan- ismert mennyiségű belső standardot (1,7 diamino-heptánt) is adtunk. Ezen standard törzsoldatból 10-100-szorosára hígított, ismert koncentrációjú mintasorozat mérésével kalibrációs görbét készítettünk, amelyet későbbiekben a valós minták analízise során a kiértékeléshez alkalmaztunk. A hígított standard oldat 1,00 ml-éhez 1,00 ml DCI reagenst adtunk (20 mg/l, acetonban oldva), és a reakcióelegyet 40⁰C-on 60 percig sötétben inkubáltuk. A származékképzési reakció csak erősen lúgos közegben játszódik le, ezért a reakcióelegy pH-ját minden esetben ellenőriztük és szükség esetén 1 M-os NaOH oldattal 11,0-re állítottuk. A komplex elegyhez a DCI reagens felesleg eltávolítására 0,200 ml L-prolin oldatot adtunk (100 mg/ml), az elegyet 1 percig vortexeltük, majd sötétben szobahőmérsékleten 15 percig reagálni hagytuk. Az így kapott minta pH-ját injektlás előtt ellenőriztük, szükség esetén pH=7-re állítottuk, majd 60% acetonitrilt adtunk hozzá.

Élelmiszer minták előkészítése

Italok

Az analitikai vizsgálatokat négy fajta bor (Ezerjő, Hárslevelű, Cabernet, Medock) és hatféle (háromféle világos, egy barna, egy alkoholmentes és egy kalóriaszegény) sör mintával végeztük el.

Az italokhoz szűrést, centrifugálást követően ismert mennyiségű belső standardot adtunk, az így kapott minta 0,500 ml-éhez 0,500 ml danzil-klorid oldatot (20 mg/ml, acetonban oldva) adtunk, majd a pH-t 11-re állítottuk 1,0 M-os NaOH segítségével. A 60 perces 40⁰C-on, sötétben történő inkubáció után a mintához a feleslegben maradt DCI-reagens eltávolítása céljából 0,200 ml L-prolin oldatot (100 mg/ml) adtunk, és fél perc vortexelés után 15 percre sötétbe helyeztük. A kromatográfias vizsgálat előtt pH=7-8-ra állítottuk a minták pH-ját, 60% acetonitrilt adtunk hozzá, majd centrifugáltuk (14 000 g, 2 perc).

Szilárd élelmiszerek

A vizsgálatokhoz különféle húsokat (sertés, marha, csirke és hal), öt különböző gyártmányú párizsit (pulyka, baromfi, sertés, marha, füstölt), valamint négyféle sajtot (trappista, mozzarella, camembert, füstölt) választottunk, és fris-

sen, valamint 5-7 napig hűtőben történő állás után vizsgáltuk biogén amin tartalmukat. A szilárd valós mintákat ledaráltuk, majd különféle savakkal (0,4 M perklórsav, 5% triklórecetsav, 0,1 M HCl) illetve 7-es pH-jú foszfátpufferrel feltártuk. 50 ml-es centrifugacsőben 10-10 g darált mintához 20 ml feltáró oldatot adtunk, két percig ICA Ultra Turrax készülékkel maximális fordulatszámon homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (6000 g, 5 perc). A vizes fázist gyűjtöttük, majd a homogenizálást illetve a centrifugálást megismételtük. A két vizes fázist egyesítettük, szűrtük, majd mérőlombikban 50 ml-re egészítettük ki.

A származékképzési reakció a korábban leírt módon történt.

Kromatográfiai körülmények

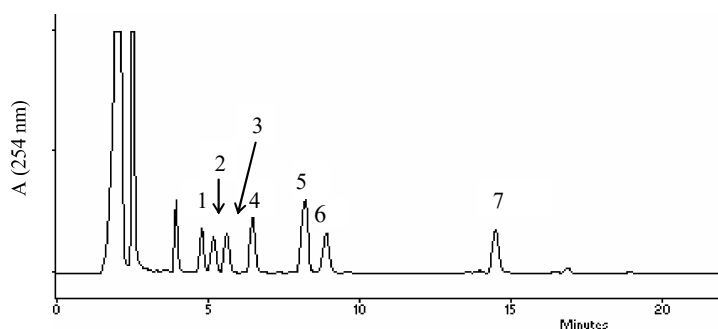
Az LC-10AD és LC-10AS pumpával és SPD-10-A UV-VIS detektorral felszerelt SHIMADZU HPLC készülékhez WATERS Nova Pak C-18 (6x250 mm, 4 μ) kolonnát csatlakoztattunk. Az eluens összetétele: A oldat: ioncserélt, desztillált víz, B oldat: gradiens HPLC minőségű acetonitril.

A fordított fázisú kromatográfiai elválasztás hatékonyságát gradiens elúciós technika alkalmazásával fokoztuk. 0,80 ml/perc eluensáramot és víz-acetonitril gradienst alkalmaztunk az alábbi program szerint: kezdetben az eluens 65% acetonitrilt tartalmazott, majd az eluens acetonitril-tartalmát a kezdeti 65%-ról 1 perc alatt 80%-ig, majd a következő 12 percben 90%-ra növeltük. A 16. percben az eluens acetonitril-tartalmát 100%-ra növeltük, majd tartottuk a 23. percig, végül a 24. percben 100%-ról 65%-ra csökkentettük, s ezen az értéken tartottuk a program végéig (35 perc). A 254 nm hullámhosszhoz tartozó abszorbanciát fotometriásan követtük.

Eredmények

A kromatográfiai elválasztás során lényeges az anyagok protonáltsági állapota. Moret és munkatársai (2005) azonban nem tesznek említést a vizsgált minták pH-járól, ezért tanulmányoztuk a pH hatását: A minta pH-ját az oszlopra injektálás előtt hatféle értékre állítottuk. Savas (pH = 3, 4, 5) minta esetén eltérő csúcs alatti területeket kaptunk, mint lúgos (pH = 7, 8, 11) tartományban. Ennek oka, az aminok eltérő protonáltsági állapotában keresendő: savas közegben, a protonált, így pozitív töltésű aminok a C₁₈ oszlopon visszatartás nélkül keresztül haladnak, nem különülnek el megfelelően az oszlopon. A kapott adatok összevetésével a legmegfelelőbbnek a gyengén lúgos (7-8) pH bizonyult.

Az 1. ábrán egy standard minta esetén kapott kromatogram látható. Megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott körülmények között a meghatározni kívánt aminok csúcsai jól elkülönülnek egymástól.



1. ábra: Standard minta HPLC-kromatogramja: 1-putreszcin, 2-kadaverin, 3-hisztamin, 4-belső standard, 5-tiramin, 6-spermidin, 7-spermin

Az ismert koncentrációjú mintasorozat segítségével kalibrációs görbét készítettünk: az adott komponens csúcsterületét a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az R^2 értékek alapján a kísérleti pontokra jó közelítéssel egyenesek illeszthetők, melyek paramétereit (meredekség, tengelymetszet) az alábbi táblázat foglalja össze.

1. táblázat A kalibrációs egyenesek jellemzői

Biogén aminok	meredekség	tengelymetszet	R^2
putreszcin	1,012 E+08	3,436E+03	0,9877
kadaverin	1,022 E+08	2,598E+04	0,9892
hisztamin	2,950 E+06	1,632E+04	0,9796
tiramin	1,046E+08	4,358E+04	0,9930
spermidin	1,021E+08	-1,438E+05	0,9927
spermin	1,057E+08	-2,276E+05	0,9889
belső standard	1,745E+08	-1,002E+05	0,9932

Valós minták vizsgálata során eltértünk a Moret és munkatársai által leírt minta-előkészítéstől. A származékképzési reakciót követően közvetlenül injektáltuk a mintát, elhagytuk a szerzők által javasolt tisztítási lépést, a hosszadalmas, és nagy mérési hibát okozó éteres extrakciót, majd az éteres fázis nitrogén-áram alatti bepárlását, és acetonitrilben történő visszaoldását. Tapasztalataink szerint a származékképzési reakciót követően 30% acetonitrilt adva a mintához tiszta, csapadékmentes oldatot kapunk. A későbbiekben az acetonitril mennyiségét 65%-ra növeltük, mivel az elúció során a gradiens program ilyen összetétellel indul.

Vizsgáltuk az élelmiszer-mátrixból az egyes aminok kinyerésének hatásfokát: a mintákhoz ismert mennyiségben aminokat adva is elvégeztük a kivonást és

mennyiségi meghatározást. Tapasztalataink szerint a módszer hisztaminra egyes élelmiszerek esetén nagyon magas értéket ad, valószínűleg az élelmiszermintában lévő zavaró anyagok miatt, ezért e cikkben a hisztaminra kapott eredményeket nem tüntettük fel. E kérdés tisztázásához további, LC-MS vizsgálatokat tervezünk.

A vizsgált sörmintákban kimutatott biogén aminok mennyiségét a II. táblázat foglalja össze. Két minta kivételével mindegyik sörben mérhető mennyiségben volt jelen putreszcin, a többi mért biogén aminhoz képest meglehetősen nagy koncentrációban. Kiemelkedően magas tiramin-tartalom (64mg/l) jellemzi a kalóriaszegény sört. Nagy mennyiségben (35 mg/ml) tartalmaz tiramint az egyik világos sör is, a többi minta viszont csak igen alacsony koncentrációban. A spermidin és spermin koncentráció közel azonos volt minden mintában.

II. táblázat A vizsgált sörök biogén amin tartalma (mg/l)

	putreszcin	kadaverin	tiramin	spermidin	spermin
világos sör 1	-	6	34,7	7,8	8
világos sör 2	51	5,5	0,1	8,7	10
világos sör 3	81,5	11,3	4,3	10,3	12
barna sör	-	11,2	4,2	7,8	8,5
alkoholmentes sör	2	15,8	0,7	8	9,3
kalóriaszegény sör	161,3	6	63,6	7,2	9

- nem kimutatható

A vizsgált borok közül a Cabernet tartalmazott a legtöbb biogén amint: 136,6 mg/l putreszcint, 13,6 mg/l kadaverint, és 2,3 mg/l tiramint. A Hárslevelűben viszont a három biogén amin közül egyiket sem találtunk kimutatható mennyiségben. A Medock vörös borban és az Ezerjóban a kadaverin koncentrációja közel azonos (6, illetve 5,7 mg/l) volt. Spermidint és spermint hasonló mennyiségben (6,0–10,0, illetve 8,8-11,0 mg/l) tartalmazott mind a négy bor.

A szilárd valós minták esetén vizsgáltuk a minta-előkészítés hatását a mért értékekre. A feltárást többféle módon elvégeztük: 0,4 M perklórsav, 5% triklórecetsav, 0,1 M HCl illetve 7-es pH-jú foszfátpuffer oldatot használva. Mivel a sósavval végzett feltárási húsminták esetében zselészerű anyag képződését eredményezte, ezért ezt a kivonási módszert a későbbiekben nem alkalmaztuk. A három további feltárási módszer (perklórsavas, triklórecetsavas, foszfátpufferes) lényegesen eltérő értékeket nem eredményezett a mérés során. A kapott adatok alapján a perklórsavas módszer bizonyult legalkalmasabbnak.

A III. táblázat a vizsgált szilárd élelmiszerek biogén amin tartalmát foglalja össze.

III. táblázat Szilárd élelmiszerek biogén amin tartalma (mg/kg)

Élelmiszer	putreszcin	kadaverin	tiramin	spermidin	spermin
marhahús (0 napos)	-	17,6	-	38	65,8
marhahús (5 napos)	-	298,3	437,8	47,1	82
tengeri halfilé (0 napos)	-	3,1	0,0	31,2	43,4
tengeri halfilé (1 hetes)	-	-	173,4	36,3	46,8
hal (filézetlen)	6,0	1,0	52,2	30,6	44,1
sertéshús (0 napos)	15	4,9	44	28,7	46
sertéshús (5 napos)	33,1	79	81,7	38	57,3
baromfihús	-	17,5	-	33,2	69,2
kolbász	-	132	270	42,6	72,5
sajt (trappista)	48	14	19,7	37	55
sajt (mozzarella)	-	-	350	33,7	46,4
sajt (füstölt)	38,8	15,4	66	39	45,4
sajt (camembert)	10,1	4,0	-	40,8	44,6
párizsi (füstölt, pulyka)	13,5	53,2	28,2	49	90
párizsi (baromfi)	7,1	-	28	44,5	55
párizsi (sertés)	54,7	-	-	39,6	50,2
párizsi (sertés 2)	8,2	0,5	9,0	32,2	50,9
párizsi (marha)	30	16,4	36	47,2	72,3

-nem detektálható

Vizsgáltuk néhány sertés-, baromfi- illetve marhahús, valamint hal minta biogén amin tartalmát vásárlás után, valamint öt-hétnapi, 4⁰C-on történő tárolást követően. Méréseink szerint a kadaverin és a tiramin koncentrációja jelentősen, a többi amin mennyisége viszont kevéssé változott a hűtőben való tárolás során.

A vizsgált sajtok közül egy mintában (mozzarella) kiugróan magas tiramin tartalmat állapítottunk meg. A füstölt sajtban pedig az átlagosnál nagyobb volt a putreszcin és a tiramin mennyisége. A különböző felvágott minták biogén amin tartalma jelentősen eltért egymástól. A füstölt mintának volt a legmagasabb az összes biogén amin tartalma. A spermidin és spermin mennyisége a vizsgált italokhoz hasonlóan a szilárd élelmiszerek esetében is közel azonos volt minden mintában.

Összefoglalás

Élelmiszerek biogén amin tartalmának mennyiségi meghatározására HPLC módszert dolgoztunk ki, melynek során C₁₈ oszlopon acetonitril-víz gradiens segítségével választjuk el a minta összetevőit. A kromatográfiás elválasztás előtt danzil-klorid származékképzőt alkalmazunk, amely 254 nm-en UV-detektálást tesz lehetővé. Borok és sörök esetén a származékképzési reakció előtt a minta szűrésén, centrifugálásán kívül egyéb minta-előkészítés nem szükséges, ellenben szilárd élelmiszerminták esetén a savas feltárás, az aminok extrakciója elengedhetetlen. A módszerrel meghatároztuk különféle élelmiszerminták: két fehér- és

két vörösbor, hatféle (világos és barna, alkoholmentes és kalóriaszegény) sör, különféle húskok (sertés, marha, csirke, hal) öt különböző gyártmányú párizsi (pulyka, baromfi, sertés, marha, füstölt) és négyféle sajt (trappista, mozzarella, füstölt, camembert) biogén amin tartalmát. Említést érdemel, hogy egyik vizsgált élelmiszer sem tartalmazott egészségre káros mennyiségben biogén aminokat.

Irodalom:

- Alberto, M. R., Arena, M. E., Manca de Nadra, M. C. (2002): A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines, *Food Control*, **13**, 125–129.
- Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M., Moret, S. (2007): Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatisation of acid extract, *Food Chemistry*, **101**, 1285–1289.
- Jeya Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., Kumudavally, K. V. (2001): A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products, *Food Chemistry*, **75**, 255–259.
- Mah, J-H., Han, H-K, Oh, Y-J., Kim, M-G, Hwang H-J. (2002): Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products, *Food Chemistry*, **79**, 239–243.
- mo Dugo, G., Vilasi, F., La Torre, G. L., Pellicanò, T. M. (2006): Reversed phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines, *Food Chemistry*, **95**, 672–676.
- Moret, S., Conte, L. (1996): High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods, An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics, *Journal of Chromatography A*, **729**, 363–369.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., Conte, L. S. (2005): A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables, *Food Chemistry*, **89**, 355–361.
- Önal, A. (2007): A review: Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, **103**, 1475–1486.
- Silla Santos, M. H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal Food Microbiology*, **29**, 213–231.
- Yongmei, L., Xin, L., Xiaohong, C., Mei, J., Chao, L., Mingsheng, D. (2007): A survey of biogenic amines in Chinese rice wines, *Food Chemistry*, **100**, 1424–1428.
- Vallé, M., Malle, P., Bouquelet, P. (1997): Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Amines in Fish, *Journal of AOAC International*, **80**, 49–56.
- Vinci, G., Antonelli, M. L. (2002): Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat, *Food Control*, **13**, 519–524.