

Biogén aminok meghatározása túlnyomásos rétegekromatográfiás módszerrel

Kovács Ágnes¹, Simonné Sarkadi Livia¹ és Mincsovics Emil²

¹BME, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest

²OPLC-NIT Kft, Budapest

Érkezett: 1997. január 25.

Az élelmiszertudomány területén egyre nagyobb a jelentősége egyes kis mennyiségben előforduló komponensek vizsgálatának, amelyek az emberi szervezetre káros hatásúak lehetnek.

Ilyen kis mennyiségben előforduló vegyületek a biogén aminok, amelyek szinte minden élelmiszerben megtalálhatók. A szakirodalomból egyre többször értesülhetünk olyan esetekről, amikor nagyobb mennyiségük mérgezést okozott (pl. sajt vagy hal által okozott hisztamin mérgezések) [1-3].

A biogén aminok aminosavakból keletkeznek mikroorganizmusok aminosav dekarboxiláz enzimjeinek működése révén. Emiatt veszélyforrást jelenthetnek a fermentációval készülő termékek (sajt, szalámi, bor stb.), valamint a nem megfelelő higiéniai állapotú, baktériumokkal szennyezett élelmiszerek. Ezért az egészségvédelmi szempontok mellett a biogén aminok mennyisége alkalmas a termék frissességének a jellemzésére is.

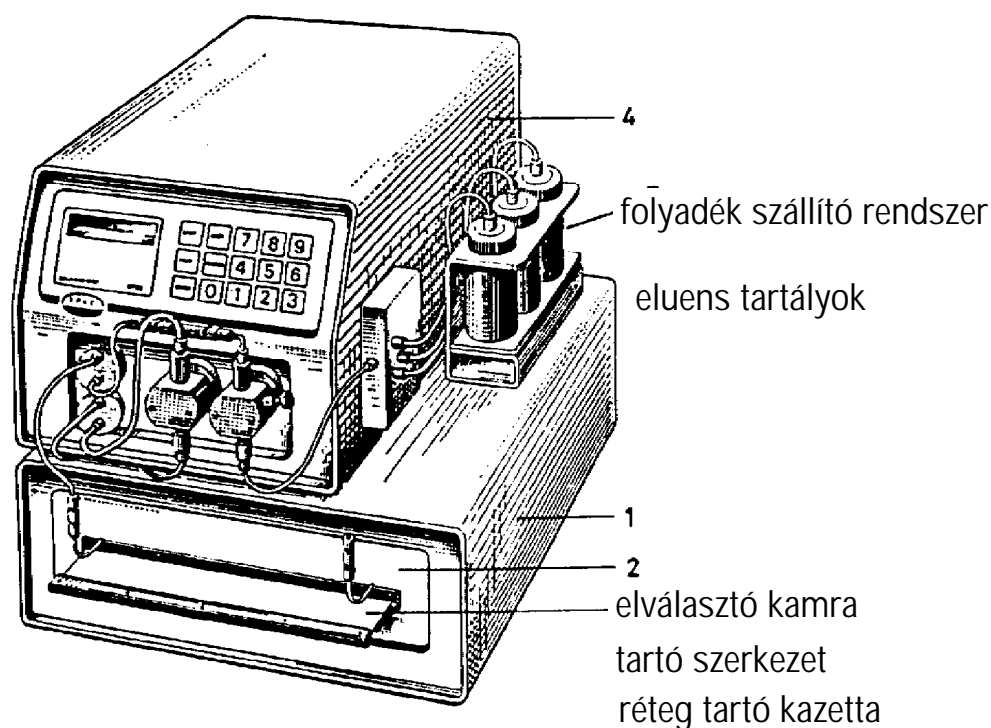
A biogén aminok meghatározására az irodalomban különböző analitikai módszerek ismeretesek [4], így vékonyrétegekromatográfia [5-7], HPLC [8], gázkromatográfia [9], kromatográfia aminosavanalizátorral [10, 11].

Az utóbbi években magyar kutatók által kifejlesztett túlnyomásos rétegekromatográfiás készülék egy új, nagyon hatékony eszköze a rétegekromatográfiás vizsgálatoknak [12].

A túlnyomásos rétegekromatográfia egy sík elrendezésű kromatográfiás technika, ahol a szorbensréteg külső felületi nyomás alá helyezésével a mozgó fázis nyomás hatására az álló fázison keresztül áramoltatható. Ez a technika lehetővé teszi az eluens áramlási sebességének állandó értéken tartását, és így hatékony

elválasztás végezhető finomszemcsés réteglapon rövid idő alatt, hosszabb távolságon is. A zárt kamra miatt a környezeti hatások kevésbé érvényesülnek, így a hagyományos vékonyréteg-kromatográfiához képest a reprodukálhatóság javul.

A Chrompress 10 és Chrompress 20 készülék után az OPLC technika legújabb változata a Personal OPLC, amely 5MPa maximális nyomással üzemeltethető (1. ábra). A készülék egy folyadék szállító rendszerből és egy elválasztó kamrából áll. Három eluens tartályt tartalmaz, melyekből egy váltószelep segítségével az eluens program szerint adagolható, így lépcsős gradiens elúció is megvalósítható. Az elválasztó kamra kazetta rendszerű. A készülék működését számítógép vezérli, a kromatográfiás kifejlesztés teljesen automatikus és ezáltal jó a reprodukálhatóság. A maximális felületi nyomás, az eluens térfogat és áramlási sebesség programozható, a kifejlesztési időt a számítógép a beírt adatokból számolja.



1. ábra: Personal OPLC BS50 készülék

Célunk az volt, hogy a túlnyomásos rétegekromatográfia legújabb változatával, a Personal OPLC készülékkel (POPLC BS-50, OPLC-NIT Kft., Budapest) dolgozzunk ki módszert az élelmiszerkémiai szempontból legfontosabb biogén aminok (tiramin, hisztamin, putreszcin, spermidin, spermin, kadaverin, agmatin) elválasztására.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Standardok: spermidin, spermin, putreszcin, hisztamin, tiramin, kadaverin hidroklorid, agmatin szulfát formában (Sigma, St. Louis, Mo., USA). Az aminokból 1, 2, 4, 6, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú standard oldatokat készítettünk.

Élelmiszerminták: sajt, karfiol.

Extrakció: Az élelmiszermintákból a biogén aminok extrakciója 7 %-os perklórsav oldattal (5 g minta / 15 cm^3 PCA oldat) 1 órán keresztül, rázatással történt Thys 2 típusú rázógéppel. Centrifugálás után a szűrtetet dolgoztuk fel.

Származékképzés: 500 μl extraktumhoz 1000 μl danzil-klorid (Sigma) oldatot (5 mg/cm^3 acetonban oldva) és 500 μl telített Na-karbonát oldatot adtunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten sötét helyen tároltuk. A reagens-felesleg eltávolítására 200 μl prolin oldatot (100 mg/cm^3) adtunk az elegyhez, majd 30 percre ismét sötét helyre tettük. A danzil-aminok extrakciója 2 x 1 cm^3 benzollal történt. A standard oldatok danzilezését hasonlóképpen végeztük.

Kromatográfia: a kromatográfias elválasztáshoz Personal OPLC BS 50 (OPLC-NIT Kft, Budapest) készüléket, 20x20 cm-es HPTLC szilikagél 60 F_{254} réteglapokat (Merck, Darmstadt) alkalmaztunk. A mintákból és a standard oldatokból 5 - 5 μl -t vittünk fel a rétegre Chrompress-s OE506/1 típusú kézi mintafelvívővel.

Denzitometria: A lapok értékelését Desaga SD60 (Desaga, Heidelberg, Németország) típusú denzitométerrel, 313 nm hullámhosszon végeztük.

Eredmények

Az eluensrendszer optimalizálása a Prizma modell szerint történt [13]. Első lépésben a megfelelő oldószereket választottuk ki, majd ezután az elválasztás szempontjából megfelelő arányú keveréküket kerestük meg.

Az eluensek kiválasztása a Snyder szerinti csoportosítás alapján [14] végeztük. A 8 különböző szelektivitású - egymástól proton-

donor, proton-akceptor és dipol kölcsönhatásban különböző - csoportból egy-egy oldószert próbáltunk ki:

dibutil-éter (I.csop.)

1-butanol (II.csop.)

ecetsav (IV.csop.)

diklór-metán (V.csop.)

etil-acetát (VI.csop.)

toluol (VII.csop.)

nitrometán (VIII.csop.)

kloroform (VIII.csop.)

Az R_f értékek alapján a legjobbnak a hexán - butanol elegyet találtuk. Ebben a rendszerben azonban a mintákban jelenlevő NH_3 a kadaverinnel azonos R_f értéket mutatott, a tiramin pedig nagyon távol helyezkedett el a többi biogén amintól. Az elválasztás javítására az eluenshez kis mennyiségben trietilamint adtunk. Az R_f értékek változását a hozzáadott trietilamin mennyiségének függvényében az 2. ábra mutatja. A trietilamin mennyiségének növelésével az R_f értékek csökkentek, és a komponensek elhelyezkedése egyenletesebb lett. Ez alapján a biogén aminok elválasztásához a következő eluensrendszert választottuk: hexán-butanol = 9:1 + 7,5 % trietilamin. A retenciós értékek javításához az eluens túlfuttatására volt szükség.

A Personal OPLC készülékben lehetőség van gradiens elucióra is, így a leglassabban eluálódó amin retenciós faktor értéke a kis mennyiségben hozzáadott erősebb eluenssel növelhető (hexán-butanol = 8:2).

Ezek alapján a következő kísérleti körülményeket alkalmaztuk a biogén aminok meghatározásához:

Ext. Press: 50 bar (Külső nyomás)

E FLR: 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Eluens térfogatáramlási sebessége)

Vol R: 200 μl (Gyors eluensadagolás térfogata)

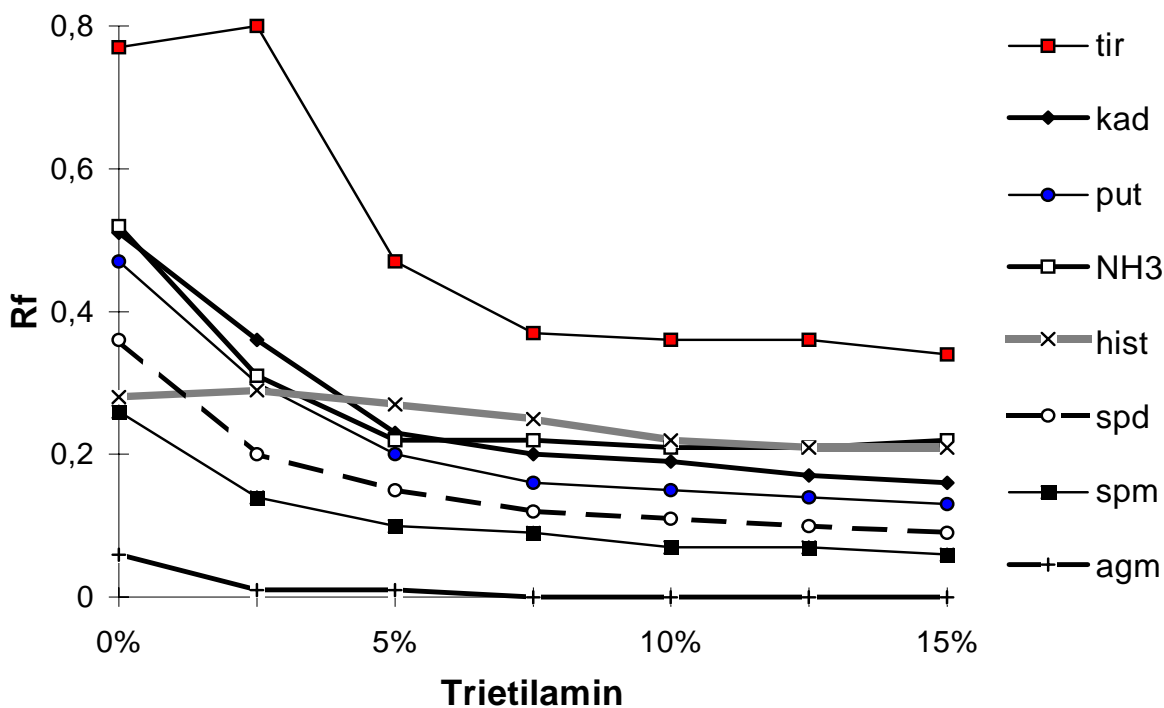
A Vol: 11500 μl (A eluens mennyisége, hexán-butanol-trietilamin=90:10:9,1)

B Vol: 800 μl (B eluens mennyisége, hexán-butanol = 8:2)

A* Vol: 800 μl (Visszaállási térfogat)

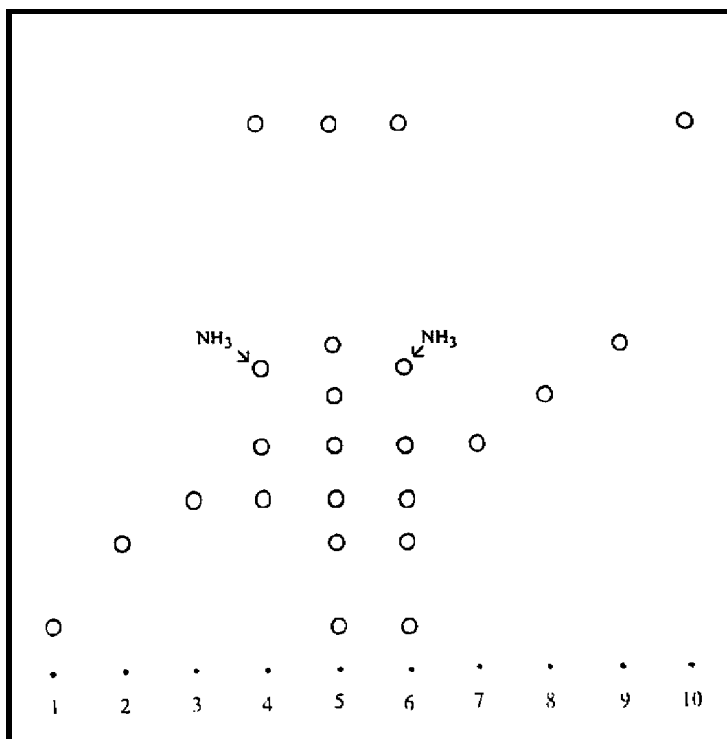
Kifejlesztési idő: 26,26 min

Maximális eluensnyomás a kifejlesztés végén: 4 bar



2. ábra: Hexán-butanol (9:1) rendszerhez adott trietil-amin mennyiségének hatása a biogén aminok R_f értékére

Az elválasztás sematikus rajza a 3. ábrán látható.



3. ábra: Danzilezett biogén aminok elválasztásának rajza
 1: agmatin, 2: spermin, 3: spermidin, 4: trappista sajt, 5: standard keverék,
 6: karfiol, 7: putreszcin, 8: kadaverin, 9: hisztamin, 10: tiramin

A danzil-amin standardok R_f értékeit, a kimutatási határt és a korrelációs koefficiens értékeit az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat: Danzil-amin standardok R_f értékei, kimutatási határ, szórás és korrelációs koefficiens értékei

Aminok	R_f érték (a lap tetejéhez viszonyítva)	Kimutatási határ (ng)	Szórás (50 ng felvitt mennyiségnél)	Korrelációs koefficiens
Agmatin	0,06	5	2 %	0,9932
Spermin	0,15	2,5	1 %	0,9999
Spermidin	0,22	2,5	1 %	0,9973
Putreszcin	0,30	5	1 %	0,9957
Kadaverin	0,35	2,5	5 %	0,9967
Hisztamin	0,39	15	2 %	0,9885
Tiramin	0,70	15	7 %	0,9881

A kimutatási határ 2,5 és 15 ng közé esett. A két nem alifás biogén amin (hisztamin, tiramin) esetén kaptunk nagyobb értéket. A párhuzamos mintafelvétel közötti szórásértékek 1 - 7 % között változtak. Kétféle élelmiszer minta biogén amin tartalmát vizsgáltuk. A növényi eredetű termékek közül egy karfiol mintát és egy állati eredetű, fermentációval készült sajt mintát elemeztünk (2. táblázat). A karfiol spermidint, putreszcint és tiramint tartalmazott nagyobb mennyiségben, míg a trappista sajt tiramint.

2. táblázat: Élelmiszer minták biogén amin tartalma ($\mu\text{g/g}$)

Aminok	Trappista sajt	Karfiol
Agmatin	-	5,3
Spermin	-	9,3
Spermidin	6,1	28,5
Putreszcin	0,5	15,8
Kadaverin	-	-
Hisztamin	-	-
Tiramin	11,2	10,7

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy a Personal OPLC-re általunk kidolgozott módszer gyors és hatékony lehetőséget ad különböző élelmiszerekben előforduló biogén aminok kimutatására és mennyiségi meghatározására.

Irodalom

- [1] Untermann, F. (1983): Scomboroid-Vergiftungen durch Fische. *Schriftenreihe der SGLH*, **13**, 166-179.
- [2] Stratton, J. E., Hutkins, W. R. and Taylor, S.L. (1991): Biogenic amines in cheese and other fermented foods. review. *J. Food. Prot.*, **54**(6), 460-70.
- [3] Smith, T. A. (1981). Amines in food. *Food Chem.*, **6**, 169
- [4] Treptow, H. and Askar, A. (1990): Analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Enahrung/ Nutrition*, **14**(1), 9-17.
- [5] Shalaby, A.R. (1995): Multidetecion, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, **52**, 367-372.
- [6] Bardocz, S., Karsai, T., Elődi, P. (1985): A new technique for the determination of polyamines: overpressured ion-exchange thin-layer chromatography. *Chromatographia*, **20**, 23-24.
- [7] Simon-Sarkadi, L., Galiba, G. (1988): Determination of putrescine and cadaverine in wheat callus by overpressured layer chromatography (OPLC), *J. of Planar Chromatogr.*, **1**, 362-364.
- [8] Joosten, H. M. L. J., Olieman, C. (1986): Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *J. Chromatogr.*, **356**, 311-19.
- [9] Staruszkiewicz, W. F., Bond, J. F. (1981): Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 584-91.
- [10] Sayem-El-Daher, N., Simard, R. E., L'Henreux, L., Roberge, A. G. (1983): Determination of mono-, di- and polyamines in foods using a simple column amino acid analyser. *J. Chromatogr.*, **256**, 313-321.
- [11] Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. H. (1994): Determination of biogenic amines in leafy vegetables by amino acid analyser. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **198**, 230-233.
- [12] Mincsovcics, E., Ferenczi-Fodor, K. and Tyihák, E. (1996): *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, J. Sherma and B. Fried (eds.), Marcel Decker Inc., chapter 7.
- [13] Nyiredy, Sz., Dallenbach-Tölke, K., Sticher, O. (1978): The "PRISMA" optimization system in planar chromatography. *J. Planar Chromatogr.*, **1**, 336.
- [14] Snyder, L.R. (1978): *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 223.

Biogén aminok meghatározása túlnyomásos rétegekromatográfiás módszerrel

Kovács Á., Simonné Sarkadi L. és Mincsovics E.

Élelmiszerekben előforduló biogén aminok meghatározására túlnyomásos rétegekromatográfiás módszert dolgoztak ki. A Personal OPLC-re kidolgozott módszert trappista sajtban és karfiolban előforduló biogén aminok gyors és hatékony kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmazták.

Determination of Biogenic Amines by Overpressured Layer Chromatographic Method

Kovács, Á., Simon-Sarkadi, L. and Mincsovics, E.

Overpressured Layer Chromatographic Method was developed for determination of biogenic amines in foods. The method developed for the Personal OPLC equipment could be used for rapid and efficient qualitative and quantitative determination of biogenic amines in cheese of type Trappista and in cauliflower.

Bestimmung von biogenen Aminen mit der Überdruck-Dünnschichtchromatographie

Kovács, Á., Simon-Sarkadi, L. und Mincsovics, E.

Eine dünn-schichtchromatographische Methode mit Überdruck wurde für die Bestimmung der in Lebensmitteln vorkommenden biogenen Amine erarbeitet. Die für Personal OPLC erarbeitete Methode wurde für den schnellen und effektiven Nachweis sowie für die quantitative Bestimmung von biogenen Aminen in Trappista Käse und Blumenkohl angewandt.