

Stanovenie biogénnych amínov vo víne metódou HPLC

ELENA BELAJOVÁ - EVA KOLESÁROVÁ

SÚHRN. Uvádza sa metóda stanovenia biogénnych amínov vo vínach, konkrétne putrescínu, kadaverínu, histamínu a tyramínu, pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Biogénne amíny prítomné vo vínach boli analyzované po predkolónovej derivatizácii dansylchloridom a po extrakcii toluénom. Separácia amínov prebehla izokratickou elúciou v kolóne s reverznou fázou a mobilnou fázou acetonitril-octan amónny. Použitá bola UV detekcia pri 254 nm.

Zároveň bol sledovaný obsah biogénnych amínov vo vínach pred a po ošetrovaní vína číriacim prostriedkom bentonit.

Biogénne amíny (BA) vo víne predstavujú endogénne cudzorodé látky, ktoré môžu byť prirodzenou súčasťou spracovávanej suroviny, alebo môžu vznikať v priebehu technologického procesu výroby vína ako dôsledok metabolickej činnosti niektorých mikroorganizmov dekarboxyláciou príslušných aminokyselín. Výskyt BA vo vínach značne kolíše a je závislý od suroviny a spôsobu jej spracovania. Porovnaním prác viacerých autorov možno konštatovať, že v najväčších množstvách sa vo vínach vyskytuje histamín, tyramín, putrescín a kadaverín [1]. Z nich najväčšie fyziologické účinky má histamín [2]. Všetky uvedené zlúčeniny vznikajú v prevažnej miere v priebehu jablčnomliečnej fermentácie ako produkty metabolizmu baktérií, najmä druhov *Pediococcus cerevisiae* a *Leuconostoc oenos* [3,4]. Ich obsah je možné zredukovať prídavkom bentonitu [2,5].

Nakolko BA sú dôležitým indikátorom kvality vína a ich zvýšený výskyt ovplyvňuje jeho bezpečnosť, v našej práci sme sa venovali metóde ich stanovenia. Použili sme modifikáciu metód HPLC podľa Ibeho [6] a Eerolu [7], pričom sme vylúčili procedúru purifikácie vína na ionexe za účelom zjednodušenia a skrátenia času stanovenia.

Ing. Elena Belajová, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.
Ing. Eva Kolesárová, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Biocentrum
Modra, Kostolná 7, 900 01 Modra.

Materiál a metódy

Prístroje a chemikálie

Kvapalinový chromatograf s programovateľným UV/VIS detektorom (Pye Unicam), kolóna s reverznou fázou C18 (Tessek ČR), dávkovací ventil Rheodyne 7125, ultrazvukový stroj na čistenie (Tesla), ultratermostat U2 (Medingen, DDR), rotačná vakuová odparka RVO-64 (Mikrotechna).

Acetonitril pre HPLC (Janssen Chimica), octan amónny p.a. (Lachema), toluén čistý (Lachema), kyselina chlorovodíková p.a. 37 % (Merck), 1,7-diaminoheptán 98 % (Merck), dansylchlorid 98 % (T) (Aldrich Chemie), putrescín (1,4-diaminobután) dihydrochlorid 99 % (Fluka Chemika), histamín (2-[4-imidazolyl]-etylamin) dihydrochlorid 99 % (Sigma), kadaverín (1,5-diaminopentán) dihydrochlorid 98 % (Sigma), tyramín (4-hydroxyfenetylamin) hydrochlorid (Sigma), extrakčné SPE kolónky HEMA CM (Tessek, ČR).

Príprava štandardného roztoku BA

70 mg putrescínu, 60 mg kadaverínu, 120 mg histamínu a 30 mg tyramínu sa rozpustilo v malom množstve kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ a doplnilo roztokom kyseliny do objemu 50 cm^3 . Čerstvý roztok sa pripravoval každý týždeň.

Príprava roztoku vnútorného štandardu

25 mg 1,7-diaminoheptánu sa rozpustilo v malom množstve destilovanej vody a doplnilo do objemu 25 cm^3 (koncentrácia 1 mg.cm^{-3}). Čerstvý roztok sa pripravoval každý mesiac.

Príprava roztoku derivatizačného činidla

Bezprostredne pred použitím sa rozpustilo potrebné množstvo dansylchloridu v acetóne, aby sa získal roztok o koncentrácii 10 mg.cm^{-3} acetónu.

Vzorky vína na stanovenie BA

Na stanovenie BA boli použité 3 vzorky bieleho vína od súkromných výrobcov z Malokarpatskej vinárskej oblasti, ročník 1984, vyrobené z odrôd: Tramín (T), Limbašský silván (S) a Veltlín zelený (V). Vzorka S bola ošetrovaná príslušným množstvom prípravku Nacalit 2000 na sodno-vápenatom základe, firmy ERB5LOH Geisenheim, u ktorého výrobcu deklaruje odstránenie neskôr reagujúcich bielkovín.

Pracovný postup - derivatizácia

10 cm^3 vína sa zmiešalo s 10 cm^3 kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ a vakuovo odparilo do sucha pri teplote vodného kúpeľa do 45°C . K zvyšku sa pridali 2 cm^3 destilovanej vody, $0,25 \text{ cm}^3$ roztoku vnútorného štandardu, hydrouhličitan sodný v množstve $0,3 \text{ g}$ a 1 cm^3 derivatizačného činidla. Po uzavretí a premiešaní sa vzorka vložila na jednu hodinu

do tineného vodného kúpeľa s teplotou 45 °C. Potom sa pridali 4 cm³ toluénu, do ktorého sa derivatizované BA preextrahovali. Z toluénového extraktu sa odpipetovali 3 cm³, ktoré sa vákuovo odparili do sucha. Odparok sa rozpustil v 1 cm³ acetonitrilu a prefiltroval cez teflónový mikrofilter s veľkosťou pórov 0,40 μm.

Podobne sa pripravil slepý pokus, ktorý obsahoval namiesto vzorky destilovanú vodu.

Chromatografická separácia BA

Na chromatografickú separáciu derivatizovaných BA sa použila izokratická elúcia s mobilnou fázou acetonitril - 0,1 mol.l⁻¹ octan amónny, 55:45 (v/v). Do kolóny Separon SGX C18, 150 x 3 mm, so zrnitosťou sorbentu 5 μm sa injektovalo 20 μl pripraveného roztoku pri prietoku mobilnej fázy 1 ml.min⁻¹. Derivatizované amíny sa monitorovali pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Príprava kalibračnej čiary

Podľa uvedeného pracovného postupu sa pripravila kalibračná čiara, pri ktorej boli použité roztoky štandardov BA v týchto koncentračných rozsahoch:

putrescín a kadaverín	7 až 280 μg.cm ⁻³
histamín	2 až 150 μg.cm ⁻³
tyramín	3 až 250 μg.cm ⁻³

Číselné údaje pomeru plochy piku štandardov BA a vnútorného štandardu sa vyniesli do grafu oproti údajom koncentrácie štandardov BA.

Výsledky a diskusia

Derivatizácia dansylchloridom je pomerne atraktívnym postupom pri analýze amínov a aminokyselín. Dansylderiváty sú stabilné a dajú sa pripraviť rýchlo, naviac prebytok derivatizačného činidla, resp. vzniknuté vedľajšie produkty pri analýze neinterferujú so separáciou dansylovaných amínov. Na základe neskorších chromatografických analýz bolo zistené, že nezreagovaný, resp. prebytočný dansylchlorid sa eluoval z kolóny ako samostatný pík v 17. minúte chromatografickej separácie.

BA boli identifikované na základe retenčných časov, respektíve retenčného času jednotlivých BA, ktorý bol porovnaný s retenčným časom vnútorného štandardu.

Štandardná zmes štyroch derivatizovaných amínov (vo forme hydro- a dihydrochloridov) bola separovaná v kolóne s reverznou fázou C18 v poradí putrescín, kadaverín, vnútorný štandard, histamín a tyramín. Čas analýzy sa pohyboval do 40 minút (obr. 1.).

Na stanovenie kalibračných čiar boli použité štandardné roztoky BA, ktoré boli injektované 3 až 5 krát v koncentráciach: putrescín a kadaverín 0,14 až 14,0 $\mu\text{g} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$, histamín 0,03 až 3,0 $\mu\text{g} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$ a tyramín 0,05 až 5,0 $\mu\text{g} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$. Vnútorň štandard bol vo všetkých prípadoch injektovaný v množstve 5 $\mu\text{g} \cdot 20 \mu\text{l}^{-1}$.

Údaje opakovateľnosti a linearity získané z kalibračných analýz sú zhrnuté v tabuľkách 1. a 2. Variačný koeficient pre retenčné časy BA sa pohyboval v rozsahu 1 až 2 %. Detekčné limity jednotlivých biogénnych amínov predsta-

TABULKA 1. Kalibračné údaje retenčných časov a variačných koeficientov pre štandardné roztoky biogénnych amínov.

TABLE 1. Calibration data of retention time and coefficients of variation of biogenic amines standard solutions.

Biogénny amín ¹	Priemerný retenč. čas RT ² [min]	Relatívny RT ³	Štandardná odchýlka S _x ⁴ [min]	Variačný koeficient pre RT ⁵ [%]
putrescín ⁶	12,68 n = 14	0,660	0,158	1,25
kadaverín ⁷	15,16 n = 14	0,789	0,254	1,67
vnútorň štandard ⁸	19,21 n = 8	1,000	0,244	1,27
histamín ⁹	24,50 n = 13	1,275	0,379	1,55
tyramín ¹⁰	39,23 n = 12	2,042	0,640	1,63

n - počet analýz.

n - number of analyses, 1 - biogenic amine, 2 - average value of retention time, 3 - relative retention time, 4 - standard deviation, 5 - coefficient of variation for retention time, 6 - putrescine, 7 - cadaverine, 8 - internal standard, 9 - histamine, 10 - tyramine.

TABULKA 2. Matematické vyjadrenie závislosti $c = f(F)$, kde c je koncentrácia v $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a F je faktor udávajúci pomer plochy píku štandardu BA k ploche píku vnútorného štandardu.

TABLE 2. Mathematic formula of dependence $c = f(F)$ where c means concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), F means relation between standard solution peak area and internal standard peak area.

Biogénny amín ¹	$c = f(F)$	Korelačný koeficient ²
putrescín ³	$c = -44,840 + 513,116 \cdot F$	0,9638
kadaverín ⁴	$c = -18,606 + 441,031 \cdot F$	0,9697
histamín ⁵	$c = -1,253 + 278,196 \cdot F$	0,9933
tyramín ⁶	$c = -0,734 + 248,323 \cdot F$	0,9899

1 - biogenic amine, 2 - correlation coefficient, 3 - putrescine, 4 - cadaverine, 5 - histamine, 6 - tyramine.

TABUĽKA 3. Obsah biogénnych amínov vo vínach neošetrených a ošetrených bentonitom.
TABLE 3. Content of biogenic amines in wines with and without treatment with bentonite.

	Obsah biogénnych amínov v mg.dm ⁻³ vína ¹			
	putrescín ²	kadaverín ³	histamín ⁴	tyramín ⁵
VÍNO NEOŠETRENÉ BENTONITOM ⁶				
Tramín	1,71	2,18	10,95	ND
Veltlín zelený	1,42	4,03	ND	ND
Limbašský silván	24,48	5,02	ND	ND
VÍNO OŠETRENÉ BENTONITOM ⁷				
Limbašský silván (50 g bentonitu na 100 dm ³ vína) ⁸	17,18	4,43	ND	ND
Limbašský silván (100 g bentonitu na 100 dm ³ vína) ⁹	1,82	1,09	ND	ND

ND - nedetegovaný.

ND - not detected, 1 - content of biogenic amines in wine (mg.dm⁻³), 2 - putrescine, 3 - cadaverine, 4 - histamine, 5 - tyramine, 6 - wine not treated with bentonite, 7 - wine treated with bentonite, 8 - 50 grams of bentonite in 100 dm³ of wine, 9 - 100 grams of bentonite in 100 dm³ of wine.

vujú trojnásobok štandardnej odchýlky experimentálne nameranej pri analýze štandardných roztokov BA, ktorých koncentrácia bola približne na úrovni minimálneho signálu detektora. Stanovené detekčné limity boli pre putrescín 0,15, kadaverín 0,20, histamín 0,30 a tyramín 0,20 mg.dm⁻³.

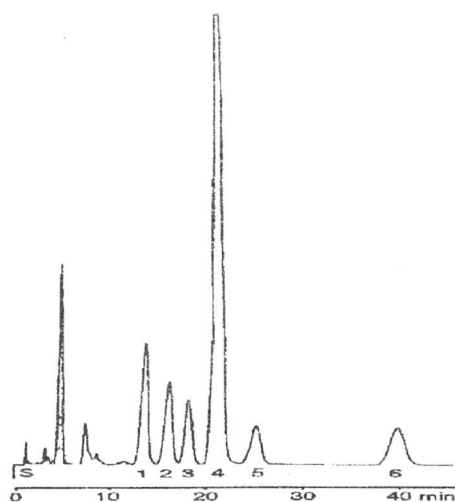
Analýzy vín z malovýroby

Na zmapovanie výskytu BA vo vínach boli vybrané tri vzorky bielych vín od malovýrobcov z malokarpatskej vinárskej oblasti - Tramín (T), Veltlín zelený (V) a Limbašský silván (S). Hodnotenie obsahu BA vo vínach nebolo všeobecne zamerané na spracovanie veľkého súboru vzoriek, naopak, uvedené výsledky majú len informatívny charakter a referujú o hladinách týchto endogénnych látok v konzumných bielych vínach. Každá zo vzoriek vín bola analyzovaná v troch paralelných stanoveniach. Vo všetkých vzorkách bol stanovený obsah putrescínu (1,7 až 24,5 mg.dm⁻³) a kadaverínu (2,2 až 5,0 mg.dm⁻³). Vo vzorke T bol navyše zistený aj obsah histamínu v množstve 10,9 mg.dm⁻³. Tyramín nebol detegovaný v žiadnej zo vzoriek vín (tabuľka 3.).

Výťažnosť

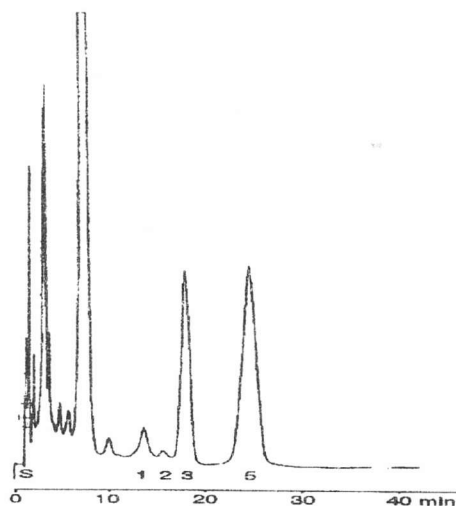
Priemerná výťažnosť BA pridaných do vína v koncentráciách 35 µg.ml⁻¹ (putrescín), 30 µg.ml⁻¹ (kadaverín), 30 µg.ml⁻¹ (histamín) a 15 µg.ml⁻¹ (tyramín) bola pre putrescín 89,6 % a pre kadaverín 107 %. Variačné koeficienty pre oba analyty sa pohybovali v rozpätí 11,0 až 14,3 %.

Výťažnosť histamínu bola sledovaná podrobnejšie. Priemerná hodnota výťažnosti sa pohybovala na hranici 115 %, variačný koeficient bol 5,3 %. Pri fortifikačných koncentráciách vyšších než $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ výťažnosť presahovala hranicu 100 % niekoľkonásobne. Tento jav bol spôsobený vysokými hodnotami F-faktorov (predstavujúce pomer plôch analytu a vnútorného štandardu), ktoré prevyšovali hodnotu 1,0 v konkrétnych vzorkách vín (nie však v štandardných roztokoch BA). Je preto potrebné dodržať koncentračnú hladinu maximálne $30 \mu\text{g}$ histamínu na mililiter zaradením zriedovacieho koeficientu u vín s vyšším obsahom histamínu. Tyramín nebol vyťažný ani v stopových množstvách. Toto zistenie možno zhodnotiť tak, že sa pravdepodobne prejavuje silný efekt matrice, ktorý nedovoľuje vyťažiť tyramín uvedeným postupom. Tento pohľad podporuje aj fakt, že bez použitia vínovej matrice, ale len štandardného roztoku BA v prostredí zriedenej HCl, bol tyramín detegovaný aj pri veľmi nízkych koncentráciách. Možnosť vyťažiť tyramín z fortifikovaného vína sa nezlepšila ani po zaradení prečistovacieho stupňa pomocou kolónky HEMA CM (fy Tessek, ČR), ktorá obsahovala slabokyslý katex. Uvedené vysvetľuje, prečo nebol tyramín detegovaný v analyzovaných vzorkách vín.



OBR. 1. Chromatogram štandardnej zmesi dansylovaných biogénnych amínov.

FIG. 1. Chromatogram of dansylated standard solution of biogenic amines.



OBR. 2. Chromatogram dansylovaných biogénnych amínov vo vzorke silvánu ošetrovaného s 50 g bentonitu v 100 dm^3 vína.

FIG. 2. Chromatogram of dansylated biogenic amines in wine sample S after treatment with 50 grams of bentonite in 100 dm^3 of wine.

Píky v obrázkoch: 1 - putrescín, 2 - kadaverín, 3 - dansylchlorid, 4 - histamín, 5 - vnútorný štandard, 6 - tyramín.

Peaks in figures: 1 - putrescine, 2 - cadaverine, 3 - dansyl chloride, 4 - histamine, 5 - internal standard, 6 - tyramine.

Sledovanie vín počas technologického procesu ich výroby a úprav

Niektoré publikované údaje [2,5] uvádzajú, že na znižovanie obsahu BA prítomných vo víne sa podieľa svojou väzbovou schopnosťou aj bentonit, ktorý sa aplikuje v technológii vína ako číriaci prostriedok. Z tohto dôvodu boli sledované zmeny v obsahu BA u vzorky S, v ktorej bol zaznamenaný vyšší obsah putrescínu a kadaverínu v porovnaní s ostatnými vzorkami. Vzorka S bola ošetrovaná bentonitom (Nacalit 2000) v prídavkoch 50 g a 100 g na 100 dm³ vína. Výsledky analýz potvrdili tendenciu bentonitu redukovať obsah prítomných BA, ktorých hladina sa významne znížila a to u putrescínu z 24,5 na 1,8 mg.dm⁻³, u kadaverínu z 5,0 na 1,1 mg.dm⁻³ pri aplikácii 100 g bentonitu na 100 dm³ vína (tabuľka 3., obrázok 2.). Na analýzu boli odoberané podiely číreho supernatantu zo vzorky S, ktorá bola uskladnená v chladničke.

Záver

Z uvedených výsledkov možno zhodnotiť, že predložená metóda je vhodná na sledovanie biogénnych amínov putrescínu, kadaverínu a histamínu vo vínach. Tyramín ňou nemožno stanoviť pre jeho vysokú retenciu k matrici vína. Metóda dovoľuje separovať predmetné BA prostredníctvom HPLC po ich predkolónovej derivatizácii bez rozsiahlych predbežných úprav s uspokojivou reprodukovateľnosťou výsledkov a časom analýzy.

Literatúra

1. KOLESÁROVÁ, E.: Technologické aspekty vzniku a výskytu biogénnych amínov v potravinách. Bulletin potravinárskeho výskumu, 34, 1995, č. 3-4, s. 109-122.
2. MILLIES, K. D. - ZIMLICH, D.: Histamingehalte von Weinen und Schaumweinen. Weinwirtschaft-Technik, 124(1), 1988, s. 21-24.
3. AERNY, I.: Origine de l'histamine dans les vins. Connaissances actuelles. Bull. Off. Int. Vigne et Vin, 58(X/XI), 1985, s. 656-657, s. 1016-1019.
4. MAYER, K. - PAUSE, G.: Nicht-fluechtige biogene Amine in Wein. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteln, 64(1), s. 171-179.
5. DESSER, H. - BANDION, F.: Zur Kenntnis einiger biogener Amine des Traubenweines bezeuglich ihrer Konzentrationsveraenderungen durch bestimmte kellerwirtschaftliche Massnahmen und waehrend der Lagerung von Flaschenwein. Klosterneuburg Rebe und Wein, 35(1), 1985, s. 16-19.
6. IBE, A. - SAITO, K. a kol.: Quantitative Determination of Amines in Wine by Liquid Chromatography. Journal of the AOAC, 74(4), 1991, s. 695-697.
7. EEROLA, S. a kol.: Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. Journal of AOAC International, 76(3), 1993, s. 575-577.

Do redakcie došlo 18.1.1996.

Determination of biogenic amines in wine by HPLC

ELENA BELAJOVÁ - EVA KOLESÁROVÁ

SUMMARY. A liquid chromatographic method for determination of biogenic amines putrescine, cadaverine, histamine, and tyramine in wine is described. Biogenic amines present in wine were analyzed after precolumn derivatization with dansyl chloride and extraction with toluene. Separation of amines was performed on reverse phase column with an acetonitrile-ammonium acetate isocratic elution, using UV detection at 254 nm.

Also content of biogenic amines in wines before and after treatment with clarifying agent bentonite was determined.