

Využitie kapilárnej izotachoforézy na stanovenie biogénnych amínov vo vybraných potravinárskych výrobkoch

JOLANA KAROVIČOVÁ - ZLATICA KOHAJDOVÁ - DRAHOMÍRA LUKÁČOVÁ

SÚHRN. Na stanovenie biogénnych amínov vo vybraných potravinárskych výrobkoch sa použila kapilárna izotachoforéza. Touto metódou sa stanovil histamín, kadaverín, putrescín a tyramín. Najvyšší obsah histamínu sa zistil vo vzorke hydinové párky 146,8 mg.kg⁻¹, kadaverínu vo vzorke syr Karička Optim 666,4 mg.kg⁻¹ a putrescínu v polosladkej sójovej omáčke 2156,4 mg.kg⁻¹. Medza stanovenia pre jednotlivé amíny sa pohybovala od 1,0 do 2,3 mg.kg⁻¹. Výťažnosť stanovenia bola v rozmedzí od 95,4 do 104,9 %.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: kapilárna izotachoforéza; biogénne amíny

Amíny vznikajúce dekarboxyláciou prirodzených aminokyselín pôsobe-
ním živých organizmov, prípadne amináciou a transamináciou aldehydov
a ketónov sa označujú ako biogénne amíny [1]. Biogénne amíny sú nízko-
molekulové organické zásady rozličnej chemickej štruktúry s charakterom
alifatických, aromatických a heterocyklických zlúčenín [2]. Pri vzniku amínov
v potravinách prichádzajú do úvahy tri spôsoby: dekarboxylácia, aminácia
aldehydov a ketónov a odbúranie väzieb s obsahom dusíka. Vo všeobecnos-
ti sa predpokladá, že väčšina amínov sa vytvára dekarboxyláciou aminokyse-
lín [1].

Biogénne amíny sú vytvárané, riadené, metabolizované a za určitých pod-
mienok môžu byť hromadené pri látkovej premene človeka, zvierat, rastlín
a mikroorganizmov. Tým môžu ovplyvňovať viacero procesov prebiehajúcich
v organizme [3, 4]. Putrescín, kadaverín, spermidín, spermin, tyramín, dopa-
mín a noradrenalin vykazujú antioxidačné účinky [5, 6].

Histamín je považovaný za najtoxickejší z biogénnych amínov. Príznaky
otravy histamínom sú nasledovné: sčervenanie kože (hlavne na tvári),

Doc. Ing. Jolana KAROVIČOVÁ, PhD., Ing. Zlatica KOHAJDOVÁ, Ing. Drahomíra LUKÁČOVÁ, Katedra potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej tech-
nológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Doc. Ing. Jolana KAROVIČOVÁ, PhD.

žihľavkovité vyrážky so svrbením, nevoľnosť (ktorá môže viesť až k zvracaniu), hnačka, žalúdočné kŕče, bolesti hlavy a závraty [7]. Histamín pôsobí aj ako sťahovač priedušiek a ako sprostredkovateľ alergických reakcií [8, 9].

Významným predpokladom tvorby biogénnych amínov je proteolýza, či už autolytická alebo bakteriálna. Dekarboxylázy aminokyselín nie sú v baktériách celkom bežné, ale vyskytujú sa napr. v rodoch ako sú *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a v mliečnych baktériách rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* [3].

Kvantitatívne stanovenie biogénnych amínov môže byť využité ako technologický parameter na stanovenie mikrobiologickej kontaminácie spracovávaných potravín vzhľadom na to, že biogénne amíny vznikajú ako následok bakteriálnej enzýmovej aktivity. Tieto molekuly však nemôžu byť považované za absolútne kritérium kontaminácie potravín, pretože niektoré mikroorganizmy ich môžu degradovať [10], napr. *Micrococcus varians* je schopný degradovať tyramín [11], *Brevibacterium linens* odbúrava histamín a tyramín [12].

Analýze biogénnych amínov v potravinách sa v poslednom období venuje náležitá pozornosť.

Shalaby [13, 14] použil na stanovenie biogénnych amínov vo fermentovaných rybácich výrobkoch metódu tenkovrstvovej chromatografie. Amíny boli prevedené na dansylderiváty, separované 2-dimenzionálnou vyvíjacou technikou a kvantifikované denzitometricky.

Slemr a Beyermann [15] sledovali obsah kadaverínu, putrescínu a histamínu v mäse metódou plynovej chromatografie, pričom amíny boli prevedené na 3-fluoroacetylderiváty. Rogers a Staruszkiewicz [16] využili plynovú chromatografiu na stanovenie putrescínu a kadaverínu v rybácich konzervách. Vzorky boli derivatizované anhydridom kyseliny pentafluoropropiónovej a biogénne amíny detegované detektorom elektrónového záchytu.

Leuschner a Hammes [17] a Straub a kol. [18] sledovali obsah biogénnych amínov v rôznych potravinárskych výrobkoch metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Amíny boli prevedené na deriváty *o*-ftalaldehydu a detegované fluorimetricky.

Gardana a kol. [19] a Gallardo a kol. [7] aplikovali na stanovenie histamínu v rybách metódu kapilárnej elektroforézy. Kapilárnu izotachofórezu použili Voldřich a kol. [20] na stanovenie histamínu v rybách a Karovičová a kol. [21] na stanovenie biogénnych amínov v mliečne fermentovaných zeleninových šťavách. Kalač [22, 23] aplikoval na stanovenie biogénnych amínov v kvasenej kapuste metódu micelárnej elektrokinetickej kapilárnej chromatografie.

Na analýzu biogénnych amínov sa používa aj automatický analyzátor aminokyselín, kde je pri vhodne zvolených podmienkach možné popri biogén-

nych amínoch stanoviť aj aminokyseliny [24, 25], ako aj imunochemické metódy [26] a elektrochemické biosenzory [27, 28].

Cieľom práce bolo aplikovať kapilárnu izotachofóru na stanovenie biogénnych amínov vo vybraných potravinárskych výrobkoch, stanoviť podmienky prípravy a úpravy vzoriek a vykonať validáciu metódy kapilárnej izotachofórey.

Materiál a metódy

Na analýzu boli použité fermentované výrobky (sójové omáčky, saláma), rybie konzervy (tuniak), treska - šalát, rybacie šalát, syry, tvaroh, mlieko, nátierky (bryndzová, hubová), horčica, hydínové párky. Tieto výrobky boli zakúpené v maloobchodnej sieti.

Stanovenie biogénnych amínov kapilárnou izotachofórou [20, 21]

Kapilárna izotachofóra bola použitá na stanovenie histamínu, tyramínu, kadaverínu a putrescínu.

Izolácia biogénnych amínov zo vzoriek: 10 g zhomogenizovanej vzorky potravinu bolo extrahovaných 50 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl, 30 min. Získaný homogénizát bol prefiltrovaný a filtrát bol použitý na izotachoforetickú analýzu.

Na meranie sa použil izotachoforetický analyzátor ZKI 01 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves) s vodivostným detektorom a dvojlíniovým zapisovačom TZ 4200 (Laboratorní přístroje, k. p. Praha).

Na identifikáciu a stanovenie bol aplikovaný elektrolytický systém nasledujúceho zloženia:

- vodiaci elektrolyt: 0,01 mol.dm⁻³ KOH, protiión valín, pH 9,9,
- zakončujúci elektrolyt: 0,02 mol.dm⁻³ TRIS, protiión HCl, pH 8,3.

Vzorky boli analyzované prúdom 150 μ A v predseparačnej kolóne. Kvantitatívna analýza bola realizovaná pomocou metódy kalibračnej čiary.

Výsledky a diskusia

V Potravinovom kódexe SR [29] sú stanovené maximálne prípustné limity pre dva biogénne amíny. Jedná sa o histamín (20 mg.kg⁻¹ v pive a 200 mg.kg⁻¹ v rybách a rybích výrobkoch) a tyramín (200 mg.kg⁻¹ v tvrdých syroch).

Hoci vyhláška neuvádza prípustné hladiny koncentrácií pre putrescín a kadaverín, je potrebné ich sledovať vzhľadom na skutočnosť, že sú indikátormi pomnoženia baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae*, a to predovšet-

TAB. 1. Biogénne amíny v rôznych potravinárskych výrobkoch.
TAB. 1. Biogenic amines in different food products.

Vzorka ¹	Názov výrobku ²	Výrobca ³	Obal ⁴	Množstvo ⁵	Obsah biogénnych amínov ⁶ [mg.kg ⁻¹]		
					histamín ⁷	tyramín ⁸	putrescín ¹⁰
1	sójová omáčka pikantná	Holandsko	tmavé sklo	250 ml	ND	ND	429,85
2	sójová omáčka polosladká	Indonézia	polyetylén	150 ml	ND	ND	531,33
3	treska	Slovensko	polyetylén	150 g	36,50	ND	ND
4	tuniak vo vlastnej šťave sendvičový	Thajsko	konzerva	185 g	ND	ND	ND
5	tuniak v rastlinnom oleji	Thajsko	konzerva	185 g	ND	ND	147,18
6	rybací šalát	Slovensko	-	vážený	44,55	ND	124,04
7	saláma Ponitran	Slovensko	-	vážená	ND	8,33	ND
8	hydínové párky	Slovensko	-	vážené	146,75	ND	126,64
9	syr Bambino	Slovensko	polyetylén	100 g	ND	ND	190,52
10	syr Karička Optim	Slovensko	hliníková fólia	150 g / 6 ks	ND	ND	666,36
11	syr Lunex šunka	Slovensko	hliníková fólia	150 g / 3 ks	ND	14,84	288,79
12	cottage cheese s chrenom	Slovensko	polyetylén	200 g	ND	ND	61,26
13	tvoroh Danissimo straciatella	Polsko	polyetylén	135 g	34,66	ND	73,19
14	tvoroh Danissimo zimný sen	Polsko	polyetylén	135 g	ND	ND	219,79
15	mlieko polotučné trvanlivé	Slovensko	tetrapak	1 l	ND	ND	ND
16	bryndzová nátierka	Slovensko	polyetylén	100 g	ND	12,88	ND
17	nátierka Alfa Bio s hubami	Slovensko	polyetylén	100 g	ND	7,02	85,63
18	horčica kremzská	Slovensko	sklo	350 g	ND	3,04	ND

ND - pod limitom stanovenia.

ND - below the limit of determination. 1 - sample, 2 - product name, 3 - producer, 4 - packing, 5 - amount, 6 - content of biogenic amines, 7 - histamine, 8 - tyramine, 9 - cadaverine, 10 - putrescine.

kým *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella* a pseudomonád (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*), ako aj skutočnosti, že v tráviacom trakte oslabujú činnosť monoaminoxidáz a diaminooxidáz, čo má za následok zvýšenie koncentrácií histamínu a tyramínu v krvi [30]. V tab. 1 sú uvedené obsahy biogénnych amínov v jednotlivých analyzovaných potravinových výrobkoch. Na obr. 1 je uvedený izotachoforeogram vzorky hydínových párkov.

V nami sledovaných potravinárskych výrobkoch bolo najväčšie množstvo histamínu stanovené v hydínových párkoch ($146,75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), obsah tyramínu bol buď pod hranicou detekčného limitu danej metódy, alebo sa tyramín vyskytoval vo veľmi nízkych koncentráciách. Čo sa týka obsahu kadaverínu a putrescínu, najväčšie množstvá týchto amínov boli zistené v sójových omáčkach a v syre s príchuťou šunky. Vysoká koncentrácia kadaverínu bola nájdená v syre Karička. Za predpokladu bežného príjmu predmetných potravín by nemal príjem takýchto množstiev biogénnych amínov vyvolať u ľudí zdravotné problémy, pretože v črevnom trakte cicavcov pôsobí detoxikačný systém, ktorý dokáže metabolizovať normálny príjem biogénnych amínov potravou [30]. Hlavnú úlohu v ňom hrajú enzýmy monoaminoxidáza a diaminooxidáza. Tieto enzýmy pôsobia v črevnom epiteli, takže do krvného obehu sa dostávajú produkty oxidácie biogénnych amínov [3]. Iná je však otázka u chorých osôb, ktoré užívajú lieky s inhibičnými účinkami na monoaminoxidázu.



OBR. 1. Izotachoforeogram vzorky hydínových párkov.
1 - kadaverín, 2 - histamín.

FIG. 1. Isotachophoregram of the frankfurters sample.
1 - cadaverine, 2 - histamine.

xidázu a diaminoxidázu, ako sú antihistaminiká (Alfadryl, Bromadryl, Methiaden), tuberkulostatiká (Ninrazid), ale predovšetkým psychofarmaká s antidepresívnym účinkom (Narval, Nardil, Stinerval), kedy je potrebné zobrať do úvahy zmenený metabolizmus biogénnych amínov, ich možné nahromadenie, čo môže viesť k vážnym zdravotným poruchám. U takých osôb je preto potrebné brať počas diéty ohľad na celkovú bilanciu prísunu biogénnych amínov potravou do organizmu [30].

Validácia kapilárnej izotachoforézy pri stanovení biogénnych amínov [31, 32]

Pri validácii metódy kapilárnej izotachoforézy boli hodnotené nasledujúce validačné parametre:

Selektivita (špecifickosť)

Hodnota r. s. h. (relatívna výška skoku) sa pre biogénne amíny nemenila a zóny si zachovávali svoju dĺžku.

Odozgová funkcia

Na meranie kalibračných závislostí sa postupne do kolóny dávkovali štandardné roztoky histamínu a tyramínu s koncentráciou 2.10^{-4} , 4.10^{-4} , 6.10^{-4} , 8.10^{-4} , 10.10^{-4} mol.dm⁻³. Merania sa vykonávali z troch kalibračných kriviek pre každý amín a údaje sa spracovali metódou lineárnej regresie. Z výsledkov vyplynulo, že daná metóda dávala lineárnu odozvu a korelačné koeficienty pre jednotlivé stanovenia sa pohybovali od 0,9994 do 0,9999 pre histamín a od 0,9839 do 0,9894 pre tyramín. Relatívne smerodajné odchýlky pre jednotlivé stanovenia sa pohybovali od 0,94 do 4,56 % pre histamín a od 1,11 do 3,29 % pre tyramín.

Medza stanovenia

Medza stanovenia pre jednotlivé amíny bola nasledovná: histamín 1,59 mg.kg⁻¹, tyramín 1,25 mg.kg⁻¹, kadaverín 2,32 mg.kg⁻¹, putrescín 1,02 mg.kg⁻¹.

Limit detekcie

Limit detekcie udávaný výrobcom (Villa Labeco, Spišská N. Ves) použitého prístroja bol 1.10^{-11} mol v analytickej kolóne.

Presnosť a správnosť

Presnosť bola sledovaná na štandardných roztokoch histamínu a tyra-

mínu, pričom sa merali tri koncentrácie danej látky 5-krát za deň počas dvoch dní. Smerodajné odchýlky pre stanovenie histamínu sa pohybovali od 1,01 do 5,77 % a pri stanovení tyramínu od 0,52 do 4,22 %.

Správnosť bola hodnotená ako výťažnosť a chyba merania. Štandardný prídavok predstavoval v každom prípade $4 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³. Výťažnosť metódy sa pohybovala od 95,4 % (pre kadaverín vo vzorke hydínových párkov) do 104,9 % (pre histamín vo vzorke hydínových párkov). Chyba merania nepresiahla 5 % s výnimkou vzoriek rybacieho šalátu, kde výťažnosť bola v rozmedzí 73,0 % (pre histamín) až 85,3 % (pre kadaverín). V tomto prípade mohla byť nižšia výťažnosť amínov spôsobená prítomnosťou interferujúcich látok a ich väzbou na amíny (napr. oxidačné produkty lipidov).

Záver

Kapilárna izotachofórea sa ukázala ako vhodná metóda na stanovenie biogénnych amínov pre jednoduchú úpravu vzorky.

Vo vzorkách rybácich výrobkov boli zistené množstvá histamínu pod prípustným limitom uvedeným v Potravinárskom kódexe SR. Uvedený amín je považovaný za najtoxickejší z biogénnych amínov. Obsah kadaverínu v rybacom šaláte a v tuniaku vo vlastnom oleji bol od 124,04 do 147,18 mg.kg⁻¹. Zaujímavý bol hlavne stanovený obsah kadaverínu a putrescínu v sójovej omáčke, kde hodnota pre putrescín dosahovala až 2156,44 mg.kg⁻¹ a pre kadaverín 531,33 mg.kg⁻¹.

Literatúra

1. ASCAR, A. - TREPTOW, H.: Biogene amine in Lebensmitteln. Stuttgart : Ulme, 1986. 197 s.
2. ROSIVAL, L. - SZOKOLAY, A.: Cudzorodé látky v požívatinách. 2. vyd. Martin : Osveta, 1983. 648 s.
3. KRÍŽEK, M. - KALAČ, P.: Biogenní amíny v potravinách a jejich role ve výživě. Czech Journal of Food Science, 16, 1998, č. 4, s. 151-159.
4. BARDÓCZ, S.: Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends in Food Science, 6, 1995, s. 341-346.
5. OGAWA, H. - TSUJI, H. - SETO, A. - HARA, S. - TOTANI, Y.: Synergic effect of spermine on antioxidation of polyunsaturated acids. Journal of Japan Oil Chemist's Society, 45, 1996, č. 12, s. 1327-1332.
6. YEN, G. CH. - HSIEN, CH. L.: Antioxidant effect of dopamine and related compounds. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 61, 1997, č. 10, s. 1646-1649.
7. BENTLEY, S. - BOTTARELLI, A. - BONARDI, S.: Istamina e riflessi sanitari. Ingegneria Alimentare, 5, 1995, s. 32-35.

8. YAN, L.: Histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: association of common functional polymorphism with asthma. *Pharmacogenesis*, 10, 2000, s. 261-266.
9. LEHANE, L. - OLLEY, J.: Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 2000, s. 1-37.
10. ANTOLINI, F.: An ion pair HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine, β -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheeses for industrial purposes. *Italian Journal of Food Science*, 11, 1999, č. 4, s. 335-346.
11. LEUSCHNER, R. G. K. - HAMMES, W. P.: Tyramine degradation by *Micrococci* during ripening of fermented sausages. *Meat Science*, 49, 1998, č. 3, s. 289-296.
12. LEUSCHNER, R. G. K. - HAMMES, W. P.: Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening on Munster cheese. *Journal of Food Protection*, 61, 1998, č. 7, s. 874-878.
13. SHALABY, A. R.: Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in food. *Food Chemistry*, 52, 1995, s. 367-372.
14. SHALABY, A. R.: Separation, identification and estimation of biogenic amines in food by thin layer chromatography. *Food Chemistry*, 49, 1994, s. 305-310.
15. SLEMR, J. - BEYERMANN, K.: Determination of biogenic amines in meat by combined ion-exchanged and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 283, 1984, s. 241-250.
16. ROGERS, P. L. - STARUSZKIEWICZ, W.: Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and machimahi and fluorimetric method for histamine: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 80, 1997, č. 3, s. 591-602.
17. LEUSCHNER, R. G. K. - HAMMES, W. P.: Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by *Lactobacilli*. *International Journal of Food Nutrition*, 50, 1999, s. 159-164.
18. STRAUB, B. - TICHACZEK, P. S. - KICHERER, M. - HAMMES, W. P.: Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat products using reversed - phase HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 197, 1993, s. 230-232.
19. GARDANA, C. - PIETTA, P. - CIAPPELLANO, S. - TESTOLIN, G.: Determination of histamine in fish products by capillary electrophoresis and ion-pair liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 1999, s. 91-94.
20. VOLDŘICH, M. - HRDLÍČKA, J. - OPATOVÁ, M.: Stanovení histaminu v rybách metodou kapilární izotachoforézy. *Potravinářské Vědy*, 6, 1988, č. 2, s. 99-103.
21. KAROVIČOVÁ, J. - KOHAJDOVÁ, Z. - ŠIMKO, P. - POLONSKÝ, J. - LUKÁČOVÁ, D.: Determination of biogenic amines during lactic acid fermentation of vegetable juices. *Chemické Listy - Symposia*, 96, 2002, s. 164-165.
22. KALAČ, P.: Changes in biogenic amines concentration during sauerkraut storage. *Food Chemistry*, 69, 2000, s. 309-314.
23. KALAČ, P.: The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. *Food Chemistry*, 70, 2000, s. 355-359.
24. KLAUSEN, N. K. - LUND, E.: Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 182, 1986, s. 459-463.
25. SIMON-SARKADI, L. - HOLZAPFEL, W. H. - HALASZ, A.: Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5 °C. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 1994, č. 6, s. 407-418.
26. RAUCH, P.: Enzymová imunoanalýza histaminu v požívatinách. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991, č. 1, s. 9-16.
27. MALE, K. B. - BOUVRETT, P. - LUONG, J. - GIBBS, B. F.: Amperometric biosensor for total

- histamine, putrescine and cadaverine using diamine oxidase. *Journal of Food Science*, *61*, 1996, č. 5, s. 1012-1016.
28. LÓPEZ SABATER, E. I.: Determination of histamine in fish using an enzymic method. *Food Additives and Contaminants*, *10*, 1993, č. 5, s. 593-602.
29. Aktualizovaný potravinový kódex so súvisiacimi predpismi. 1. diel. Bratislava : EPOS, 1999. 352 s.
30. GREIF, G. - GREIFOVÁ, M. - DRDÁK, M.: Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinárske Vědy*, *15*, 1997, č. 2, s. 119-129.
31. WIELING, J.: Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. *Journal of Chromatography*, *A730*, 1996, s. 381-394.
32. LINDNER, W. - WAINER, I. W.: Requirements for initial assay validation and publication in *Journal of Chromatography B. Analytical Separations News*, *3*, 1998, č. 1, s. 7.

Do redakcie došlo 10.7.2002.

Using of capillary isotachophoresis for determination of biogenic amines in selected food products

KAROVIČOVÁ, J. - KOHAJDOVÁ, Z. - LUKÁČOVÁ, D.:
Bull. potrav. Výsk., *41*, 2002, p. 187-195.

SUMMARY: Capillary isotachophoresis was used for the determination of biogenic amines in selected food products. Histamine, cadaverine, putrescine and tyramine were determined by the method. The highest content of histamine was found in a sample of frankfurters, 146.75 mg.kg⁻¹, of cadaverine in a sample of Karička Optim cheese, 666.36 mg.kg⁻¹ and of putrescine in soy sauce, 2156.44 mg.kg⁻¹. The limits of determination for individual amines varied from 1 to 2,3 mg.kg⁻¹. The recovery rate ranged from 95.4 to 104.9 %.

KEYWORDS: capillary isotachophoresis; biogenic amines